



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE LEVADURAS PATAGÓNICAS SELECCIONADAS PARA SU USO EN ENOLOGÍA

SEBASTIÁN MARIO EZEQUIEL BRAVO

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2020

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos, Biotecnología y Energías alternativas (PROBIEN), CONICET-Universidad Nacional del Comahue, Neuquén. Facultad de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (FACTA), Universidad Nacional del Comahue, Villa Regina, Rio Negro y la Planta Piloto de Ingeniería Química (PLAPIQUI, UNS-CONICET), Departamento de Ingeniería Química Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Buenos Aires, durante el periodo comprendido entre Septiembre de 2015 y Mayo 2020, bajo la dirección de la Dra. Diana Constenla y la Dra. Adriana Caballero.



Sebastián M.E. Bravo

sebastian.bravo@facta.uncoma.edu.ar



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continúa

La presente tesis ha sido aprobada el...../...../..... , mereciendo
la calificación de.....(.....)

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha sido realizada gracias a la BECA DOCTORAL CONICET.

En primer lugar, quiero agradecer, a mis directoras de tesis, Dra. Diana Constenla y Dra. Adriana Caballero que me han dado la oportunidad de realizar este trabajo. A ambas agradecerle su apoyo, paciencia, así como las ganas de aprender y mejorar que me han transmitido. Gracias por confiar en mis posibilidades.

A la Universidad Nacional del Sur, la Universidad Nacional del Comahue y al Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos, Biotecnología y Energías alternativas (PROBIEN), CONICET-Universidad Nacional del Comahue, por su apoyo académico y económico.

Al equipo del Laboratorio de Biotecnología y Bioprocesos de levaduras y bacterias de uso enológico, Dra. Silvana del Mónaco, Dra. Carmen Maturano, Mg. Adriana Simes, Lic. Viviana Carreño, Tec. Esther Camacho, Enólogo Horacio Bibiloni por ofrecerme su ayuda en todo momento. Gracias por su apoyo y sus ánimos.

Al grupo de la cátedra de Microbiología de los Alimentos. Por su dedicación, su amistad y su ayuda incondicional, tanto dentro como fuera del laboratorio. En particular a la Lic. Yolanda Curilén por su aporte en los experimentos de producción.

Al Ing. Leonardo Bajda profesional asistente responsable del HPLC por su apoyo y dedicación.

Al Ing. Valentín Tassile por su apoyo en todo momento y su aporte en los análisis estadísticos.

A todos los colegas de docencia y personal de la Facultad de Ciencia y Tecnología por sus valiosos aportes en el tema y su calidad humana.

Al Ing. Carlos Aeberhard y al Ing. Fausto Vicente por sus valiosos aportes de planta de producción y fermentaciones.

Al Lic. Manuel Morales. Por su amistad y sus valiosos aportes en el tema.

Finalmente, quiero agradecer de forma especial el apoyo de mi familia y amigos, que me han dado fuerza a lo largo de estos años para continuar hacia delante. Gracias de todo corazón.

RESUMEN

En este trabajo, se diseñó y probó a escala piloto un medio de cultivo a base de bagazo de manzana como sustrato para la producción industrial de biomasa de levaduras de vino nativas Patagónicas convencionales y no convencionales. El bagazo de manzana se caracterizó fisicoquímicamente y su potencial utilidad como componente de un medio de cultivo completo para la producción de biomasa de levadura se evaluó en primer lugar utilizando diseños experimentales factoriales. La influencia de la composición del medio sobre los parámetros de crecimiento de las levaduras vínicas autóctonas de la Patagonia, se analizó mediante diseños Plackett-Burman y compuesto central con metodología de superficie de respuesta, comparando en cada ensayo el bagazo de manzana con la melaza de caña, el sustrato comúnmente utilizado para la propagación de biomasa. Se formuló la composición del medio de cultivo y se validaron los modelos. Seguidamente, la composición del medio de cultivo se optimizó en cultivos por lote a escala piloto (20 L) ajustándose la fuente nitrogenada, el pH y la temperatura hasta obtener una conversión óptima del sustrato en producto, en función del tiempo de fermentación. La calidad microbiológica de la biomasa obtenida se evaluó mediante métodos convencionales y sus propiedades tecnológicas se analizaron a escala industrial mediante vinificaciones guiadas utilizando la biomasa húmeda obtenida y dos iniciadores comerciales como controles. La cinética de la fermentación, seguida por evolución de la densidad del mosto, fue óptima y capacidad de implantación de las cepas, evaluada mediante recuento de viables en un medio completo y discriminación de las cepas por ADNm RFLP utilizando la endonucleasa *Hinf I*, resultó del 100 %. Los vinos fueron analizados química y sensorialmente y sometidos a una prueba de preferencia del consumidor con resultados estadísticamente significativos y favorables. Finalmente, se realizó un estudio de factibilidad técnica y económica del proyecto de producción de **levadura seca activa** (LSA) teniendo en cuenta las necesidades regionales, obteniéndose resultados favorables. Los resultados permiten concluir que el bagazo de manzana constituye un sustrato ventajoso para la propagación de levaduras enológicas, en particular las Crabtree positivas como *Saccharomyces cerevisiae*, tanto desde un punto de vista nutricional, tecnológico como económico. **Importancia e impacto del estudio:** Este trabajo propone transformar un material alternativo rico en carbono, generosamente disponible en la región de la Patagonia y generado como desecho industrial, en un recursos energéticos sostenible, económicamente rentable y amigable con el medio ambiente destinado a la producción de insumos alimenticios que involucren levaduras. Adicionalmente el proyecto agregará valor a la producción vitivinícola local y permitirá la sustitución de insumos importados.

ABSTRACT

A culture medium based on apple bagasse was designed and tested as a substrate for biomass production of conventional and unconventional Patagonian native wine yeasts. The physicochemical characterization of the apple bagasse/waste was carried out and its potential utility as a constituent of a complete culture medium for the production of yeast biomass was firstly analysed using the experimental statistical designs. Growth parameters of conventional and non-conventional Patagonian wine yeasts were analysed with Plackett–Burman designs and response surface methodology, comparing in each assay the apple bagasse substrate with the commonly used substrate for biomass development, cane molasses. The composition of the culture medium was formulated and models were validated. After this, culture medium composition was optimized at pilot scale (20 L) in batch cultures where nitrogen source, pH and process temperature were adjusting in order to obtain optimal substrate conversion into product. The biomass microbiological quality was evaluated by conventional methods and its technological properties were assayed at industrial scale through guided vinifications using wet biomass and two commercial starters as controls. The kinetics of alcoholic fermentation were followed by density and implantation of the strains by counting viable cells on agar plate agar and molecular analysis using ADN_m RFLP and *Hinf* I endonuclease. The wines were chemically analyzed and their oenological quality was evaluated using a consumer preference test with statistically favorable results for them. Finally, the technical and economic feasibility study of a project on active dry yeast production attending regional needs was performed. The results allow to conclude that apple bagasse constitutes an advantageous substrate for the propagation of enological yeasts from a nutritional, technological and economic point of view. **Significance and Impact of the Study:** This work propose to transform an alternate carbon-rich material, generously available in Patagonia region, originally generated as fruit industrial waste, into a source of sustainable, economically profitable, and environmentally friendly energy resource for the food supplies production that involving yeasts. The project allows also to improve the local wine industry as well as imported products substitution.

Firma de las directoras



Dra. Diana Constenla
Directora



Dra. Adriana Caballero
Directora

NOMENCLATURA

% T, porcentaje de transmitancia

°Bmé, grados Baumé

°Bx, grados Brix

°GL, grado alcohólico

A, máxima producción de biomasa

abs, absorbancia

ADN, ácido desoxirribonucleico

AMPC, adenosín monofosfato cíclico

ANOVA, análisis de varianza

AP, ácido pantoténico

AR, azúcares reductores

ARN, ácido ribonucleico

ART, azúcares reductores totales

ATP, adenosina trifosfato

aw, actividad acuosa

B, biotina

BA, BACOFER A (levadura comercial líquida)

BAL, bacterias del ácido láctico

C, fuente carbonada

CA, concentración del analito

CAA, Código Alimentario Argentino

CP 1, componente principal 1

CP 2, componente principal 2

CTT1, gen que codifica la enzima catalasa citoplasmática

DAD, detector de arreglo de diodos

DCC, diseño de compuesto central

DE, desvió estándar

DEE, diseño estadístico experimental

DO, densidad óptica

DPB, diseño Plackett Burman

e1 y e2, autovector del análisis de componentes principales

EBM, extracto de bagazo de manzana

EBT, empresa de base tecnológica

EDTA, ácido etilendiaminotetraacético

ESFA, Agencia de Seguridad Alimentaria de la Unión Europea

F15, levadura comercial *S. cerevisiae* Laffort LSA

FA, fermentación alcohólica

FAF, fermentación alcohólica final

FAI, fermentación alcohólica inicial

FAN, nitrógeno fácilmente asimilable

FDA, Administración Federal de Alimentos y Drogas

FML, fermentación maloláctica

GPY, glucose peptone yeast

GRAS, generalmente considerado como seguros

GRXs, gen que codifica el sistema de la glutarredoxina

H, humedad

HPLC, cromatografía líquida de alta eficacia

Hxt, transportadores de azúcares en *Saccharomyces cerevisiae*

I, intensidad de luz

I_0 , intensidad de luz inicial

INV, Instituto Nacional de Vitivinicultura

KLa, coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno

Ks, constante de saturación

LSA, levadura seca activa

MSR, metodología de superficie de respuesta

N, fuente nitrogenada

OD, oxígeno disuelto

OIV, Oficina Internacional de la Uva y el Vino

P, piridoxina

P1025, caudal de aire 10 litro estándar por minuto, temperatura 25 °C para *P. kudriavzevii*

P1030, caudal de aire 10 litro estándar por minuto y 30 °C para *P. kudriavzevii*

P130, caudal de aire 1 litro estándar por minuto y 30 °C para *P. kudriavzevii*

pb, pares de bases

PCA, análisis de componentes principales

PCR, reacción en cadena de la polimerasa

Pk 15, Pichia kudriavzevii 15

PKA, proteína quinasa A

PT, polifenoles totales

P_x , productividad volumétrica de biomasa

Q, caudal de aire

QPS, presunción de seguridad calificada

RCB, relación Costo- Beneficio

rh, potencial de óxido reducción

ROS, especies reactivas del oxígeno

RS, superficie de respuesta

S, concentración de sustrato

SDS, dodecil sulfato sódico

S1025, caudal de aire 10, temperatura y 25 °C para *S. cerevisiae*

S1030, caudal de aire 10 litro estándar por minuto y 30 °C para *S. cerevisiae*

S130, caudal de aire 1 litro estándar por minuto y 30 °C para *S. cerevisiae*

Sc F8, Saccharomyces cerevisiae F8

SIP, esterilizable en el lugar

SLPM, litro estándar por minuto

SOD1 y SOD2, gen que codifica la enzima superóxido dismutasas

T, temperatura

TAE, tris Acetato EDTA

Ti, tiamina

TIR, Tasa Interna de Retorno

TMRA, Tasa Mínima de Rendimiento Aceptable

TRX2, gen que codifica el sistema de la tioredoxina

UFC, unidades formadoras de colonia

VAN, Valor Actual Neto

VVM, volumen de aire por volumen de medio por minuto

YEPD, extracto de levadura, peptona y dextrosa

$Y_{x/s}$, rendimientos de biomasa

λ , extensión de la fase lag de crecimiento

μ_{max} , máxima velocidad de crecimiento específico

ÍNDICE

PREFACIO.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
RESUMEN.....	IV
ABSTRACT.....	V
FIRMA DE LAS DIRECTORAS.....	VI
NOMENCLATURA.....	VII
ÍNDICE.....	X

Capítulo 1

Introducción General, Fundamentación y Objetivos

1.1 INTRODUCCIÓN.....	2
1.2 ENOLOGÍA. EL VINO Y SU ELABORACIÓN.....	3
1.2.1 Elaboración del vino.....	5
1.3 FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA Y VINIFICACIÓN.....	7
1.3.1 Ecología de levaduras en las fermentaciones alcohólicas espontáneas.....	7
1.3.2 Levadura vínica <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
1.4 CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA. CULTIVOS INICIADORES.....	13
1.4.1 Cultivos iniciadores mixtos. Levaduras non- <i>Saccharomyces</i>	19
1.5 PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE LEVADURAS PARA USO ENOLÓGICO (LSA).....	22
1.5.1 Propagación de las células de levadura.....	23
1.5.1.1 El sustrato: Melazas.....	23
1.5.1.2 El proceso.....	24
1.5.1.3 Biorreactores.....	25
1.5.2 Deshidratación de la biomasa.....	26
1.6 FUNDAMENTACIÓN.....	28
1.7 OBJETIVOS DEL TRABAJO.....	30
1.8 BIBLIOGRAFIA.....	31

Capítulo 2

Diseño y Formulación del Medio de Cultivo

Bagazo de manzana como sustrato para la propagación de biomasa de levaduras de vino Patagónicas

2.1 INTRODUCCIÓN.....	43
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
2.2.1 MATERIA PRIMA.....	45
2.2.1.1 Bagazo de manzana.....	45
2.2.1.2 Melaza.....	45
2.2.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL BAGAZO DE MANZANA.....	45
2.2.2.1 Humedad.....	45
2.2.2.2 pH.....	46
2.2.2.3 Actividad acuosa (aw).....	46
2.2.2.4 Amonio.....	46
2.2.2.5 Nitrógeno Fácilmente Asimilable (FAN).....	46
2.2.2.6 Polifenoles.....	46

2.2.2.7 Azúcares Reductores Totales (ART).....	46
2.2.3 EXTRACTO DE BAGAZO DE MANZANA (EBM).....	47
2.2.4 MICROORGANISMOS.....	47
2.2.4.1 Levaduras.....	47
2.2.4.2 Banco de cepas de levadura.....	47
2.2.4.3 Reactivación de las cepas de levaduras.....	47
2.2.4.4 Determinación del crecimiento microbiano.....	48
2.2.5 DISEÑO ESTADÍSTICO EXPERIMENTAL (DEE).....	48
2.2.5.1 Modelo primario de crecimiento microbiano.....	48
2.2.5.2 Diseño Plackett Burman (DPB).....	48
2.2.5.3 Diseño Compuesto Central (DCC).....	50
2.2.5.4 Validación del modelo.....	51
2.2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	51
2.3 RESULTADOS.....	52
2.3.1 CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DEL BAGAZO DE MANZANA.....	52
2.3.2 DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO.....	53
2.3.2.1 Selección de variables (DPB).....	53
2.3.2.2 Optimización de las variables (DCC).....	54
2.3.2.3 Validación del modelo.....	57
2.4 DISCUSIÓN.....	60
2.5 BIBLIOGRAFÍA.....	62

Capítulo 3

Producción de Levaduras para Uso Enológico

Optimización del proceso de propagación de la biomasa y evaluación de su calidad

3.1 INTRODUCCIÓN.....	67
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	69
3.2.1 MICROORGANISMOS.....	69
3.2.1.1 Levaduras.....	69
3.2.1.2 Reactivación de las cepas de levaduras y preparación de los cultivos de trabajo.....	69
3.2.1.3 Identificación de levaduras y discriminación de cepas.....	70
3.2.2 PRODUCCIÓN DE BIOMASA A ESCALA DE PLANTA PILOTO.....	73
3.2.2.1 Biorreactor y accesorios.....	73
3.2.2.2 Esterilización de equipos y medios.....	73
3.2.2.3 Preparación de los inóculos.....	74
3.2.2.4 Ensayos de propagación de la biomasa (Fermentaciones).....	74
3.2.2.4.1 Ensayos iniciales (validación del medio de cultivo diseñado).....	74
3.2.2.4.2 Ensayos de optimización de las condiciones del cultivo a escala piloto.....	75
3.2.2.4.3 Ensayos de producción.....	76
3.2.3 DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO MICROBIANO.....	76
3.2.3.1 Concentración de levaduras. Absorbancia a 600 nm.....	76
3.2.3.2 Recuento de levaduras viables cultivables.....	76
3.2.3.3 Recuento de totales.....	77
3.2.4 DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE DUPLICACIÓN, DEL PESO SECO, DE LA PRODUCTIBILIDAD VOLUMÉTRICA Y DEL RENDIMIENTO.....	79
3.2.5 EVALUACIÓN DE LA CALIDAD TECNOLÓGICA Y ENOLÓGICA DE LA BIOMASA OBTENIDA.....	80
3.2.5.1 Vinificaciones.....	80
3.2.6 CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE MEDIOS DE CULTIVO Y VINOS.....	81

3.2.6.1	Determinación de la gravedad específica (°Bmé).....	81
3.2.6.2	Determinación de la concentración (°Bx).....	82
3.2.6.3	Determinación de pH (Método Potenciométrico).....	82
3.2.6.4	Nitrógeno Fácilmente Asimilable (FAN).....	82
3.2.6.5	Cuantificación de la trehalosa intracelular.....	82
3.2.6.6	Cuantificación de metabolitos en medios y vinos por HPLC.....	84
3.2.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	89
3.3	RESULTADOS.....	89
3.3.1	PROPAGACIÓN DE LA BIOMASA.....	89
3.3.2	OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DEL CULTIVO PARA LA PROPAGACIÓN DE LA BIOMASA DE LEVADURAS A ESCALA PILOTO.....	95
3.3.3	EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA, BIOQUÍMICA Y SANITARIA DE LA BIOMASA.....	104
3.3.4	EVALUACIÓN DE LA CALIDAD TECNOLÓGICA Y ENOLÓGICA DE LA BIOMASA.....	106
3.4	DISCUSIÓN.....	111
3.5	BIBLIOGRAFÍA.....	116

Capítulo 4

Producción de Levadura Seca Activa Propagada en Extracto de Bagazo de Manzana Evaluación de la factibilidad técnico-económica

4.1	IMPORTANCIA DEL PROYECTO.....	124
4.1.1	MISIÓN.....	124
4.1.2	VISIÓN.....	125
4.1.3	MERCADO.....	126
4.1.4	MARCA.....	126
4.1.5	ANÁLISIS FODA.....	127
4.1.5.1	Identificación de factores internos positivos y negativos.....	127
4.1.5.2	Identificación de factores externos positivos y negativos.....	127
4.1.5.3	Estrategias.....	128
4.2	FACTIBILIDAD TÉCNICA.....	130
4.2.1	PRODUCTO A ELABORAR.....	130
4.2.1.1	Levadura enológica en la forma de LSA.....	130
4.2.2	EL PROCESO PRODUCTIVO.....	131
4.2.2.1	Sustratos potenciales: bagazo de manzana, jugo de manzana y mosto.....	131
4.2.2.2	Recepción y pre-tratamiento del bagazo.....	131
4.2.2.3	Fermentación.....	131
4.2.2.4	Sistemas de separación, purificación, deshidratación y almacenamiento de la LSA.....	132
4.2.2.5	Disposición de los residuos.....	132
4.3	FACTIBILIDAD ECONÓMICA.....	134
4.3.1	ANÁLISIS DE COSTOS.....	134
4.3.1.1	Costos operativos del proyecto.....	134
4.3.1.1.1	COSTOS FIJOS.....	134
4.3.1.1.1.1	Costos de mano de obra.....	134
4.3.1.1.1.2	Costos por amortizaciones.....	134
4.3.1.1.2	COSTOS VARIABLES.....	135
4.3.1.1.2.1	Materia prima, insumos y servicios.....	136
4.3.2	PRECIO DE VENTA.....	136
4.4	ANÁLISIS FINANCIERO.....	137

4.4.1	CRITERIOS DE EVALUACIÓN VALOR ACTUAL NETO Y TASA INTERNA DE RETORNO.....	137
4.5	ANÁLISIS DE RIESGOS.....	139
4.5.1	IDENTIFICACIÓN DE RIESGOS Y PLANES DE CONTINGENCIA.....	139
4.5.2	ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD.....	141
4.6	BIBLIOGRAFÍA.....	142
CONCLUSIONES.....		144
PERSPECTIVAS.....		147

CAPÍTULO 1

Introducción General

Fundamentación

Objetivos

1.1 INTRODUCCIÓN

En el campo de la Tecnología de los Alimentos la fermentación constituye una herramienta valiosa para preservar los productos alimenticios frescos al extender su vida útil y salubridad. La fermentación es un proceso que utiliza la actividad metabólica de microorganismos denominados cultivos iniciadores (*starters* en inglés) para la estabilización de la materia prima y su biotransformación en un producto alimenticio. Dentro de los alimentos fermentados en cuya elaboración participan cultivos iniciadores se encuentran, entre otros, yogures, quesos, leches ácidas, muchos chacinados, pickles, pan, cerveza y vino.

Los cultivos iniciadores están constituidos principalmente por bacterias del ácido láctico (BAL) así como también por levaduras y hongos, los que mayoritariamente cumplen con los criterios de domesticación ya que su evolución estuvo dirigida por los humanos en un intento de satisfacer sus necesidades de producción de alimentos (Legras *et al.*, 2007; Douglas y Klaenhammer, 2010). La adaptación de los cultivos iniciadores a los diferentes nichos alimentarios estuvo acompañada por eventos que condujeron a una regresión o expansión del genoma (Douglas y Klaenhammer, 2010; Steensels *et al.*, 2019). Aunque los mecanismos de estos eventos genéticos difieren entre procariotas y eucariotas, en todos los casos condujeron la evolución hacia una mayor capacidad fermentativa, característica metabólica distintiva de los cultivos iniciadores (Mora *et al.*, 2013). Los productos orgánicos mayoritarios resultantes de este tipo de metabolismo, ácidos orgánicos o etanol, generan un medioambiente antimicrobiano el que, sumado al consumo de nutrientes por parte del cultivo iniciador, dificulta el crecimiento o la supervivencia de otros microorganismos en el alimento fermentado, contribuyendo a su estabilidad y salubridad. Por otra parte, el consumo prolongado y sin problemas de cultivos iniciadores permitió a la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) de Estados Unidos y a la Agencia de Seguridad Alimentaria de la Unión Europea (ESFA) otorgar a varios de ellos el estatus de "Generalmente considerado como seguros" (GRAS de sus siglas en inglés) y/o de "Presunción de seguridad calificada" (QPS de sus siglas en inglés), respectivamente (Papadimitriou *et al.*, 2015).

La generación de nuevos conocimientos provenientes de los campos de la genómica, transcriptómica y proteómica permitió a la tecnología de las fermentaciones evolucionar más allá de la conservación de alimentos y convertirse en una poderosa herramienta para crear atributos organolépticos, nutricionales y funcionales deseables y/o diferenciales en los productos alimenticios (Demirci *et al.*, 2014) y extender sus usos a procesos destinados a la conversión de residuos agroalimentarios en productos de alto valor como ingredientes alimentarios (Hugenholtz,

2013), biocombustibles y productos químicos industriales (Patinvoh y Taherzadeh, 2019; Oh y Jin, 2020), entre otros.

Finalmente, existen sectores industriales de elaboración de alimentos en los cuales los cultivos iniciadores son considerados parte de los insumos del proceso productivo y se conservan como reservas congeladas, para garantizar la consistencia del producto (Steensels *et al.*, 2019). Los ejemplos más significativos se presentan en el campo de la enología y la panadería donde los cultivos iniciadores de levaduras producidos por fábricas industriales a partir de estas reservas congeladas se comercializan como un insumo en la forma levadura seca y activa (LSA).

1.2 ENOLOGÍA. EL VINO Y SU ELABORACIÓN

La enología, que etimológicamente deriva del griego *oenos*, vino y *logos*, ciencia, es el conjunto de conocimientos relativos a la elaboración del vino.

El código Internacional de Prácticas Enológicas de la Oficina Internacional de la Vid y el Vino (OIV) establece como definición de base que “el vino es exclusivamente la bebida resultante de la fermentación alcohólica completa o parcial de uva fresca prensada o no, o del mosto de uva”. No obstante, existen algunos tipos de vinos cuyo contenido alcohólico excede al proveniente de la fermentación alcohólica (FA) (Figura 1.1). En este trabajo toda mención relativa al vino, excepto aclaración en contrario, se refiere exclusivamente a los vinos naturales y tranquilos, comúnmente denominados vinos “de mesa” o vinos genuinos según el Artículo 17 a) de la Ley 14.878 (Ley general de vinos de la República Argentina).

La transformación de la uva fresca prensada (mosto de uva) en vino o vinificación constituye uno de los procesos biotecnológicos más antiguos registrados en la historia de la humanidad. Estudios arqueológicos han permitido demostrar que las primeras vasijas de vino halladas en Irán proceden del año 6.000 AC (Mc Govern *et al.*, 2003) y en Egipto del 3.000 AC (Cavallieri *et al.*, 2003); a partir de entonces el cultivo de la vid y la producción de vino se expandieron al resto del mundo siguiendo a los humanos a lo largo de sus caminos de migración (Figura 1.2). (Jagtap *et al.*, 2017). Con una superficie cultivada con vid de calidad enológica de 7,4 billones de ha, una producción mundial de vinos de 292,3 millones de hL y un consumo de 246 millones de hL el mercado del vino generó en el 2018 un volumen de negocios por un valor de 31.300 millones de Euros, la cifra más elevada en la historia de la comercialización del vino (Roca, 2019).

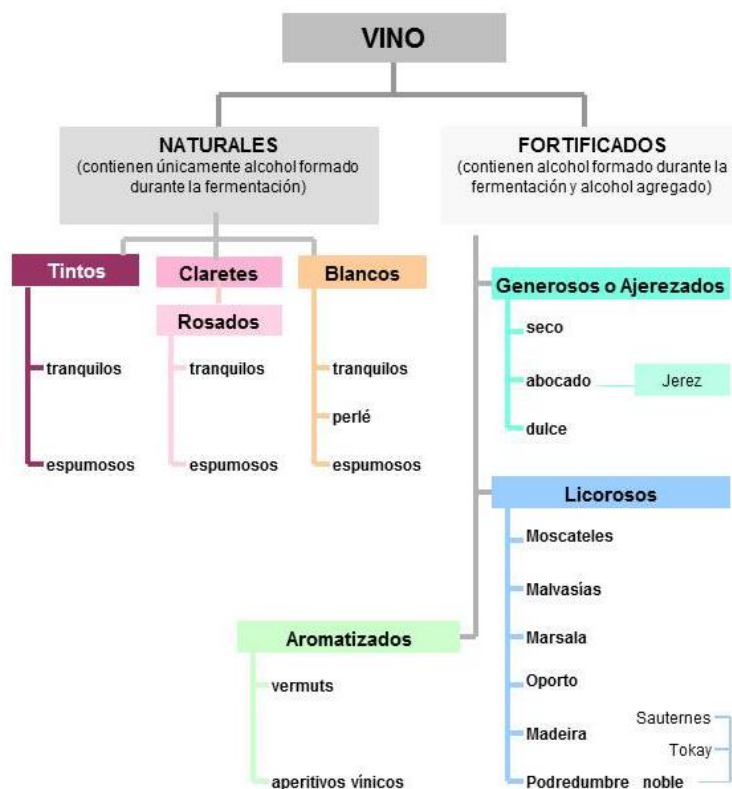


Figura 1.1: Diferentes tipos de vinos según el origen del alcohol que contienen. (Pretorius, 2000).



- | | | |
|---|---|--|
| 1 6.000-4.000 AC
Asia Menor
Cáucaso
Mesopotamia | 4 1.000 AC
Costa del Mediterráneo
Sur de Europa
Norte de África | 7 1.530-1.600
Méjico
Japón
Sudamérica |
| 2 5.000 AC
Egipto
Fenicia | 5 100 AC
Norte de India
China | 8 1.600-1.800
1659 Sudáfrica
1679 California
1813 Australia y
Nueva Zelanda |
| 3 2.000 AC
Grecia
Creta | 6 Nacimiento de Cristo
Balcanes
Norte de Europa | |

Figura 1.2: Migración de la vid y el vino en el tiempo (Tomada de Jagtap *et al.*, 2017).

1.2.1 Elaboración del vino

La producción de vino involucra procedimientos que han variado con el tiempo dependiendo de la zona geográfica, de la bodega y del estilo de vino que se desea producir, pero en todos los casos se comparten las operaciones básicas que se presentan en la Figura 1.3. (Pretorius, 2016), de las cuales por su importancia la etapa fermentativa resulta central.

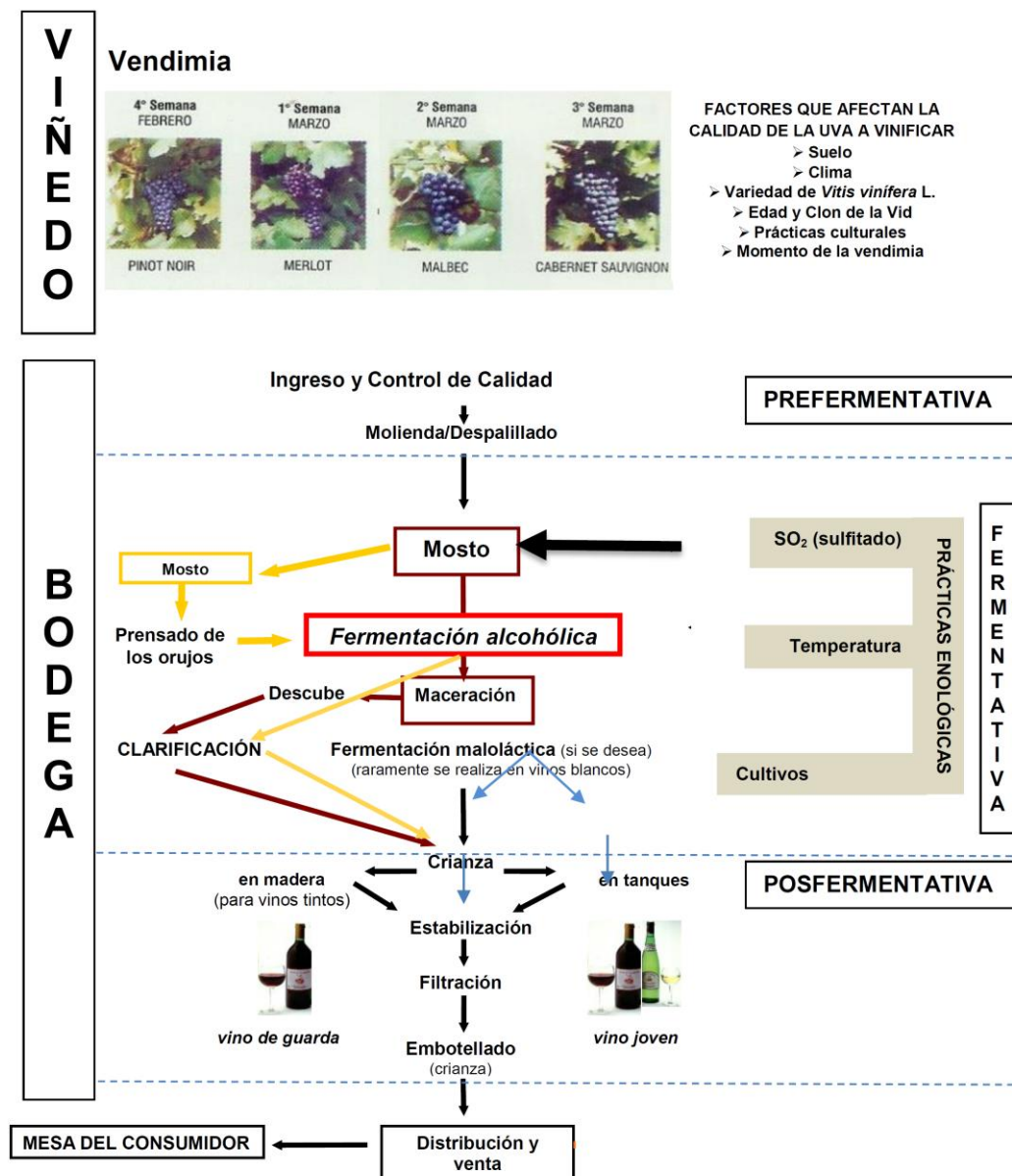


Figura 1.3: Elaboración del vino. Etapas y operaciones unitarias involucradas en vinificaciones en blanco (flechas amarillas), en tinto (flechas marrones) o en ambas (flechas negras), factores determinantes de la calidad de la uva y prácticas enológicas que afectan la microbiología de la vinificación. Arriba: variedades tintas que se vinifican mayoritariamente en la región del Comahue (Patagonia norte, Argentina) y momentos de sus vendimias.

Durante la etapa fermentativa transcurre el proceso de vinificación. La vinificación espontánea del mosto de uva, es un proceso ecológicamente muy complejo que involucra la interacción de diferentes especies e individuos pertenecientes a grupos microbianos muy heterogéneos como levaduras, hongos y bacterias (Tabla 1.1) y que proceden de la superficie de las bayas y de la bodega (Fleet, 2008; Barata *et al.*, 2012).

Tabla 1.1: Principales grupos microbianos relacionados con el proceso de vinificación y su significación en el mismo y en la calidad del vino

GRUPO MICROBIANO	SIGNIFICACIÓN	
Levaduras	• Conducen la fermentación alcohólica • Biocontrol de hongos filamentosos en las uvas (1,3-β-glucanasa, factor killer) • Responsables del aroma secundario o fermentativo de los vinos • Potenciación del aroma primario de los vinos • Aportes al cuerpo, sabor y color a través de metabolitos y/o por autólisis • Bioadsorción de componentes del mosto	• Contaminantes: • Producción de <i>off flavours</i> • Responsables de paradas (stuck) o retrasos (sluggish) de la fermentación • Influyen en el crecimiento de bacterias
Hongos Filamentosos	• Contribución específica en la producción de vinos botritizados o vinos de podredumbre noble (<i>Botrytis</i>)	• Contaminantes: • Producción de metabolitos y/o micotoxinas sobre la superficie de la baya que posteriormente alteran el crecimiento y ecología de las levaduras y bacterias durante y la salubridad del vino • Causa del gusto terroso (a tierra) de los vinos por desarrollo en las uvas, corchos y/o barricas
Bacterias Lácticas	• Fermentación maloláctica (deacidificación del vino)	• Contaminantes: • Potencial parada o retraso de la fermentación • Producción de aminas biógenas
Acéticas y otras (<i>Clostridio</i> , <i>Bacillus</i>)		• Contaminantes: deterioro de la calidad del vino

De todos estos grupos son las levaduras, *Saccharomyces cerevisiae* en particular, los microorganismos protagonistas del proceso por ser responsables de conducir la FA. La FA es la fermentación primaria de la vinificación, mediante la cual los azúcares del mosto se transforman mayoritariamente en etanol y dióxido de carbono (Chambers y Pretorius, 2010).

Adicionalmente, durante la vinificación tiene lugar un segundo proceso llevado a cabo por las BAL y que consiste en una decarboxilación particular del ácido L-málico para dar ácido L-láctico (Lerm *et al.*, 2010). Este bioproceso mal llamado fermentación maloláctica (FML) produce una

deacidificación del vino, es opcional y puede ocurrir una vez finalizada la FA o concomitantemente con ella (Bartowsky *et al.*, 2015).

Los compuestos derivados de la uva además de dar al vino su estructura básica le proporcionan su distinción varietal, mientras que los compuestos sintetizados *de novo* por las levaduras, y en menor grado por las BAL, durante la fermentación de los azúcares le otorgan su carácter vinoso y definen su estilo o carácter particular (Polaskova *et al.*, 2008; Styger *et al.*, 2011; Pretorius, 2016).

Un mercado cada vez más competitivo y con sobreoferta como actualmente es el del vino, obliga a los vitivinicultores a adaptar su producción a las preferencias de los consumidores. La calidad y atributos del vino son el resultado de un número casi infinito de variaciones en la producción, ya sea en el viñedo o en la bodega, como son, entre otros, ciertas prácticas enológicas que permiten el manejo del proceso fermentativo mediante el control de las condiciones ambientales o de su microbiota asociada (Figura 1.3) (Fleet y Heard, 1993; du Toit y Pretorius, 2000). En la actualidad la estrategia más utilizada para el control del proceso fermentativo es la inoculación del mosto con levaduras seleccionadas y producidas en la forma de LSA (cultivos iniciadores). El uso de cultivos iniciadores representa una oportunidad de bajo costo para ampliar el espectro de perfiles/estilos de vino posibles a partir de los mismos viñedos o variedades (Cordente *et al.*, 2012; Pretorius, 2016), para lo que resulta esencial conocer la ecología y fisiología de las levaduras involucradas en el proceso fermentativo.

1.3 FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA Y VINIFICACIÓN

La fermentación alcohólica es el proceso central de la vinificación llevado a cabo por las levaduras. Durante la FA las levaduras obtienen energía para su desarrollo y mantenimiento mediante la transformación de los azúcares del mosto en etanol, CO₂ y otro conjunto de metabolitos primarios y secundarios que impactan sobre las propiedades sensoriales del vino (Figura 1.4) (Swiegers *et al.*, 2005; Pretorius, 2016; Dzialo *et al.*, 2017).

En 1863 Luis Pasteur fue el primero en establecer que la levadura es el catalizador primario de la vinificación. Actualmente, de los 149 géneros y aproximadamente 1.500 especies de levaduras conocidas (Kurtzman *et al.*, 2011) más de 40 han sido aisladas de mostos de uva mostrando, *a priori*, la complejidad ecológica de la vinificación, un entorno/medio ambiente altamente estresante y en permanente cambio (Jolly *et al.*, 2014; Andorrá *et al.*, 2019; Pretorius, 2020).

1.3.1 Ecología de levaduras en las fermentaciones alcohólicas espontáneas

En las fermentaciones espontáneas existe un patrón de crecimiento progresivo de cepas de levaduras autóctonas (también denominadas levaduras naturales, silvestres o salvajes) con un

dominio inicial de especies diferentes de *S. cerevisiae* y colectivamente denominadas non-*Saccharomyces* y con las etapas finales siempre dominadas por cepas de la especie Crabtree-positiva y tolerantes al alcohol, *S. cerevisiae* (Muñoz *et al.*, 2005; Fleet, 2008; Jolly *et al.*, 2014; Bisson y Walker, 2015). Esta especie conocida como la levadura del vino o levadura vínica es la responsable de completar el proceso fermentativo.

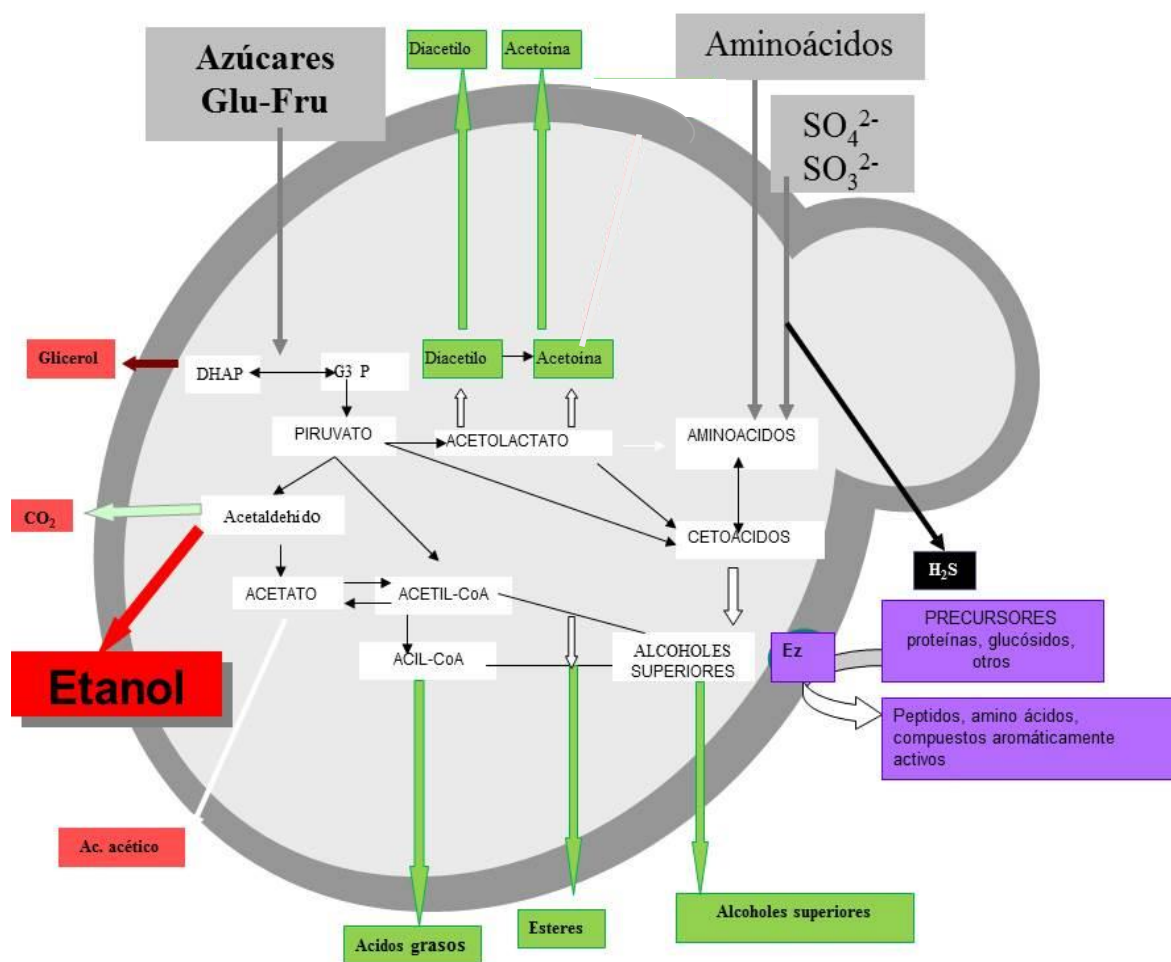


Figura 1.4: Fermentación alcohólica. En rojo están señalados los metabolitos primarios (concentraciones en el orden de los g L⁻¹), en verde los metabolitos secundarios (concentraciones en el orden de los mg L⁻¹ o menores) provenientes estrictamente de la fermentación, en violeta los metabolitos derivados por transformación enzimática de precursores presentes en el mosto y en negro el metabolito indeseable (Apablaza, 2006).

Las levaduras asociadas a la FA durante la vinificación del mosto de uva pueden tener dos orígenes: la uva o el ambiente de la bodega (aire y superficies).

La uva sana y madura prensada asépticamente rinde un mosto que no es estéril y contiene una población de levaduras totales de aproximadamente 10^3 - 10^5 UFC mL⁻¹, aunque el número de

especies diferentes será limitado. Estudios realizados utilizando métodos clásicos (morfológica y fisiología) y moleculares dependientes de cultivos así como métodos moleculares independientes de cultivos y técnicas de secuenciación de última generación (NGS) permitieron demostrar que además de *Hanseniaspora uvarum* y su forma imperfecta, *Kloeckera apiculata* (la especie de levadura históricamente considerada como representativa de la superficie de la uva) especies pertenecientes a los géneros *Issatchenkia*, *Pichia*, *Metschnikowia*, *Rhodotorula*, *Lachancea*, *Cryptococcus*, *Filobasidiella*, *Sporobolomyces*, y *Torulaspora*, se encuentran asociadas a las superficies de las uvas en porcentajes significativos y transferidas al proceso fermentativo (Tristezza *et al.*, 2013; Bokulich *et al.*, 2014; David *et al.*, 2014; Taylor *et al.*, 2014; Pinto *et al.*, 2015; Setati *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015 y; Kecskeméti *et al.*, 2016; Del Mónaco *et al.*, 2016a; De Filippis *et al.*, 2017).

El uso de NGS también permitió demostrar la influencia significativa que las prácticas de manejo de la viña (pero no del suelo), factores ambientales particulares /propios de la región vitivinícola, así como factores específicos de la variedad de uva, influyen en la configuración del microbioma asociado a la uva y sobre su comportamiento posterior en la fermentación del mosto (Gilbert *et al.*, 2014; Grangeteau *et al.*, 2017), sugiriéndose que la comunidad microbiana asociada con vides, levaduras en particular, exhiben diferenciación regional (Bokulich *et al.*, 2014, 2016a, b; Taylor *et al.*, 2014; Pinto *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015). Tal diferenciación regional se ha atribuido al dominio de unas pocas especies por región (Bokulich *et al.*, 2014, Pinto *et al.*, 2015). Adicionalmente estas nuevas metodologías han permitido detectar especies de los géneros *Kazachstania*, *Malassezia*, *Schizosaccharomyces* y *Debaryomyces*, presentes en muy baja frecuencia (David *et al.*, 2014; Pinto *et al.*, 2015; Setati *et al.*, 2015; Grangeteau *et al.*, 2017) y que individuos de *Hanseniaspora spp.* permanecen hasta el final de la fermentación (Wang *et al.*, 2015). No obstante, y de manera similar a lo observado con métodos dependientes del cultivo las tecnologías NGS también han mostrado que *S. cerevisiae* rara vez se encuentra en mosto de uva recién preparado (Morgan *et al.*, 2017).

El origen de *S. cerevisiae* en el proceso fermentativo es controvertido existiendo dos hipótesis. La primera sostiene que las uvas dañadas (por hongos, exceso de agua, pájaros, insectos, etc.) sirven de "depósito" para microorganismos, entre los que se incluye *S. cerevisiae*, y que por tanto, estas uvas son la principal fuente de levaduras en las fermentaciones espontáneas. Estos microorganismos llegarían a las uvas portadas por vectores, principalmente insectos (Mortimer y Polsinelli, 1999). La segunda hipótesis propone que *S. cerevisiae* procede del ambiente de bodega (aire, superficies del equipamiento de bodega: bombas, tuberías, depósitos de fermentación, etc.), aunque no descarta una presencia minoritaria de *S. cerevisiae* en las uvas (Martini, 1993; Fleet y

Heard, 1993; Vaughan-Martini y Martini, 1995). Estudios ecológicos realizados en ambientes de bodega han demostrado que si bien *S. cerevisiae* es la especie prevalente, otras especies pertenecientes a los géneros *Candida*, *Pichia*, *Hansenula* y *Brettanomyces* (y su forma perfecta *Dekkera*) también son significativas (Belin, 1979; Rosini, 1984; Sangorrín *et al.*, 2007; Pérez-Martín *et al.*, 2014; Jolly, 2014; Del Mónaco *et al.*, 2016b).

La inclusión de técnicas moleculares en los estudios ecológicos demostró que, adicionalmente, existe una gran diversidad de individuos (cepas) dentro de las poblaciones indígenas de *S. cerevisiae* y de otras especies de levaduras asociadas al proceso, que muchas propiedades de interés enológico son cepa-dependientes (Querol y Ramón, 1996; Zapparoli *et al.*, 2000; Pretorius, 2000; Rodríguez *et al.*, 2005; Lopes *et al.*, 2006; Renault *et al.*, 2009; Chambers y Pretorius, 2010; Bozouli y Tsaltas, 2016; Del Mónaco *et al.*, 2016a) y que estas particularidades metabólicas están determinadas genéticamente (Borneman *et al.*, 2013; Pretorius, 2020).

También quedó demostrado que sólo unas pocas cepas nativas de *S. cerevisiae* son capaces de dominar las fases finales de la fermentación y de permanecer en la bodega durante vendimias consecutivas, apoyando la hipótesis de su origen en ambiente de bodega (Bozoudi y Tsaltas, 2016; Del Mónaco *et al.*, 2016a), y que cepas de *S. cerevisiae* aisladas de diferentes bodegas ubicadas en la misma región presentan un alto grado de similitud permitiendo inferir una relación entre cepas y región enológica (Vigentini *et al.*, 2015). El aislamiento geográfico o ecológico es uno de los mecanismos involucrados en la diferenciación de especies ya que es un obstáculo para el flujo genético. Por lo tanto, las cepas originarias del mismo microambiente serán más parecidas entre sí que con aquellos de otros orígenes geográficos (Martínez *et al.*, 2007). Estos hallazgos abonan el concepto de *terroir* microbiano.

En este contexto, las fermentaciones espontáneas, cuando resultan exitosas, suelen rendir grandes vinos (equilibrados, armónicos y de gran complejidad aromática) (Capozzi *et al.*, 2015), no obstante, numerosos factores afectan la calidad y extensión de la biota indígena de levaduras y en consecuencia la calidad del vino, que resulta variable entre lotes y entre vendimias (Pretorius, 2000; Swiegers *et al.*, 2005; Fleet, 2007; Pretorius, 2016). La selección y el empleo de microorganismos autóctonos propios del *terroir*, para conducir la vinificación se presenta como un poderoso instrumento para mejorar las características organolépticas y sensoriales del vino producido en su propia región habilitando a certificaciones de calidad que agregan valor al producto.

1.3.2 Levadura vínica *Saccharomyces cerevisiae*

Debido a su predominancia en las fermentaciones vínicas otorgada por su elevado poder fermentativo y resistencia al etanol, *S. cerevisiae* es considerada la levadura vínica por excelencia.

S. cerevisiae es un hongo unicelular en cuyo ciclo de vida sus células vegetativas, de forma elipsoidal a globosa (Figura 1.5), pueden alternar entre dos formas según su contenido de ADN: una haploide (un juego completo de cromosomas) y otra diploide (dos juegos completos de cromosomas). Ambas formas se reproducen de forma asexual por gemación multipolar (Figura 1.5). En condiciones muy determinadas las formas diploide o con número par de cromosomas son capaces de reproducirse sexualmente. En estos casos se produce la meiosis en la célula formándose un asca que contiene cuatro ascosporas haploides (Figura 1.5). Los individuos haploides contienen aproximadamente 12-13 Mb de ADN nuclear distribuido en 16 cromosomas lineales cuyos tamaños varían entre 250 y 2.000 Kb (Querol *et al.*, 2003).

Mientras la mayor parte de las cepas de *S. cerevisiae* de laboratorio son haploides o diploides, las cepas industriales de esta especie suelen ser diploides, aneuploides o poliploides (Codón y Benítez, 1995; Steensels *et al.*, 2019). La aneuploidía o poliploidía confiere ventajas para adaptarse a condiciones ambientales variables y en el incremento del dosaje de genes importantes para la fermentación (Salmon, 1997; Querol *et al.*, 2003).

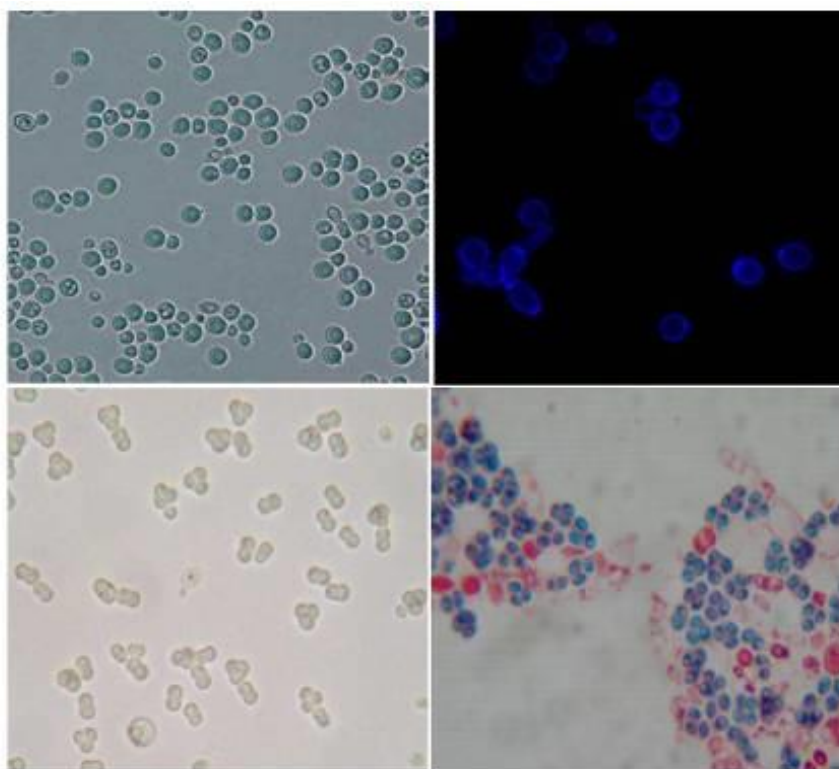


Figura 1.5: Arriba: Preparados en fresco de células vegetativas de *S. cerevisiae* visualizados por microscopía de campo claro (izquierda) y microscopía de fluorescencia con blanco de calcofluor (derecha). Abajo: cultivo esporulado de *S. cerevisiae* visualizados por microscopía de campo claro en fresco, (izquierda) y previa tinción especial para ascosporas (verde de malaquita). En todas las micrografías el aumento es 400x. Extraído de Apablaza *et al.*, 2016.

Por otra parte, las cepas vínicas halladas en los viñedos y bodegas son homotálicas; tras la esporulación las formas haploides pueden cambiar de tipo sexual y conjugar rápidamente con células de la misma colonia produciendo células diploides completamente homocigotas. De esta forma, cepas que acumulan mutaciones recesivas en heterocigosis pueden pasar a ser diploides homocigotas favoreciendo la selección o la eliminación de alelos recesivos beneficiosos o deletéreos, respectivamente (Barrio *et al.*, 2006; Mortimer *et al.*, 1994; Steensels *et al.*, 2014). Este proceso conocido como “renovación genómica” permite a las levaduras vínicas una rápida adaptación a las condiciones cambiantes del medio. Esta adaptación también puede deberse a otros mecanismos presentes en las levaduras vínicas, como son las mutaciones espontáneas, la translocación cromosómica promovida por elementos transponible TE (Rachidi *et al.*, 1999) y la conversión génica (Puig *et al.*, 2000), entre otras, que explican también el alto grado de polimorfismo cromosómico/diversidad intraespecífica de *S. cerevisiae*. Durante las últimas dos décadas, y con el objetivo de entender procesos biológicos y evolutivos, esta diversidad de *S. cerevisiae* se estudió extensamente (Cubillos, 2016).

Desde el punto de vista de sus requerimientos nutricionales, *S. cerevisiae* es un organismo heterótrofo quimiorganótrofo anaerobio facultativo porque obtiene la energía a partir de moléculas orgánicas, como la glucosa y otros hidratos de carbono, tanto en ausencia (fermentación) como en presencia de oxígeno (respiración); estos compuestos a su vez también les sirven como fuente de carbono (Gancedo y Serrano, 1989; Kurtzman *et al.*, 2011). Una de las características fisiológicas/metabólicas más destacadas *S. cerevisiae*, que comparte con otras *Saccharomyces spp.* y *Brettanomyces spp.* es su capacidad para convertir rápidamente azúcares en etanol y dióxido de carbono tanto en condiciones anaeróbicas como aeróbicas. En condiciones aeróbicas, la respiración es posible con oxígeno como el receptor de electrones final, pero *S. cerevisiae* exhibe la fermentación alcohólica hasta que la concentración del azúcar alcanza un nivel muy bajo. Este fenómeno se llama efecto Crabtree (De Deken, 1966). Esta característica metabólica y su tolerancia al etanol representan una herramienta poderosa para competir con otros microorganismos (Steensels *et al.*, 2019) y transforma a *S. cerevisiae* en la especie protagonista del proceso de vinificación y a *Brettanomyces bruxellensis* en un potencial y muy peligroso contaminante del vino. Adicionalmente, *S. cerevisiae* también pueden catabolizar eficientemente el etanol por lo que su fisiología/metabolismo se denominada “hacer-acumular-consumir” (etanol) (Dashko *et al.*, 2014).

El fenómeno killer es otra característica genética importante de *S. cerevisiae* que podría otorgarle ventajas competitivas y se basa en la capacidad para producir y secretar toxinas

(zimocinas) que son letales para cepas sensibles de la misma especie, en las cepas aisladas en mosto predominan las de tipo K2 y K28 que presentan una actividad máxima a pH bajos (Pretorius, 2000).

S. cerevisiae es también uno de los modelos más adecuados para el estudio de problemas biológicos en eucariotas debido a que comparte muchas de las ventajas técnicas de los procariotas (bacterias) como son: rápido crecimiento (bajo condiciones de cultivo óptimas duplica su masa cada 90 minutos), dispersión de las células y la facilidad con que se replican cultivos y aíslan mutantes, un sencillo y versátil sistema de transformación de ADN, entre otros (Chambers y Pretorius, 2010).

Por otro lado, la ausencia de patogenicidad permite clasificar a esta levadura como un microorganismo GRAS posibilitando su manipulación con las mínimas precauciones. Como organismo modelo eucariótico *S. cerevisiae* permitió la generación de conocimientos en los campos de la genética, biología molecular y de sistemas, e ingeniería genética de relevancia en la investigación básica y aplicada (Karathia *et al.*, 2011), muchos de los cuales permitieron desarrollos innovadores en el campo de la industria. Así, *S. cerevisiae* fue la primera célula huésped para la producción a escala industrial de una vacuna recombinante contra la hepatitis B y una enzima recombinante de grado alimentario, quimosina, que se utiliza en el procesamiento de queso (Pretorius, 2016), el primer microorganismo eucariota en tener su genoma secuenciado (Goffeau *et al.*, 1996), y usado para construir una colección sistemática de mutantes de delección de genes con código de barras (Winzler *et al.*, 1999; Giaever *et al.*, 2002).

Actualmente se cuenta con las secuencias genómicas completas, en borrador o sin procesar de más de 80 cepas de *S. cerevisiae* (Borneman y Pretorius, 2015). También una cepa de laboratorio de *S. cerevisiae* se convirtió en la primera célula eucariota en estar equipada con un cromosoma sintético completamente funcional (Annaluru, 2014), representando un gran avance en la biología sintética. Este trabajo pionero también despertó el interés en desarrollar el proyecto Genoma de levadura sintética (Sc2.0) tendiente a sintetizar los 16 cromosomas de *S. cerevisiae* S288c. Aunque aún queda mucho trabajo por delante para alcanzar las metas del proyecto, el primer borrador de los 16 cromosomas sintéticos ya está completo (Pretorius, 2020). Se espera que la disponibilidad del genoma de *S. cerevisiae* totalmente sintético permita conocer aspectos fundamentales de la biología (Chi *et al.*, 2019) así como también promover el desarrollo de nuevas cepas adaptadas a diversas industrias, incluidas las de los alimentos (Jagtap *et al.*, 2017).

1.4 CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA. LOS CULTIVOS INICIADORES

La consecuencia práctica del conocimiento generado en el campo de la ecología microbiana de la vinificación, descrita previamente, fue el desarrollo de cultivos iniciadores de la FA.

Los cultivos iniciadores son cultivos puros de cepas de levaduras especialmente seleccionadas por sus propiedades adecuadas para uso en enología que se comercializan bajo la forma de levadura seca activa (LSA) (Figura 1.6) y que previa rehidratación se adicionan al mosto fresco en altas densidades celulares con el fin de normalizar la biota asociada al proceso fermentativo.



Figura 1.6: Cultivos iniciadores comerciales importados *Saccharomyces cerevisiae* F15. Empresa (Laffort). Francia.

El primer cultivo iniciador de levadura seleccionada reportado en la literatura data de 1890, cuando Müller-Thurgau introdujo esta tecnología adaptando las técnicas desarrolladas por Christian Hansen para la cervecería Carlsberg (Padilla *et al.*, 2016) pero fue en la década del '60 del siglo pasado con la producción en la forma de LSA que esta práctica se instaló en la industria vitivinícola.

La inoculación del mosto de uva con cultivos se justifica porque aporta una serie de ventajas al proceso de vinificación y al producto, cuando se compara con la fermentación espontánea, entre las que se destacan: inicio y desarrollo de la fermentación más rápidos, disminución del riesgo de ocurrencia de sucesos problemáticos para el sector productivo como detenciones prematuras de la fermentación, fermentaciones retrasadas o contaminación microbiana de los mostos, entre otros, menor acidez volátil y productos con calidad más uniforme entre diferentes lotes y vendimias (Pretorius, 2000; Alves *et al.*, 2015).

S. cerevisiae es la especie que centró la mayor atención para el desarrollo de cultivos iniciadores en la industria del vino debido a sus particulares características metabólicas ya descritas (Albergaria y Arneborg, 2016). Esta levadura es capaz de catalizar rápida, completa y eficientemente la transformación de los azúcares del mosto en etanol y dióxido de carbono y otros metabolitos primarios y secundarios, sin la generación de *off flavors* (aromas y sabores desagradables) (Pretorius, 2016). Mientras el dominio de *S. cerevisiae* en la fermentación es esperado y deseado (Jolly *et al.*, 2014; Capece *et al.*, 2016) los criterios históricos de selección de cepas se basaron en propiedades estrictamente relacionadas con el perfil fermentativo primario de los azúcares (Figura 1.7) y la tolerancia a las condiciones de estrés impuestas por el mosto/vino (Tabla 1.2).

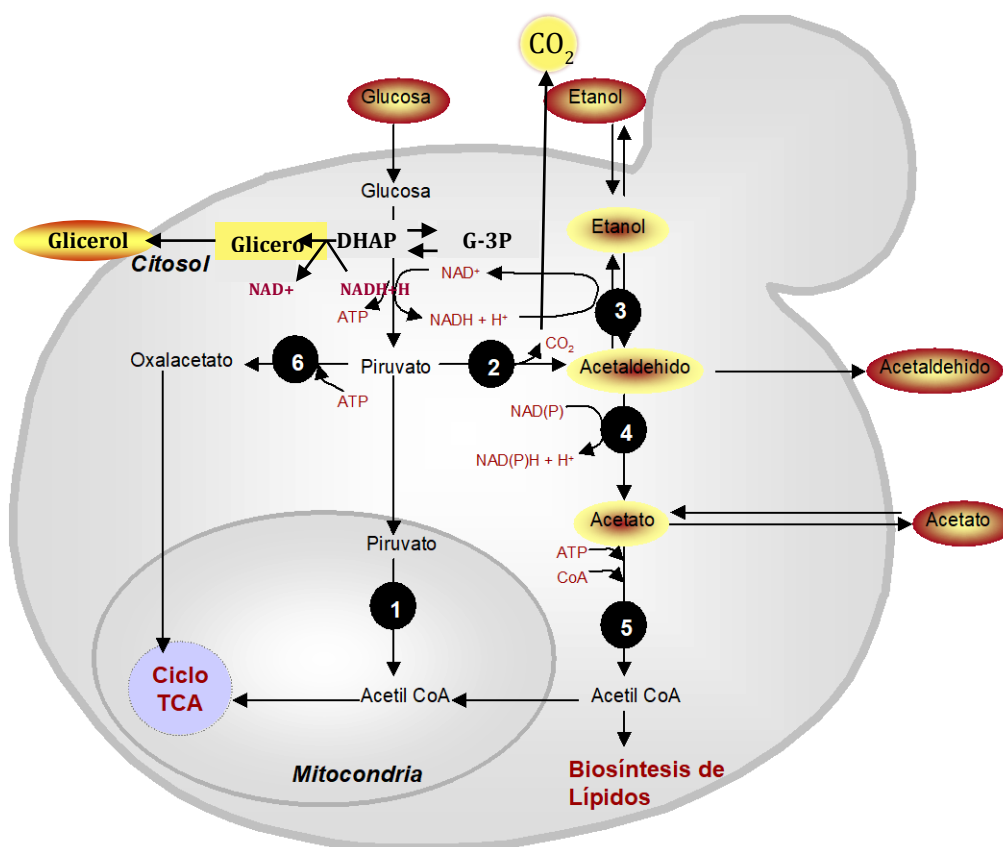


Figura 1.7: Fermentación alcohólica. Metabolismo primario: productos, balance redox y enzimas intervinientes en *S. cerevisiae* 1, complejo piruvato deshidrogenasa; 2, piruvato decarboxilasa (Pdc1, Pdc5 y Pdc6); 3, alcohol deshidrogenasa (Adh1 y Adh2); 4, acetaldehído deshidrogenasa (Ald2 y Ald6); 5, acetil-CoA sintetasa; 6, piruvato carboxilasa (Pyc1 y Pyc2) lo indicado entre paréntesis indica las diferentes isoenzimas descritas en *S. cerevisiae*. DHAP: dihidroxiacetona fosfato; G3P: gliceraldehído-3-fosfato; NAD⁺/NADH+H⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido formas oxidada/reducida; ATP: adenosina trifosfato. CoA: coenzima A. Ciclo TCA: ciclo de los ácidos tricarboxílicos o ciclo de Krebs. Extraída de Lopes 2004, con modificaciones según Dzialo *et al.*, 2017.

Tabla 1.2: Criterios de selección de cepas de levaduras destinadas a vinificación

Criterios históricos	Nuevos criterios	
✓ Alto poder fermentativo ✓ Adecuado comportamiento cinético a las temperaturas de vinificación	✓ Que impactan sobre el color del vino	Formación de pigmentos estables (vitisinas y pirano antocianinas vinilfenólicas) Escasa o nula capacidad de absorber antocianinas por la pared celular
✓ Baja producción de ácido acético ✓ Incapacidad de producir “off flavors” ✓ Osmotolerancia ✓ Tolerancia al SO₂	✓ Que impactan sobre el aroma del vino	Adecuada producción de compuestos volátiles (ésteres y alcoholes superiores) Actividad β-glucosidasa
✓ Tolerancia al Cu ✓ Baja demanda de FAN (nitrógeno fácilmente asimilable)	✓ Que impactan sobre la estructura/cuerpo del vino	Producción de polialcoholes (glicerol, 2,3-butanodiol) Liberación de polisacáridos y proteínas a partir de la pared celular
	✓ Otras propiedades	Fructofilia, Capacidad de degradar ácido málico

Actualmente estos criterios se han ampliado a la búsqueda de cepas con propiedades que también impacten sobre aspectos sensoriales del vino (Tabla 1.2), en particular aquellas que, por la importancia que este atributo tiene, impactan sobre el aroma como ésteres y alcoholes superiores (Figura 1.8 y 1.9) (Suárez Lepe y Morata, 2011).

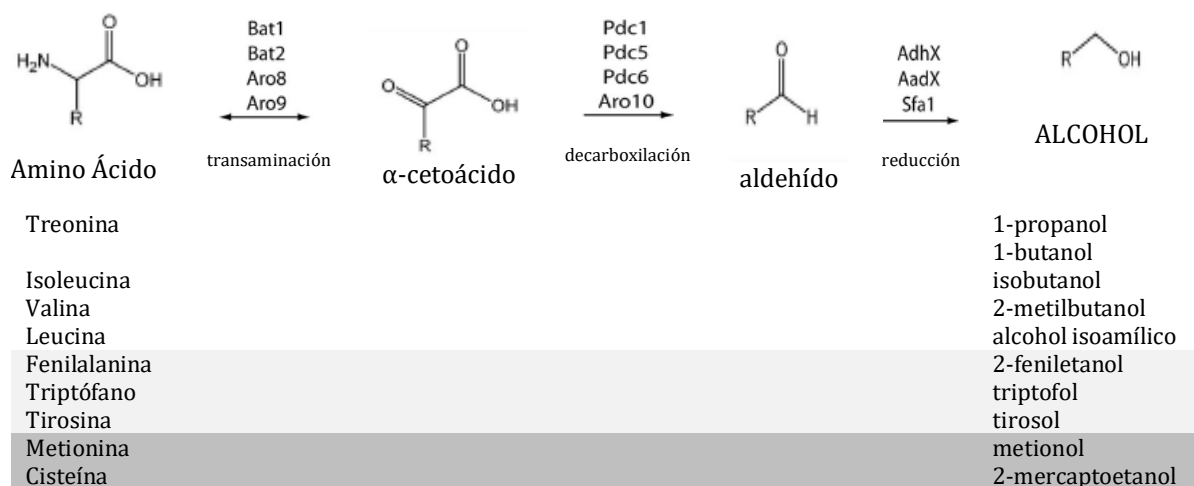


Figura 1.8: Alcoholes superiores. Vía de Ehrlich. La reducción puede ser llevada a cabo por más de 10 enzimas diferentes que difieren en su localización, regulación y sustratos específicos. AdhX: alcohol deshidrogenasas (Adh 1 a Adh7); AadX: aril alcohol deshidrogenasas (Aad3, Aad4, Aad6, Aad10 y Aad14 a 16). Gris claro: compuestos aromáticos; gris oscuro: compuestos azufrados.

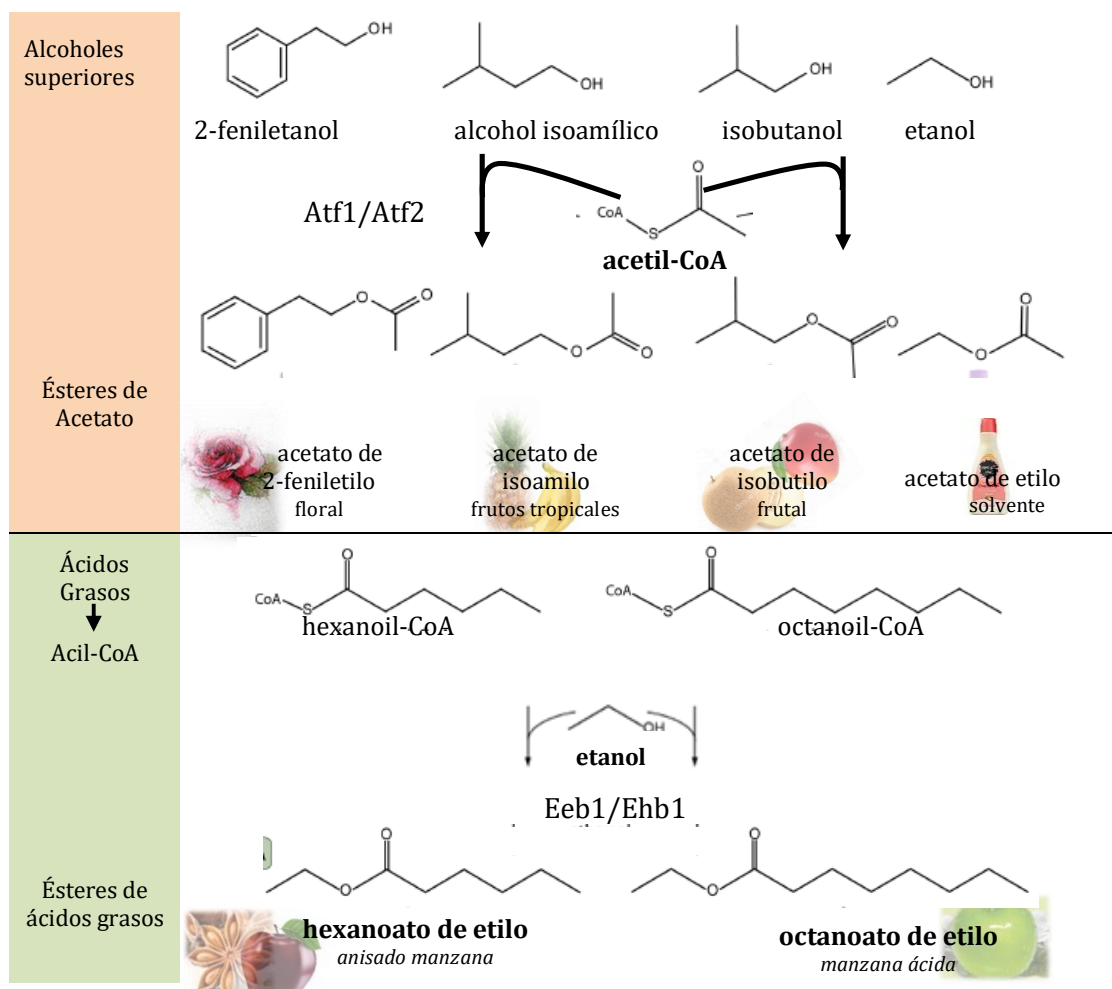


Figura 1.9: Síntesis de ésteres en levaduras. Aft 1 y Atf 2: actividades alcohol acetil transferasas, Eeb1 y Ehb1: actividades etil alcohol aciltransferasas. En *itálicas* los descriptores aromáticos. CoA: Coenzima A (Extraída de Dzialo *et al.*, 2017).

En la Tabla 1.3 se muestran las principales propiedades enológicas de algunas de las más de cien levaduras de vino *S. cerevisiae* disponibles comercialmente y la elección del enólogo podría tener un efecto significativo en la calidad del vino (Chambers y Pretorius, 2010). Sin embargo, muchos enólogos sostienen que el uso exclusivo de *S. cerevisiae* resulta en una falta de complejidad organoléptica de los vinos en comparación con fermentaciones espontáneas exitosas (Whitener *et al.*, 2015), contribuyendo así a un mayor interés por el papel de levaduras non-*Saccharomyces* en vinificación (Jolly *et al.*, 2014; Whitener *et al.*, 2015). Sin embargo, la mayoría de las levaduras non-*Saccharomyces*, por su menor poder fermentativo, no pueden fermentar el mosto a sequedad, debiendo inocularse en cultivos adjuntos de *Saccharomyces* en la forma de cultivos iniciadores mixtos (Whitener *et al.*, 2015; Capozzi *et al.*, 2017).

Tabla 1.3: Propiedades enológicas de algunos de los cultivos iniciadores comerciales de *S. cerevisiae* disponibles en el mercado (Extraída de Petruzzi *et al.*, 2017 con modificaciones)

Nombre Comercial	Propiedades de interés enológico	Proveedor
Merit™	Para vinos con alto contenido alcohólico (16 % vol) o 2ª FA en vinos espumantes	Chr. Hansen (Hørsholm, Dinamarca)
Actiflore ^R BO213	Muy alta tolerancia al etanol (18 % vol), carácter neutro y baja producción de SO ₂ . Adaptada a bajas temperaturas. Recomendada para reiniciar FAs detenidas	Laffort (Bordeaux, Francia)
WE372	Fermentación a baja temperatura	Anchor Yeast (Eppindust, Sudáfrica)
Fermivin ^R PDM	Vinos espumantes (1ª o 2ª FA)	DSM (Heanor, Inglaterra)
Levuline ^R BRG ^R Yseo ^R	Sobreproducción de manoproteínas	OenoFrance (Reims, Francia)
Vitilevure ^R MT ^R YSEO ^R	Preservación del color rojo en el vino	Martin Vialatte (Reims, Francia)
Lalvin C ^R Cross Evolution	Exalta el carácter varietal	Lallemand (Montreal, QC, Canadá)
Premier Cuvée	Tolerancia al etanol y al SO ₂ Secado del mosto	Red Star (Milwaukee, WI, Estados Unidos)
AW4	Muy aromático Especial para Gewurztraminer y recomendado para Sauvignon y Semillon	Vintner's Harvest (Saskatoon, Canadá)
Oenoferm R F3 Rouge	Preserva el color. Vinos tintos con pronunciado carácter frutal	Erbslöh (Geisenheim, Alemania)
SafOEno™ STG S101	Aromas frutales y florales. Recomendado en maceración carbónica, termovinificación y rosados. Vinos con final fresco	Fermentis (Marcq en Baroeul, Francia)
GV2	Para vinos con buen cuerpo. Rápidos inicio y fermentación. Baja espuma	Muntions (Suffolk, Inglaterra)
WLP730	Ligera producción de ésteres, baja producción de SO ₂ , exalta aroma varietal	White Labs (San Diego, CA, Estados Unidos)
4946	Capacidades fermentativas robustas tolerancia etanol, reinicio de FA detenidas. Ideal para Zinfandel, Pinot Noir, Syrah	Wyeast (Hood River, Estados Unidos)
Ferm D20	Para elaboración de vinos añejados. Tolerante a altas temperaturas, promueve extracción de fenoles, reduce notas verdes, intensidad y complejidad aromática	Enartis (Windsor, CA, Estados Unidos)
Blastosel FR95	Perfiles aromáticos ricos y complejos (frutales, notas a rosas)	Perdomini (Verona, Italia)
Zymaflore ^R F15	Para vinos tintos aromáticos, redondos y estructurados. Importante producción de glicerol. Valoriza potencial polifenólico del vino Exalta expresión varietal	Laffort (Burdeos, Francia)

1.4.1 Cultivos iniciadores mixtos. Levaduras non-*Saccharomyces*

El mercado mundial del vino está experimentando un creciente interés en nuevas cepas de levadura que pueden producir vinos únicos con propiedades novedosas (Mylona *et al.*, 2016). La calidad organoléptica de los vinos jóvenes, como los que mayoritariamente se producen en Patagonia depende de la variedad de uva y de las características metabólicas de las levaduras participantes en la fermentación alcohólica. Estas características organolépticas pueden ser significativamente mejoradas en bodega mediante diversas prácticas como pueden ser la elección de la cepa de levadura, la adición de nutrientes, la oxigenación y la temperatura de fermentación (Hernández-Orte *et al.*, 2006). Numerosos estudios se han centrado en la co-fermentación de mostos con *S. cerevisiae* y otras especies de levaduras non-*Saccharomyces* para intervenir en el equilibrio organoléptico final del vino (Jolly *et al.*, 2014; Petruzzi *et al.*, 2017).

El uso de cultivos iniciadores mixtos se propuso a mediados del siglo pasado para corregir la acidez volátil de vinos italianos utilizando una cepa de *Torulaspora delbrueckii* (Castelli, 1955, 1969). Ya en este siglo cepas pertenecientes a esta misma especie (Bely *et al.*, 2008) y a las especies *Candida zemplinina* (Rantsiou *et al.*, 2012), *Candida stellata* (Ferraro *et al.*, 2000) *Hanseniaspora uvarum* (Tristezza *et al.*, 2016) se ensayaron como cultivos adjuntos de *S. cerevisiae* para reducir la acidez volátil del vino. Uno de los mayores beneficios del uso de levaduras non-*Saccharomyces* como cultivos iniciadores es su capacidad de mejorar la calidad y complejidad aromática de los vinos (Comitini *et al.*, 2011; Tronchoni *et al.*, 2017), característica sensorial determinante a la hora de seleccionar un vino por parte de los consumidores.

Las levaduras non-*Saccharomyces* pueden mejorar el aroma del vino por diferentes vías, por su propia capacidad metabólica de producir metabolitos volátiles aromáticamente activos como alcoholes superiores y ésteres, o a través de la producción de enzimas extracelulares capaces transformar precursores inodoros presentes en el mosto en compuestos aromáticamente activos. Cepas de distintas especies de *Hanseniaspora* (*H. uvarum*, *H. vineae* y *H. guilliermondii*) y de *T. delbrueckii* han resultado de elección para mejorar el aroma de los vinos. Las primeras por sus capacidades para producir ésteres (Viana *et al.*, 2008; Medina *et al.*, 2013; Leixa *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016) y *T. delbrueckii* por su gran capacidad de producción de actividades enzimáticas extracelulares (Maturano *et al.*, 2012). Renault *et al.*, (2015) demostraron que la actividad β -glucosidasa producida por una cepa de esta especie exalta el aroma del vino mediante un aumento en las concentraciones de norisoprenoides, terpenos, y lactonas por hidrólisis de sus precursores. Aumentos similares de terpenos (α -terpineol y linalool) se observaron en vinos Gewurztraminer inoculados con esta especie (Cus y Jenko, 2013). Cepas de *Debaryomyces pseudopolymorphus* y

Debaryomyces vanriji también incrementaron las concentraciones de los terpenos citronellol, nerol, y geraniol (Cordero-Otero *et al.*, 2003) y geraniol (Garcia *et al.*, 2002) en co-fermentaciones de mostos Chardonnay y Moscato de Frontignan, respectivamente. En ambos casos el cultivo iniciador primario fue *S. cerevisiae*. Además, se ha propuesto el uso de levaduras non-*Saccharomyces* para mejorar el contenido de glicerol, manoproteínas, la estabilidad del color (Tronchoni *et al.*, 2017), para reducir el nivel de etanol en los vinos (Rossouw y Bauer, 2016) y facilitar el secado del mosto por su carácter fructofílico (Masneuf-Pomarede *et al.*, 2015; Englezos *et al.*, 2016). Sin embargo, la mayoría de las levaduras non-*Saccharomyces* no pueden fermentar a sequedad los mostos de uva, por lo que *S. cerevisiae* también debe inocularse en forma simultánea (co-inoculación) o secuencial (Whitener *et al.*, 2016). Ambas estrategias han dado resultados positivos y aunque muchas de ellas ya están comercializándose (Tabla 1.4) las modalidades de aplicación de estos cultivos deben ser todavía desarrolladas en función de los efectos finales buscados y de las características de las cepas involucradas, aunque en todos los casos los efectos de las levaduras non-*Saccharomyces* en la fermentación y la calidad del vino dependen estrictamente de la relación de inóculos *Saccharomyces*/non-*Saccharomyces* (Comitini *et al.*, 2011).

Adicionalmente, cepas de levaduras non-*Saccharomyces* pertenecientes a especies de los géneros *Schizosaccharomyces* (Viljoen *et al.*, 1994; Viljoen *et al.*, 1999; Thornton y Rodríguez, 1996), *Zygosaccharomyces* (Baranowski y Radler, 1984) y *Pichia* (*Issatchenkia*) (Okuma *et al.*, 1986; Clemente-Jimenez *et al.*, 2004; Seo *et al.*, 2007; Hong *et al.*, 2010) con capacidad de degradar el ácido málico se han propuesto como alternativa a los iniciadores de fermentación maloláctica constituidos por bacterias lácticas para la deacidificación de vinos (Kim *et al.*, 2008). El contenido de ácido L (-) málico, directamente relacionado con el cociente respiratorio de las bayas, es mayor en los mostos de uva de regiones más frías (Ribereau-Gayon *et al.*, 2003), constituyendo en la región de Comahue el 60 % de la acidez titulable en mostos tintos (Caballero *et al.*, 2005).

Trabajos previos realizados a escala de laboratorio y piloto, permitieron demostrar la capacidad de una cepa indígena de *Pichia kudriavzevii*, de degradar ácido málico (del Mónaco *et al.*, 2014a). La propagación de la biomasa de esta cepa indígena, perteneciente a una especie representativa del *terroir* Patagónico como es *P. kudriavzevii* (del Mónaco *et al.*, 2016b) con el fin de producirla a escala industrial forma parte del trabajo experimental de esta Tesis. Cultivos iniciadores mixtos constituidos por esta cepa y cepas de *S. cerevisiae* también autóctonas de la región (del Mónaco *et al.*, 2014b) además de respetar el ecosistema propio del *terroir* Patagónico, serían capaces de emular ciertos rasgos enológicos ventajosos de los vinos elaborados por fermentaciones espontáneas/naturales exitosas (Capozzi *et al.*, 2015).

Tabla 1.4: Cultivos comerciales de levaduras vínicas non-*Saccharomyces* (Extraída de Petruzzi *et al.*, 2017)

Nombre comercial	Especie	Propiedades de interés enológico	Proveedor
Biodiva™	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Potencia el aroma y la complejidad en boca en vinos blancos y tintos	Lallemand
Zymaflore ^R Alpha TD	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Alta complejidad organoléptica	Laffort
Prelude™	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Incrementa el cuerpo y estructura	Chr. Hansen
Oenoferm ^R wild & pure [HR23]	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Textura cremosa con sensación en boca agradable y perdurable	Erbslöh
WLP603	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Complejidad aromática y característica a frutos frescos. >Baja producción de ácidos volátiles, fenoles volátiles y acetato de etilo	Vintner's Harvest
Concerto™	<i>Lachancea thermotolerans</i>	Producción de ácido láctico; vinos con acidez balanceada y redondos. Sugerido para zonas cálidas	Chr. Hansen
Melody™	<i>Lachancea thermotolerans</i> , <i>Torulaspora delbrueckii</i> and <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Incrementa complejidad del vino, intensidad aromática afrutada (frutos tropicales) y paladar balanceado, redondo	Chr. Hansen
Flavia ^R	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Potencia el aroma varietal, aromas terpénicos y a tiales	Lallemand
Gaia™	<i>Metschnikowia fructicola</i>	Dominancia durante el macerado en frío, protección natural contra microorganismos contaminantes. Reduce el agregado de SO ₂ en la molienda	Perdomini
WLP605	<i>Pichia kluyveri</i>	Aroma floral, a rosas, contribuyendo positivamente al bouquet del vino	Vintner's Harvest
FrootZen ^R	<i>Pichia kluyveri</i>	Potencia el aroma varietal y de tiales	Chr. Hansen

1.5 PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE LEVADURAS PARA USO ENOLÓGICO. LEVADURA SECA ACTIVA (LSA)

La producción industrial de levaduras vínicas (Chen y Chiger, 1985; Degre, 1993; González *et al.*, 2005) para su uso como cultivos iniciadores del proceso de vinificación no difiere en gran medida de la producción de levaduras panaderas, al menos en las dos primeras etapas, el mantenimiento de los cultivos puros y su propagación, lo que explica que fueran estas empresas las primeras en comercializarlas a principios de los años 60. En esos primeros años el producto final tenía las mismas características que la levadura prensada de panadería, pero debido al uso estacional de las levaduras vínicas, fue necesario desarrollar nuevas formas de conservación, como es el secado, dando lugar a un producto más estable como es la LSA.

Esta tecnología de preservación tiene que alcanzar cuatro objetivos:

(i) Viabilidad. El número de células viables debe ser máximo después de la preservación, ya que cada pérdida en el número de células viables significa un número mayor de lotes de fermentación costosos en energía.

(ii) Vitalidad. Medida de la actividad metabólica relacionada con la robustez del cultivo (Rodríguez Porrata *et al.*, 2008).

(iii) Estabilidad de almacenamiento. El tercer atributo de calidad importante es la estabilidad de almacenamiento. Como los cultivos se distribuyen en todo el mundo, deben soportar condiciones adversas durante el transporte. Además, deben conservar su viabilidad y vitalidad durante el almacenamiento, preferiblemente a temperaturas ambiente (no refrigeradas).

(iv) Manipulación. Dependiendo de la tecnología de conservación, el manejo de la concentración celular debe ser fácil y, en caso de polvo, la rehidratación debe ser rápida. El polvo no debe ser propenso a apelmazarse y debe ser fácil de repartir.

Las operaciones unitarias clave del proceso de producción de los cultivos (Figura 1.10), se describen a continuación.

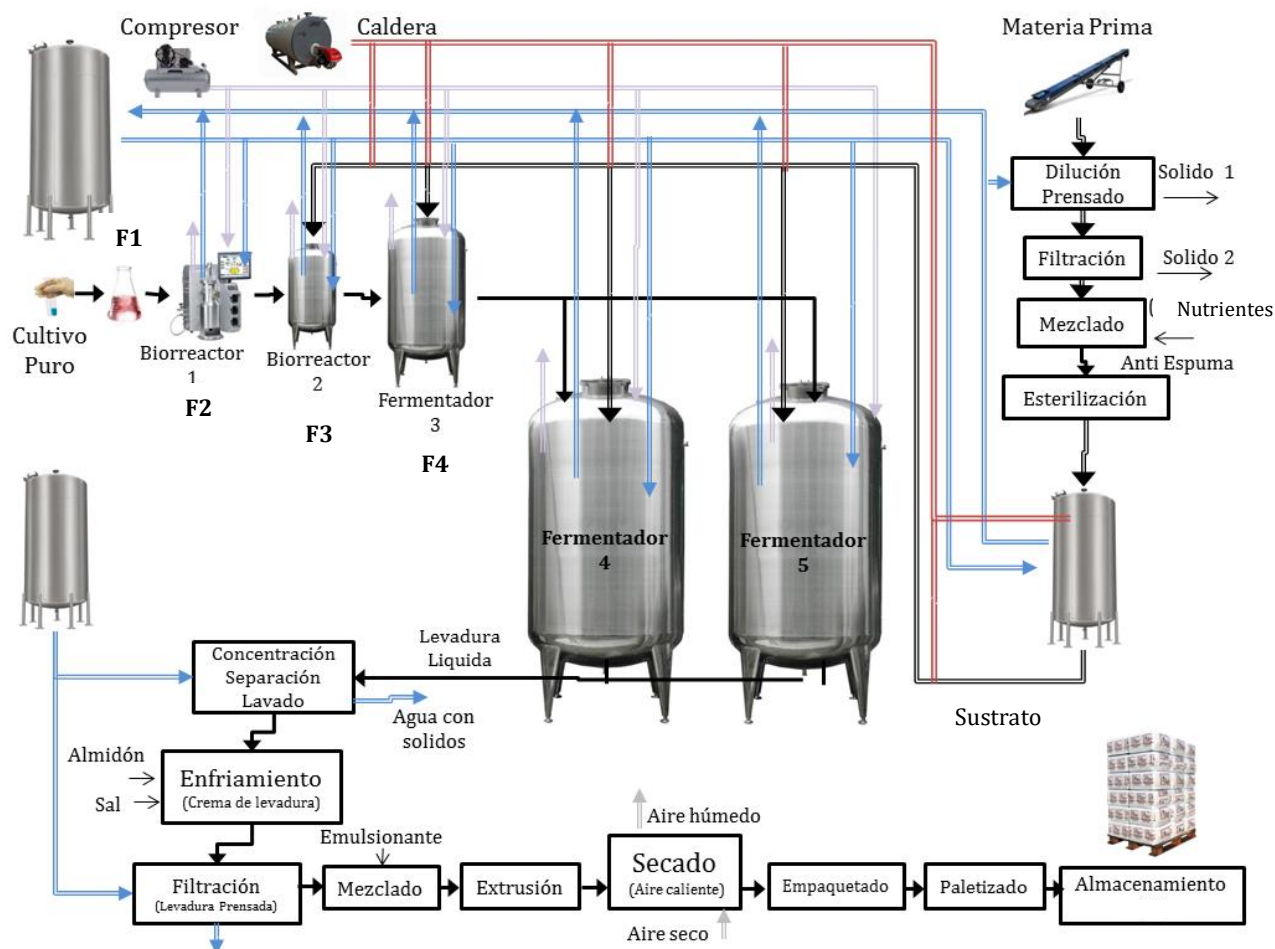


Figura 1.10: Esquema del proceso industrial de obtención de Levadura Seca Activa. Fuente propia.

1.5.1 Propagación de las células de levadura

1.5.1.1 El sustrato: Melazas

La melaza de remolacha o caña es el principal sustrato utilizado en las plantas de producción de levadura. Estos materiales se seleccionaron por dos razones: primero, las levaduras crecen bien utilizando los azúcares presentes en las melazas y, segundo, son económicamente interesantes, ya que son un producto de desecho que provienen de las refinerías de azúcar. Normalmente, las melazas contienen entre 65 y 75 % m/m de azúcares, principalmente sacarosa (Hongisto y Laakso, 1978) pero la composición es muy variable dependiendo del procedimiento de refinación de sacarosa y de las condiciones climáticas de ese año en particular. Las levaduras hidrolizan la sacarosa de forma extracelular en dos monosacáridos, glucosa y fructosa, que se transportan e incorporan al metabolismo de la levadura como fuentes de carbono. Sin embargo, la melaza es deficiente en otros elementos esenciales para el crecimiento de la levadura. Uno de ellos es el nitrógeno, como su contenido en la melaza es muy pobre (menos del 3 % m/m), por lo que es

necesario agregar fuentes de nitrógeno, generalmente en forma de sales de amonio o urea. Los elementos de magnesio y fosfato también se complementan en forma de sal. Finalmente, deben complementarse tres vitaminas (biotina, tiamina y ácido pantoténico), requeridas para un crecimiento rápido, ya que su contenido en las melazas también es muy bajo (Oura, 1974; Woehrer y Roehr, 1981). Otro aspecto negativo de la utilización de melaza como sustrato para producir levaduras es la presencia de diferentes tóxicos que pueden afectar el crecimiento de éstas. Cantidades variables de herbicidas, insecticidas, fungicidas, fertilizantes y metales pesados aplicados a los cultivos de remolacha o caña se pueden encontrar en las melazas, además, de bactericidas que se agregan durante la producción de azúcar en las plantas de refinería (Reed y Nagodawithana, 1988). Todos estos tóxicos pueden disminuir el rendimiento de la levadura al inhibir el crecimiento (Pérez-Torrado, 2004). De hecho, una práctica común en las plantas de levadura es mezclar diferentes stocks para diluir posibles tóxicos.

1.5.1.2 El proceso

La propagación de las células de levadura o producción de biomasa se inicia a partir de un crecimiento del cultivo puro a escala de laboratorio (F1 en la Figura 1.10) (Degre, 1993; Pérez-Torrado, 2004) y comprende dos etapas posteriores, la etapa *batch* y la *fed batch*.

Etapas de producción *batch*. A partir de este cultivo (F1) se inocula el primero de una secuencia de fermentadores donde se va escalando y aumentando el volumen hasta lograr la cantidad de biomasa deseada (F2-F4) (Figura 1.10). Estas primeras fermentaciones se realizan en condiciones *batch*. En este tipo de cultivo todos los componentes se añaden desde el principio y no se renuevan y las células se cultivan con agitación y aireación controlada. La provisión de oxígeno resulta fundamental para la síntesis de lípidos, ácidos grasos insaturados y esteroides, constituyentes de la membrana celular (Daum *et al.*, 1998; Boulton, 2000) y paradójicamente, disminuir el estrés oxidativo endógeno (Boulton, 2000; Pérez Torrado *et al.*, 2009). Durante la etapa *batch* y debido el efecto Crabtree ya descrito (ver ítem 1.3.2) la levadura puede presentar un metabolismo respiratorio fermentativo con producción de etanol. La presencia de oxígeno permite que, consumida la fuente de C primaria del medio, la levadura oxide al etanol pasando a un metabolismo francamente respiratorio, típico de la fase *fed-batch*. La biomasa producida es utilizada como inóculo para la siguiente etapa de producción o fase *fed-batch*.

Etapas de producción *fed-Batch*. En esta etapa de la propagación (fermentadores 4 y 5 en la Figura 1.10), el suministro de la fuente carbonada, se hace de forma controlada a lo largo del proceso, favoreciendo el metabolismo respiratorio que permite obtener un gran rendimiento en biomasa, ya que la oxidación de la glucosa vía respiratoria tiene un rendimiento energético por mol

de azúcar consumido mayor que el obtenido mediante el metabolismo fermentativo. Al final del primer cultivo en *fed-batch*, las células pueden ser recogidas, lavadas y centrifugadas, la crema resultante es almacenada a 2-4 °C hasta su uso como inóculo de la siguiente fermentación.

Una adecuada aireación durante la propagación de la biomasa en condiciones de *fed-batch* es fundamental para alcanzar un buen rendimiento y calidad del producto. La disponibilidad de oxígeno es imprescindible para el consumo del azúcar a través de la respiración y minimizar el proceso fermentativo. También como ya se señaló, es necesaria para la síntesis de ácidos grasos insaturados y esteroides, principalmente ergosterol ya que la carencia de estos compuestos afecta a la estructura y función de la membrana plasmática, limitando la capacidad de las levaduras para fermentar el mosto, principalmente debido a la reducción de la tolerancia al etanol (Degre, 1993; Aranda *et al.*, 2005; González *et al.*, 2005). Otro aspecto crítico es la velocidad de alimentación. Para evitar el metabolismo fermentativo es necesario que la concentración de glucosa no supere 0,1-0,5 mg L⁻¹. Por encima de este umbral, aún en presencia de oxígeno, parte del azúcar se destina a la producción de etanol (efecto Crabtree). Los elevados niveles de glucosa disparan respuestas celulares como el efecto Crabtree, cuyos mecanismos moleculares todavía están en discusión (Rosas Lemus *et al.*, 2018), y otro tipo de respuestas metabólicas mediadas por la denominada vía de las ras/AMPC/PKA (Verstrepen *et al.* 2007) que favorecen el metabolismo fermentativo al respiratorio con producción de etanol.

Finalmente, concluida la obtención de biomasa, durante unas horas (2 h o más) se lleva a cabo la etapa de maduración. Se mantiene el cultivo sin alimentar asegurando que los sustratos sean totalmente consumidos y las células terminen de dividirse entrando en fase estacionaria (Jorgensen *et al.*, 2002). Esta etapa es importante para que la biomasa obtenida tenga activos sus mecanismos de respuesta al estrés y acumule metabolitos de reserva (glucógeno) y de protección (trehalosa) (François y Parrou, 2001), para enfrentar satisfactoriamente el proceso de secado y mantener una adecuada capacidad fermentativa tras la rehidratación.

1.5.1.3 Biorreactores

El biorreactor, es sin duda, uno de los equipos fundamentales de la microbiología industrial. Es el recipiente donde se realiza el cultivo, y su diseño debe ser tal que asegure un ambiente uniforme y adecuado para los microorganismos. El biorreactor debe:

- Minimizar cualquier gradiente térmico mediante un eficiente mezclado y transferencia de calor hacia el dispositivo de intercambio, tendiendo a lograr un nivel constante y homogéneo de temperatura en la operación.
- Minimizar los gradientes de concentración de nutrientes.

- Mantener las células uniformemente distribuidas en todo el volumen de cultivo a fin de prevenir la sedimentación o la flotación.
- Suministrar oxígeno a una velocidad tal que satisfaga el consumo.
- El diseño debe ser tal que permita mantener el cultivo puro, una vez que todo el sistema ha sido esterilizado y posteriormente sembrado con el microorganismo deseado.

Para satisfacer los cuatro primeros puntos es necesario que el biorreactor esté provisto de un sistema de agitación, además se requiere de un sistema que inyecte aire en el cultivo. La agitación se realiza mecánicamente mediante un eje provisto de turbinas accionado por un motor. En un biorreactor típico, el aire se inyecta por la parte inferior del tanque y es distribuido por una corona que posee pequeños orificios espaciados regularmente. El chorro de aire que sale de cada orificio es "golpeado" por las paletas de la turbina inferior generándose de este modo miles de pequeñas burbujas de aire, desde las cuales difunde el O_2 hacia el seno del líquido. La velocidad de transferencia de O_2 , (RO_2), desde el seno de la fase gaseosa (burbujas) hasta la fase líquida depende del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (KLa) y la fuerza impulsora entre la concentración de O_2 disuelto en el seno del líquido ($mg\ L^{-1}$) y la concentración de O_2 disuelto que estaría en equilibrio con la presión parcial de oxígeno de la fase gaseosa ($mg\ L^{-1}$). El KLa es una medida de la capacidad que posee un biorreactor para suministrar O_2 y el rango de valores usuales está comprendido entre $50\ h^{-1}$ y $1.000\ h^{-1}$.

El sistema de agitación se completa con cuatro o seis deflectores que tienen por finalidad cortar o romper el movimiento circular que imprimen las turbinas al líquido, generando de este modo mayor turbulencia y mejor mezclado. El aire que ingresa al biorreactor debe estar estéril, lo que se consigue haciéndolo pasar por un filtro cuyo diámetro de poro es de 0,2 micrones, que impide el paso de microorganismos.

El tanque está rodeado por una camisa por la que circula agua, lo que permite controlar la temperatura. Para tanques mayores que 1.000 ó 2.000 litros, este sistema ya no es eficiente y es reemplazado por un serpentín que circula adyacente a la pared interior del tanque. Debe tenerse en cuenta que a medida que es mayor el volumen de cultivo también lo es la cantidad de calor generado, por lo que se hace necesario una mayor área de refrigeración. Los tanques son de acero inoxidable y están pulidos a fin de facilitar la limpieza y posterior esterilización.

1.5.2 Deshidratación de la biomasa

La levadura líquida obtenida tras la fermentación comercial es lavada hasta obtener una crema de levadura libre de melaza, su pH ajustado a 3,5 para evitar contaminaciones por otros microorganismos y almacenada a $4\ ^\circ C$. (Figura 1.10). Luego la crema es filtrada en filtros rotativos al

vacío o filtros prensa hasta conseguir una pasta con un 30-35 % m/m de materia seca. Inmediatamente la levadura filtrada se mezcla con emulsionantes y la pasta formada se divide mediante extrusión a través de un plato perforado, en finos filamentos que facilitarán el posterior secado. El secado se realiza en un lecho fluidizado por medio de aire caliente hasta obtener una materia seca con menos de un 8 % m/m de humedad residual. Este deshidratador hace circular aire caliente de forma continua a través de la masa permitiendo una rápida pérdida del agua y evitando que la temperatura de la levadura exceda una temperatura determinada, normalmente 35 °C a 41 °C, a lo largo del secado. La duración del proceso puede variar entre 15 y 60 min dependiendo del volumen de materia a secar y las condiciones empleadas. Finalmente, la levadura seca activa es empaquetada al vacío, en presencia de CO₂, con el fin de reducir la oxidación del producto. Se estima que la pérdida de viabilidad es entre el 10 % y el 25 % por año a 20 °C, por lo que los productores recomiendan su almacenamiento a 4 °C y en un ambiente seco durante un máximo tres años.

La deshidratación es una operación clave en el proceso de producción de LSA ya que la respuesta al deshidratado depende significativamente del estado metabólico de la célula al momento de la remoción del agua (Potts, 2001) y tiene consecuencias directas sobre la recuperación de las células al momento de la rehidratación (Rodríguez-Porrata *et al.*, 2008). La deshidratación causa un rápido eflujo de agua a través de la membrana celular que conduce al colapso del citoesqueleto (Rodríguez-Porrata *et al.*, 2008). El deshidratado puede afectar negativamente la fisiología de la célula a través de alterar la fisiología y funcionalidad de las vacuolas y la integridad y funcionalidad de las membranas celulares, incluida la nuclear (Walker y van Dijck, 2006) e incrementar la fuga de nucleótidos, iones y otros componentes celulares solubles (Rapoport *et al.*, 1995). Para afrontar el deshidratado, la levadura debe almacenar durante la etapa de propagación, metabolitos de reserva y protección, glucógeno y trehalosa, respectivamente. (François y Parrou, 2001).

1.6 FUNDAMENTACIÓN

En la región de la Norpatagonia, la producción petrolera es la actividad económica primaria de la provincia de Neuquén mientras que, en la provincia de Río Negro desde la mitad del siglo XX ese lugar lo ha ocupado la fruticultura. Actualmente, en ambas provincias aparece la necesidad de diversificar sus economías mediante la promoción de otras actividades que no sean únicamente las energéticas y basadas en el petróleo o en la producción primaria de frutas, de manera de incorporar nuevos actores al sector productivo y/o reinsertar aquellos que han quedado afuera debido a la profunda crisis estructural que desde hace unos años atraviesa a la fruticultura.

Con una fuerte tradición vitivinícola otorgada por los inmigrantes italianos y españoles que se radicaron en la provincia a fines del siglo XIX principios del XX y condiciones agroecológicas favorables para el desarrollo de una viticultura, de calidad enológica (Le Guillou, 2000), Río Negro fue pionera en la producción de vinos de excelente calidad en el siglo pasado (Witkowsky, 2019). Lamentablemente, en el transcurso de los años '70 la profunda crisis que atravesó la vitivinicultura nacional, de la que la región no estuvo exenta, terminó prácticamente con todos los viñedos y bodegas de la región. Quedaron unas pocas bodegas en pie, entre ellas el Establecimiento Humberto Canale S.A, actualmente una de las pocas bodegas nacionales que conserva sus dueños originales (Witkowsky, 2019). Esta crisis estuvo determinada por cambios en el mercado del sector que dejó de estar dirigido por la producción, para pasar a estarlo por el mercado. Por otra parte, la importancia de la vitivinicultura como actividad productiva para el desarrollo regional también es reconocida en la década de los '90 por la provincia de Neuquén, cuando, después de realizar los estudios pertinentes para promover la diversificación económica, hace inversiones estatales para el desarrollo de una vitivinicultura de calidad en lo que era históricamente la estepa Patagónica y que hoy constituye el valle productivo de San Patricio de El Chañar (Llorente y Casazza, 2005). Los vinos de esta zona presentan excelente calidad y han ganado importantes nichos de mercado. En este contexto, con una producción mundial de vinos de mesa de 292,3 mil millones de hectolitros en el 2018, que implica un volumen de negocios de aproximadamente 2.340,5 mil millones de pesos (Roca, 2019) y la Argentina posicionada 5ª productora (14,5 millones de hL), 9ª consumidora (8,4 millones de hL, el mercado interno es uno de los mercados más grandes del mundo) y 10ª exportadora (2,8 millones de hL) (Roca, 2019), queda claro que la vitivinicultura resulta una actividad económica relevante al momento de plantear la diversificación productiva de la Patagonia Norte, en particular de la región del Comahue.

La región del Comahue, ubicada a los 40° de latitud sur, con una producción de 130 mil hL (1 % de la producción nacional, extraído de las estadísticas del INV 2019), es la región vitivinícola

más austral de la Argentina. La elaboración de vinos se orienta principalmente hacia los vinos tintos, jóvenes y secos (80 %) mayoritariamente de la variedad Malbec (61%) así como también Merlot (21%) y Pinot Noir (15%), dos variedades que han encontrado en esta región las condiciones óptimas para su plena expresión enológica (Avagnina y Catania, 2011b).

Sin embargo, las exigencias de un mercado internacional cada vez más competitivo y con sobre oferta, la demanda de los consumidores por nuevos estilos de vinos que ofrezcan una placentera y reconocible experiencia sensorial y una mejor relación calidad/precio y la necesidad de recuperar el mercado interno, imponen a los vitivinicultores regionales nuevos desafíos que requieren de innovación tecnológica. Dentro de la cadena productiva, la gestión adecuada de la biota de levaduras responsable de realizar la fermentación alcohólica a través del uso de levaduras autóctonas de la propia región, una práctica muy extendida en el mundo vitivinícola actual, resulta estratégica para diferenciar el carácter de vino (Rainieri y Pretorius, 2000). Existe evidencia que las levaduras locales son más competitivas que las comerciales por estar mejor adaptadas a las características ecológicas y tecnológicas de su propia zona (Querol y Ramón, 1996; Lopes *et al.*, 2007; Del Mónaco *et al.*, 2014b). Así, capaces de dominar la fermentación se convierten en el agente biológico más importante responsable de la elaboración del vino (Degre, 1993; Arévalo-Villena *et al.*, 2017). La selección adecuada de levaduras autóctonas y su uso permite la producción de vinos de alta gama, el mantenimiento de las propiedades diferenciales de su propia zona y la preservación de su biodiversidad natural (Fleet, 2008; Bozoudi y Tsalta, 2016). El uso de cultivos iniciadores propios de cada área vitivinícola es una práctica enológica generalizada con el objetivo de conferir carácter diferencial al vino y tender a certificaciones de calidad (Fleet, 2008; Tufariello *et al.*, 2014; Alves *et al.*, 2015). Los cultivos comerciales de la fermentación alcohólica que actualmente se encuentran en el mercado están compuestos por cepas de levaduras aisladas de las zonas vitivinícolas más importantes del mundo. Los estudios microbiológicos realizados desde el año 1993 en la región Patagónica, permitieron caracterizar la biota asociada a viñedos, bodegas y entornos de vinificación (del Mónaco *et al.*, 2016a) y constituir una importante colección de cepas locales de *Saccharomyces* y non-*Saccharomyces*, algunas de las cuales como *S. cerevisiae* F8 y *P. kudriavzevii* 15, presentan propiedades adecuadas para su uso como cultivos iniciadores en enología (del Mónaco *et al.*, 2014 a y b) en la forma de LSA.

En este contexto, este trabajo de tesis propone la producción de LSA de estas levaduras utilizando bagazo de manzana como un sustrato alternativo a la melaza de caña para la propagación de la biomasa.

Es de interés resaltar que el bagazo de manzanas es un subproducto del proceso de elaboración de jugos de escaso o nulo valor y que, por los volúmenes que se generan durante el proceso de producción de los jugos, en particular de los jugos exprimidos, puede llegar a convertirse en un pasivo ambiental de importancia para la empresa productora.

1.7 OBJETIVOS DEL TRABAJO

Generales

1. Desarrollar cultivos iniciadores formulados a partir de cepas de levaduras indígenas de la Patagonia para su comercialización y uso en la elaboración de vinos de calidad controlada y diferencial.
2. Sustituir insumos importados (LSA).

Específicos

1. Diseñar y formular un medio de cultivo para la propagación de células de levaduras *Saccharomyces* y non-*Saccharomyces* utilizando extracto de bagazo de manzana como fuente de carbono y energía.
2. Optimizar a escala piloto las condiciones operativas del proceso de propagación de la biomasa de levaduras *Saccharomyces* y non-*Saccharomyces* utilizando el extracto de bagazo de manzana como medio de cultivo.
3. Estimar la factibilidad técnico-económica de la producción de levaduras a escala industrial sustentada en el proceso de propagación optimizado.

Referencia

En las siguientes publicaciones del autor, se vuelca parte de los resultados de la presente tesis.

Wild yeasts selection for high-quality Patagonian wines (2016). *Biology and Biotechnology of Patagonian Microorganisms*. 277-300 (book chapter). ISBN 978-3-319-42799-7

Apple bagasse as a substrate for the propagation of Patagonian wine yeast biomass (2019). *Journal of Applied Microbiology* 126(5): 1414-1425. ISSN 1364-5072, doi: 10.1111/jam. 14216.

1.8 BIBLIOGRAFÍA

- Albergaria, H. and Arneborg, N. (2016). Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions. *Applied Microbiology Biotechnology*. 100:2035–2046. doi: 10.1007/s00253-015-7255-0.
- Alves, Z., Melo, A., Figueiredo, A.R., Coimbra, M.A., Gomes A.C. and Rocha, S.M. (2015). Exploring the *Saccharomyces cerevisiae* volatile metabolome: indigenous versus commercial strains. *PLoS One*. 10(11), e0143641. doi: 10.1371/journal.pone.0143641.
- Andorrà, I., Miró, G., Espligares, N., Mislata, A.M., Puxeu, M. and Ferrer-Gallego, R. (2019). Wild yeast and lactic acid bacteria of wine. In: *Yeast of Biotechnology*. Peixoto Basso T (Ed.). Chapter 4. IntechOpen Rijeka, Croacia, 15 pp. eBook (PDF) ISBN: 978-1-83881-228-7. doi: /10.5772/intechopen.84128.
- Annaluru, N. (2014). Total synthesis of a functional designer eukaryotic chromosome. *Science*. 344(6179):55-8.
- Apablaza, O.M., Rodríguez, M.E. y Caballero, A.C. (2006). Las levaduras y su importancia en la elaboración del vino. Microbiología Aplicada y Biotecnología. Monografía científica nº 4.
- Aranda, A., Matallana, E y del Olmo, M. (2005). Levaduras. *Saccharomyces* I. Levaduras de primera fermentación. *Microbiología del vino*. Carrascosa, A.V., Muñoz, R., y González, R. (eds). AMV Ediciones: 19-56.
- Arevalo-Villena, M., Briones-Perez, A., Corbo, M.R., Sinigaglia, M and Bevilacqua, A. (2017). Biotechnological application of yeasts in food science: Starter cultures, probiotics and enzyme production. *Journal of Applied Microbiology*. 123:1360-1372. doi:10.1111/jam.13548.
- Avagnina, S. y Catania, C. (2011). La interpretación sensorial del vino, curso superior de degustación. Caviar Bleu. I.S.B.N.:978-987-23725-3-8.
- Baranowski, K. and Radler, F. (1984). The glucose-dependent transport of l-malate in *Zygosaccharomyces bailii*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 50:329–340. doi.org/10.1007/BF00394646.
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M. and Loureiro, V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Science*. 153: 243-259.
- Barrajón, N., Capece, A., Arévalo, M., Briones, A. and Romano, P. (2011). Co-inoculation of different *Saccharomyces cerevisiae* strains and influence on volatile composite of wines. *Food Microbiology*. 28(5):1080-1086.
- Barrio, E., González, S.S., Arias, A., Belloch, C. and Querol, A. (2006). Molecular mechanisms involved in the adaptative evolution of industrial yeasts. *Yeasts in Food and Beverages*. Fleet, G.H. y Querol, A. (eds). Springer. 153-173.
- Bartowsky, E.J., Costello, P.J. and Chambers, P.J. (2015). Emerging trends in the application of malolactic fermentation. *Australian Journal of Grape and Wine Research* . 21:663-669.
- Belin, J.M. (1979). Contribution a l'étude des levures des chais-taxonomie, repartition des levures. *Mycopathologia*. 67:67-81.
- Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I. and Dubourdieu, D. (2008). Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 122(3):312-320.

- Bisson, L.F. and Walker, G.A. (2015). The microbial dynamics of wine fermentation. *Advances in Fermented Foods and Beverages*. Improving Quality, Technologies and Health Benefits. Woodhead Publishing, Elsevier. Chapter 19. 435-476. doi: 10.1016/B978-1-78242-015-6.00019-0, ISBN 978-1-78242-024-8 (online).
- Bokulich, N.A., Thorngate, J.H., Richardson, P.M. and Mills, D.A. (2014). Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111:139-148. doi: 10.1073/pnas.1317377110.
- Borneman, A.R., Pretorius, I.S. and Chambers, P.J. (2013). Comparative genomics: a revolutionary tool for wine yeast strain development. *Current Opinion in Biotechnology*. 24:192-199.
- Borneman, A.R. and Pretorius, I.S. (2015). Genomic insights into the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Genetics*. 199:281-291. doi: 10.1534/genetics.114.173633.
- Boulton, C. (2000). Trehalose, glycogen and sterol. (Ed.) 1st Edition. Blackwell Science, Oxford, UK. In *Brewing Yeast Fermentation Performance* Smart KA.
- Bozoudi and Tsaltas. (2016). Grape Microbiome: Potential and Opportunities as a Source of Starter Cultures. En: *Grape and Wine Biotechnology*. Antonio M. and Loira L (Eds) INTECH Chapter: 10:225-248. doi: 10.5772/64806.
- Caballero, A., Crisostomo, B. y Barbagelata, R.J. (2005). Caracterización físicoquímica de mostos tintos de calidad enológica de la norpatagonia argentina. In: *Actas del X Congreso Latinoamericano de Vitivinicultura y Enología* ed. Crivellaro Guerra, C. y de Souza Sebben, S. ISSN 1516-8107. Bento Concalves, Brasil: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria (EMBRAPA).
- Capece, A., Granchi, L., Guerrini, S., Mangani, S., Romaniello, R. and Vincenzini, M. (2016). Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from two Italian wine-producing regions. *Frontiers in Microbiology*. 7:1018. doi: 10.3389/fmicb.2016.01018.
- Capozzi, V., Garofalo, C., Chiriatti, M. A., Grieco, F. and Spano, G. (2015). Microbial terroir and food innovation: The case of yeast biodiversity in wine. *Microbiological Research*. 181:75-83.
- Castelli, T. (1955). Yeast of wine fermentation from various region of Italy. *Journal of Enology and Viticulture*. 6:18-20.
- Castelli, T. (1969). *Vino al Microscopio*. F.lli Scialpi (Ed.), Roma.
- Cavallieri, D., McGovern, P.E., Hartl, D.L., Mortimer, R. and Polsinelli, M. (2003). Evidence for *S. cerevisiae* fermentation in ancient wine. *Journal of Molecular Evolution*. 57:226-232.
- Chambers, J. and Pretorius, I.S. (2010). Fermenting knowledge: the history of winemaking, science and yeast research. *EMBO Reports*. 11:914-920.
- Chi, H., Wang, X., Qin, Y., Deng, Z., Wang, L. and Chen, S. (2019). Engineering and modification of microbial chassis for systems and synthetic biology. *Synthetic and Systems Biotechnology*. 4(1): 25-33.
- Clemente-Jiménez, J.M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Heras-Viazquez, F.J.L. and Rodríguez-Vico, F. (2004). Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiology*. 21:149-155.

- Codón, A.C. and Benítez, T. (1995). Variability of the physiological features of the nuclear and mitochondrial genomes of baker's yeasts. *Systematic and Applied Microbiology*. 18:343-352.
- Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I. and Ciani, M. (2011). Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*. 28:873-882. doi: 10.1016/j.fm.2010.12.001.
- Cordente, A., Curtin, C., Varela, C. and Pretorius, I. (2012). Flavour-active wine yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 96:601-618.
- Cordero-Otero, R., Ubeda Iranzo, J.F., Briones-Perez, A.I., Potgieter, N., Villena, M.A. and Pretorius, I. S. (2003). Characterization of the β -glucosidase activity produced by enological strains of non-*Saccharomyces* yeast. *Journal of Food Science*. 68:2564-2569. doi: 10.1111/j.1365-2621.2003.tb07062.x.
- Cubillos, F. A. (2016). Exploiting budding yeast natural variation for industrial processes. *Current Genetics*. 62:745-751. doi: 10.1007/s00294-016-0602-6.
- Cus, F. and Jenko, M. (2013). The influence of yeast strains on the composition and sensory quality of gewürztraminer wine. Available at: <http://www.ftb.com.hr/index.php/info-for-authors/136-volume-51-issueno-4/1171-the-influence-of-yeast-strains-on-the-composition-and-sensoryquality-of-gewuerztraminer-wine> [accessed February 21, 2017].
- Daum, G., Lees, N.D., Bard, M. and Dickson, R. (1998). Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 14:1471-1510.
- David, V., Terrat, S., Herzine, K., Claisse, O., Rousseaux, S. and Tourdot Maréchal, R. (2014). High-throughput sequencing of amplicons for monitoring yeast biodiversity in must and during alcoholic fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 41:811-821. doi: 10.1007/s10295-014-1427-2.
- De Deken, R.H. (1966). The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *Journal of General Microbiology*. 44 (2): 149-56.
- De Filippis, F., La Storia, A. and Blaiotta, G. (2017). Monitoring the mycobiota during Greco di Tufo and Anglianico wine fermentation by 18S rRNA gene sequencing. *Food Microbiology*. 63:117-122. doi: 10.1016/j.fm.2016.11.010.
- Degre, R. (1993). Selection and commercial cultivation of wine yeast and bacteria. *Wine Microbiology and Biotechnology*. Fleet, G.H. (ed). Harwood Academic Publishers. 421-447.
- del Mónaco, S.M., Barda, N.B., Rubio, N.C. and Caballero, A.C. (2014a). Selection and characterization of a Patagonian *Pichia kudriavzevii* for wine deacidification. *Journal of Applied Microbiology*. 117:451-464.
- del Mónaco, S.M., Bravo, S.M.E., Curilén, Y.L., Carreño, V.A. and Caballero, A.C. (2014b). A regional starter for high quality wines: an Argentinean Patagonia experience. *Bulletin de l'OIV*. 87 (998-999-1000): 217-224. ISSN 0029-7127.
- del Mónaco, S.M., Curilén, Y., Maturano, R.C., Bravo, S.M.E., Simes, A.B. and Caballero, A.C. (2016a). The use of indigenous yeasts to develop high-quality patagonian wines. En: *Morata A and Loira I Eds. Grape and Wine Biotechnology*. 325-344.

- del Mónaco, S.M., Rodríguez, M.E. and López, C.A. (2016b). *Pichia kudriavzevii* as a representative yeast of North Patagonian winemaking *terroir*. *International Journal of Food Microbiology*. 230:31-39.
- Demirci, A., Izmirliloglu, G. and Ercan, D. (2014). Fermentation and enzyme technologies in food processing. *Food Processing, Principles and Applications*. Stephanie Clark, Stephanie Jung and Buddhi Lamsal Editors. John Wiley and Sons Blackwell. Chapter 6. 107-136. ISBN:9780470671146. Online ISBN:9781118846315. doi:10.1002/9781118846315.
- Douglas, G.L. and Klaenhammer, T.R. (2010). Genomic evolution of domesticated microorganisms. *Annual Review of Food Science and Technology*. 1:397-414.
- du Toit, M. and Pretorius, I.S. (2000). Microbial spoilage. *South African Journal for Enology and Viticulture*. 21:74-96.
- Dzialo, M.C., Park, R. and Steensels, J. (2017). Physiology, ecology and industrial applications of aroma formation in yeast. *FEMS Microbiology Reviews*. 41:S95.
- Englezos, V., Rantsiou, K., Cravero, F., Torchio, F., Ortiz-Julien, A. and Gerbi, V. (2016). *Starmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed fermentations to reduce ethanol content in wine. *Applied Microbiology Biotechnology*. 100:5515–5526. doi: 10.1007/s00253-016-7413-z.
- Ferraro, L., Fatichenti, F. and Ciani, M. (2000). Pilot scale vinification process using immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*. 35:1125–1129. doi: 10.1016/S0032-9592(00)00148-5.
- Fleet, G.H. and Heard, G.M. (1993). Yeast growth during fermentation. *Wine Microbiology and Biotechnology*. (Ed. G.H. Fleet). 27-54.
- Fleet, G.H. (2007). Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology*. 18:1–6.
- Fleet, G.H. (2008). Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Reviews*. 8(7):979–995.
- François, J. and Parrou, J.L. (2001). Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Review*. 25:125–145.
- Fugelsang, K.C. (1996). *Wine Microbiology*. Chapman and Hall, New York, USA.
- Gancedo, C. and Serrano, R. (1989). Energy-yielding metabolism. En: *The yeast 3*, 2da Edición. Rose A.H. y Harrison J.S. (Eds). 205-259. New York: Academic Press, New York, Estados Unidos.
- Garcia, A., Carcel, C., Dulau, L., Samson, A., Aguera, E. and Agosin, E. (2002). Influence of a mixed culture with *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* on the volatiles of a muscat wine. *J. Food Sci.* 67:1138–1143. doi: 10.1111/j.1365-2621.2002.tb09466.x.
- Giaever, G., Chu, A.M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Véronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., André, B., Arkin, A.P., Astromoff, A., El-Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Brachat, S., Campanaro, S., Curtiss, M. and Davis, K. (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*. 418(6896):387-91.
- Gilbert, J.A., van der Lelie, D. and Zarraonaindia, I. (2014). Microbial *terroir* for wine grapes *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111:5-6.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H. (1996). Life with 6000 genes. *Science*. 274:546–567.

- González, R., Muñoz, R. y Carrascosa, A.V. (2005). Producción de cultivos iniciadores para elaborar el vino. *Microbiología del vino*. 318-341.
- Grangeteau, C., Roullier-Gall, C. and Rousseaux, S. (2017). Wine microbiology is driven by vineyard and winery anthropogenic factors. *Microbial Biotechnology*. 10:354-70.
- Grosfils, A., Vande Wouwer, A. and Bogaerts, Ph. (2007). On a general model structure for macroscopic biological reaction rates. *Journal of Biotechnology*. 130(3):253-64.
- Heard G.M. and Fleet G.H. (1988). The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *Journal of Applied Bacteriology*. 65:23-28.
- Heard, G.M. (1999). Novel yeasts in winemaking - looking to the future. *Food Australia*. 51:347-352.
- Henschke, P.A. and Jiranek, V. (1993). Yeast. Metabolism of nitrogen compounds. *Wine Microbiology and Biotechnology*. G. Fleet (Ed.). Cap. 4, 77-149.
- Hernández-Orte, P., Bely, M., Cacho, J. and Ferreira, V. (2006). Impact of ammonium additions on volatile acidity, ethanol and aromatic compound production by different *Saccharomyces cerevisiae* strain during fermentation in controlled synthetic media. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 12:150-160.
- Hong, S.K., Lee, H.J., Park, H.J., Hong, Y.A., Rhee, I.K., Lee, W.H., Choi, S.W., Lee, O.S. and *et al.* (2010). Degradation of malic acid in wine by immobilized *Issatchenkia orientalis* cells with oriental oak charcoal and alginate. *Letter in Applied Microbiology*. 50:522-529.
- Hongisto, H.J. and Laakso, P. (1978). 20th General Meeting, American Society of Sugar Beet Technologists, San Diego, 26 February-2 March.
- Hughenoltz, J. (2013). Traditional biotechnology for new foods and beverages. *Current Opinion in Biotechnology*. 24 (2):155-159.
- INV. Instituto Nacional de Vitivinicultura. (2006). Registro de viñedos. Año 1990, 2000 y 2005. http://www.inv.gov.ar/est_varios.php?que=rg_vinedos.
- INV. Instituto Nacional de Vitivinicultura. (2019). Argentina. Informe anual cosecha y elaboración 2019. Mendoza, Noviembre 2019.
- Jagtap, U.B., Jadhav, J.P., Bapat, V.A. and Pretorius, I.S. (2017). Synthetic biology stretching the realms of possibility in wine yeast research. *International Journal of Food Microbiology*. 252: 24-34.
- Jolly, N.P., Varela, C. and Pretorius, I.S. (2014). Not your ordinary yeast: no-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Reviews*. 14:215-237. doi: 10.1111/1567-1364.12111.
- Jorgensen, H., Olsson, L., Ronnow, B. and Palmqvist, E.A. (2002). Fed-batch cultivation of baker's yeast followed by nitrogen or carbon starvation: effects on fermentative capacity and content of trehalose and glycogen. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59:310-317.
- Karathia, H., Vilaprinyo, E., Sorribas, A. and Alves, R. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: a comparative study. *PLOS ONE*. 6:e16015. doi: 10.1371/journal.pone.0016015.
- Kecskeméti, E., Berkelmann-Löhnertz, B. and Reineke, A. (2016). Are epiphytic microbial communities in the carposphere of ripening grape clusters (*Vitis vinifera* L.) different between

- conventional, organic and biodynamic grapes?. *PLOS ONE*. 11:e0160852. doi: 10.1371/journal.pone.0160852.
- Kim, D.-H., Hong, Y.-A. and Park, H.-D. (2008). Co-fermentation of grape must by *Issatchenkia orientalis* and *Saccharomyces cerevisiae* reduces the malic acid content in wine. *Biotechnology Letters*. 30, 1633–1638. doi: 10.1007/s10529-008- 9726-1.
- Kurtzman, E.P., Fell, J.W. and Boekhout, T. (2011). The Yeasts: a Taxonomic Study. 5th Edition. Elsevier Science. Pulishers, Amsterdam.
- Le Guillou, B. (2000). Río Negro: de la vigne dans des oasis de la Patagonie argentine. *La Vigne* 116:112–113.
- Legras, J.L., Merdinoglu, D., Cornuet, J.M. and Karst, F. (2007). Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Molecular Ecology*. 16:2091-2102.
- Lerm, E., Engelbrecht, L. and du Toit, M. (2010). Malolactic fermentation: The ABC's of MLF. *South African Journal for Enology and Viticulture*. 31:186-212.
- Liu, Y., Forcisi, S., Harir, M., Deleris-Bou, M., Krieger-Weber, S. and Lucio, M. (2016). New molecular evidence of wine yeast-bacteria interaction unraveled by non-targeted exometabolomic profiling. *Metabolomics*. 12:69. doi: 10.1007/ s11306-016-1001-1.
- Llorente, A. and Casazza, M. (2005). Southern Wine growing Region from Argentina. *El vino y su industrial*. 40:7-13.
- Lopes, C.A. (2004). Biotecnología de vinos: selección de una cepa de levadura indígena destinada a la producción de un *starter* de fermentación vínica para ser usado en denominación de origen. Tesis de doctorado. Universidad Nacional del Comahue.
- Lopes, C.A., Rodríguez, M.E., Querol, A., Bramardi, S. and Caballero A.C. (2006). "Relationship between molecular and enological features of Patagonian wine yeasts: relevance in selection protocols". *World Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 22(8):827-833. Springer Netherlands. ISSN 0959-3993.
- Lopes, C.A., Rodríguez, M.E., Sangorrín, M., Querol, A. and Caballero, A.C. (2007). Patagonian wines: the selection of an indigenous yeast starter. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 34(8):539-546.
- Martini, A. (1993). Origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Wine Research*. 3:165-176.
- Masneuf-Pomarede, I., Juquin, E., Miot-Sertier, C., Renault, P., Laizet, Y., Salin, F. and *et al.* (2015). The yeast *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) shows high genetic diversity in winemaking environments. *FEMS Yeast Research*. 15:fov045. doi: 10.1093/femsyr/fov045
- Mateo, J.J., Jiménez, M., Huerta, T. and Pastor, A. (1991). Contribution of different yeasts isolated from musts of monastrell grapes to aroma of wines. *International Journal of Food Microbiology*. 14:153-160.
- Maturano, Y.P., Rodríguez, A.L.A., Toro, M.E., Nally, M.C., Vallejo, M. and Castellanos de Figueroa, L.I. (2012). Multi-enzyme production by pure and mixed cultures of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts during wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 155:43–50. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.015.

- Mc Govern, P.E. (2003). Ancient wine: the scientific search for the origins of viniculture. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Medina, K., Boido, E., Fariña, L., Gioia, O., Gomez, M. E. and Barquet, M. (2013). Increased flavour diversity of Chardonnay wines by spontaneous fermentation and co-fermentation with *Hanseniaspora vineae*. *Food Chemistry*. 141:2513–2521. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.04.056.
- Mora, D., Arioli, S. and Compagno, C. (2013). Food environments select microorganisms based on selfish energetic behavior. *Frontiers in Microbiology*. 4:348.
- Morgan, H.H., du Toit, M. and Setati, M.E. (2017). The Grapevine and Wine Microbiome: Insights from High-Throughput Amplicon Sequencing. *Frontiers in Microbiology*. 8:820. doi:10.3389/fmicb.2017.00820.
- Mortimer, R.K., Romano, P., Suzzi, G. and Polsinelli, M. (1994). Genome Renewal: a new phenomenon revealed from a genetic study of 43 strains of *Saccharomyces cerevisiae* derived from natural fermentation of grape musts. *Yeast*. 10:1543-1552.
- Mortimer, R. and Polsinelli, M. (1999). On the origins of wine yeast. *Research in Microbiology*. 150:199-204.
- Muñoz, R., Moreno-Arribas, V. y de las Rivas, B. (2005). Bacterias lácticas. *Microbiología del vino*. Carrascosa, A.V., Muñoz, R. y González, R. (coordinadores). AMV Ediciones, Madrid. I.S.B.N: 84-87440-06-1.
- Mylona, A.E., Del Fresno, J. M., Palomero, F., Loira, I., Bañuelos, M. A., Morata, A., Calderón, F., Benito, S. and Suárez-Lepe, J. (2016). Use of *Schizosaccharomyces* strains for wine fermentation-Effect on the wine composition and food safety. *International Journal of Food Microbiology*. 232: 63-72. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.023.
- Oh, E.J. and Jin, Y.S. (2020). Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient fermentation of cellulose. *FEMS Yeast Research*. 20 (1): foz089 <https://doi.org/10.1093/femsyr/foz089>.
- Okuma, Y., Endo, A., Iwasaki, H., Ito, Y. and Goto, S. (1986). Isolation and properties of ethanol-using yeasts with acid and ethanol tolerance. *Journal of Fermentation Technology*. 64:379-382.
- Oura, E. (1974). Effect of aeration intensity on the biochemical composition of baker's yeast. I. Factors affecting the type of metabolism. *Biotechnology and Bioengineering*. 16(9):1197-1212.
- Padilla, B., Gil, J. V. and Manzanares, P. (2016). Past and future of non-*Saccharomyces* yeasts: from spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity. *Frontiers in Microbiology*. 7:411. doi: 10.3389/fmicb.2016.00411.
- Papadimitriou, K., Pot, B. and Tsakalidou, E. (2015). How microbes adapt to a diversity of food niches. *Current Opinion in Food Science*. 2:29–35.
- Patinvoh, R.J. and Taherzadeh, M.J. (2019). Fermentation processes for second-generation biofuels. *Second and Third Generation of Feedstocks*. The Evolution of Biofuels. Basile A and Dalena F Editors. Elsevier. Chapter 9. 241-272. ISBN 978-0-12-815162-4.
- Pérez-Martín, F., Seseña S., Fernández-González M., Arévalo, M. and Llanos-Palop, M. (2014). Microbial communities in air and wine of a winery at two consecutive vintages. *International Journal of Food Microbiology*. 190:44-53.

- Pérez-Torrado, R. (2004). Estudio y mejora del proceso de producción industrial de levaduras vínicas. Universitat de Valencia. Valencisa ; PhDThesis.
- Pérez-Torrado, R., Gómez-Pastor, R., Larsson, C. and Matallana, E. (2009). Fermentative capacity of dry active wine yeast requires a specific oxidative stress response during industrial biomass growth. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 81:951-960.
- Petruzzi, L., Capozzi, V., Berbegal, C., Corbo, M.R., Bevilacqua, A., Spano G. and Sinigaglia, M. (2017). Microbial resources and enological significance: opportunities and benefits. *Frontiers in Microbiology*. 8:995. doi: doi.org/10.3389/fmicb.2017.00995.
- Pinto, C., Pinho, D., Cardoso, R., Custódio, V., Fernandes, J., Sousa, S. and *et al.* (2015). Wine fermentation microbiome: a landscape from different Portuguese wine appellations. *Frontiers in Microbiology*. 6:905. doi: 10.3389/fmicb.2015.00905.
- Poirier, I., Marechal, P.A., Richard, S. and Gervais, P. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* viability is strongly dependant on rehydration kinetics and the temperature of dried cells. *Journal Applied Microbiology*. 86: 87-92.
- Polaskova, P., Herszage, J. and Ebeler, S.E. (2008). Wine flavor: chemistry in a glass. *Chemical Society Reviews*. 37:2478-2489.
- Potts, M. (2001). Desiccation tolerance: a simple process?. *Trends in Microbiology*. 9 (11): 553-559.
- Pretorius, I.S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*. 16: 675-729.
- Pretorius, I.S. (2016). Conducting Wine Symphonics with the Aid of Yeast Genomics. *Beverages*. 2(4):36. doi:10.3390/beverages2040036. www.mdpi.com/journal/beverages.
- Pretorius, I.S. (2020). Tasting the *terroir* of wine yeast innovation. *FEMS Yeast Research*. 20(1): foz084. <https://orcid.org/0000-0001-9127-3175>.
- Puig, S., Querol, A., Barrio, E. and Perez-Ortin, J.E. (2000). Mitotic recombination and genetic changes in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:2057-2061.
- Querol, A. and Ramón, D. (1996). The application of molecular techniques in wine microbiology. *Trends in Food Science and Technology*. 7:73-78.
- Querol, A., Fernández-Espinar, M.T., del Olmo, M. and Barrio, E. (2003). Adaptive evolution of wine yeast. *International Journal of Food Microbiology*. 86(1-2):3-10.
- Rachidi, N., Barre, P. and Blondin, B. (1999). Multiple Ty-mediated chromosomal translocations lead to karyotype changes in a wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Genetics and Genomics*. 261: 841-850.
- Rainieri, S. and Pretorius, I.S. (2000). Selection and improvement of wine yeasts. *Annals of Microbiology*. 50:15-31.
- Rantsiou, K., Dolci, P., Giacosa, S., Torchio, F., Tofalo, R. and Torriani, S. (2012). Candida zemplinina can reduce acetic acid produced by *Saccharomyces cerevisiae* in sweet wine fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*. 78:1987-1994. doi: 10.1128/AEM.06768-11
- Rapoport, A.I., Khroustalyova, G.M., Chamanis, G.J. and Beker, M.E. (1995). Yeast anhydrobiosis: permeability of the plasma membrane. *Microbiology*. 64: 229-232.

- Reed, G. and Nagodawithana, T.W. (1988). Technology of yeast usage in winemaking. *American Journal of Enology and Viticulture*. 39:83-90.
- Renault, P., Miot-Sertier, C., Marullo, P., Hernández-Orte, P., Lagarrigue, L., Lonvaud-Funel, A. and Bely, M. (2009). Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspora delbrueckii* species: Potencial applications in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*. 134:201-210.
- Renault, P., Coulon, J., de Revel, G., Barbe, J.C. and Bely, M. (2015). Increase of fruity aroma during mixed *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* wine fermentation is linked to specific esters enhancement. *International Journal of Food Microbiology*. 207:40-48. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.037.
- Ribereau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. and Dubourdieu, D. (2006). Handbook of Enology. The Chemistry of Wine and Stabilization and Treatments. Volume 2: Chapter 1. 3–49. West Sussex, England: John Wiley & Sons Ltd.
- Richardson, L.S., Vargas, G., Brown, T., Ochoa, L., Sheller-Miller, S., Saade, G.R., Taylor, R.N. and Menon, R. (2017). Discovery and Characterization of Human Amniochorionic Membrane Microfractures. *The American Journal of Pathology*. (187):2821-2830. doi: 10.1016/j.ajpath.2017.08.019.
- Roca, P. (2019). Conjoncture vitivinicole mondiale 2019. Conferencia de Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV). Abril 2019.
- Rodríguez, M.E., López, C.A., Sangorrín, M., Giraudo, M.R. y Caballero, A. (2005). Las levaduras y el aroma de los vinos. *El vino y su industria*. 34:6-30.
- Rodriguez-Porrata, B., Novo, M., Guillamon, J., Rozes, N., Mas, A. and Cordero Otero, R. (2008). Vitality enhancement of the rehydrated active dry wine yeast. *International Journal of Food Microbiology*. 126:116–122.
- Rosas Lemus, M., Elodie Roussarie, X., Hammad, N., Mougeolle, A., Ransac, S., Issa, R., Mazat, J. P., Uribe-Carvajal, S., Rigoulet, M. and Devin, A. (2018). The role of glycolysis-derived hexose phosphates in the induction of the Crabtree effect. *Journal of Biological Chemistry*. 293(33):12843–12854. doi: 10.1074/jbc.RA118.003672.
- Rosini, G. (1984). Assessment of dominance of added yeast with fermentation and origin of *Saccharomyces cerevisiae* in wine making. *Journal of General and Applied Microbiology*. 30:249-256.
- Rossouw, D. and Bauer, F.F. (2016). Exploring the phenotypic space of non-*Saccharomyces* wine yeast biodiversity. *Food Microbiology*. 55:32-46. doi: 10.1016/j.fm.2015.11.017.
- Salmon, J.M. (1997). Enological fermentation kinetics of an isogenic ploidy series derived from an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 83: 253-260.
- Sangorrín, M.P., Lopes, C.A., Giraudo, M.R. and Caballero, A.C. (2007). Diversity and killer behaviour of indigenous yeasts isolated from the fermentation vat surfaces in four Patagonian wineries. *International Journal of Food Microbiology*. 119:351-357.
- Seo, S.H., Rhee, C.H. and Park, H.D. (2007). Degradation of malic acid by *Issatchenkia orientalis* KMBL 5774, an acidophilic yeast strain isolated from korean grape wine pomace. *Journal of Microbiology*. 45:521–527.

- Setati, M.E., Jacobson, D. and Bauer, F.F. (2015). Sequence-based analysis of the *Vitis vinifera* L. cv Cabernet Sauvignon grape must mycobiome in three South African vineyards employing distinct agronomic systems. *Frontiers in Microbiology*. 6:1358. doi: 10.3389/fmicb.2015.01358.
- Shafaghat, H., Najafpour, G.D., Rezaei, P.S. and Sharifzadeh, M. (2010). Optimal growth of *Saccharomyces cerevisiae* (PTCC 24860) on pretreated molasses for the ethanol production: the application of the response surface methodology. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*. 16(2):199-206.
- Sharf, R. and Margalith, P. (1983). The effect of temperature on spontaneous wine fermentation. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. 17:311-313.
- Steensels, J., Gallone, B., Voordeckers, K. and *et al.* (2019). Domestication of industrial microbes. *Current Biology*. 29:381-93.
- Styger, G., Prior, B. and Bauer, F. (2011). Wine flavor and aroma. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 38:1145-1159.
- Suárez Lepe, J.A., Morata, A. (2011). Medidas para paliar los efectos del cambio climático. *La Semana vitivinícola*. 342-347. ISSN 0037-184X.
- Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A. and Pretorius, I.S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavor. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 11:139-173.
- Taylor, M.W., Tsai, P., Anfang, N., Ross, H.A. and Goddard, M.R. (2014). Pyrosequencing reveals regional differences in fruit-associated fungal communities. *Environmental Microbiology*. 16:2848-2858. doi: 10.1111/1462-2920.12456.
- Thornton, R.J. and Rodriguez, S.B. (1996). Deacidification of red and white wines by a mutant of *Schizosaccharomyces malidevorans* under commercial winemaking conditions. *Food Microbiology*. 13:475-482.
- Tristezza, M., Vetrano, C., Bleve, G., Spano, G., Capozzi, V., Logrieco, A., Mita, G. and Grieco, F. (2013). Biodiversity and safety aspects of yeast strains characterized from vineyards and spontaneous fermentations in the Apulia Region, Italy. *Food Microbiology*. 36 (2):335-342.
- Tristezza, M., Tufariello, M., Capozzi, V., Spano, G., Mita, G. and Grieco, F. (2016). The enological potential of *Hanseniaspora uvarum* in simultaneous and sequential co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for industrial wine production. *Frontiers in Microbiology*. 7:670. doi: 10.3389/fmicb.2016.00670.
- Tronchoni, J., Curiel, J.A., Morales, P., Torres-Pérez, R. and Gonzalez, R. (2017). Early transcriptional response to biotic stress in mixed starter fermentations involving *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii*. *International Journal of Food Microbiology*. 241:60-68. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.017.
- Tufariello, M., Chiriatti, M., Grieco, F., Perrotta, C., Capone, S. and Rampino, P. (2014). Influence of autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains on volatile profile of Negroamaro wines. *LWT. Journal of Food Science and Technology*. 58:35-48.
- Vaughan-Martini, A. and Martini, A. (1995). Facts, myths and legends on the prime industrial microorganism. *Journal of Industrial Microbiology*. 14:514-522.

- Verstrepen, K. J., Iserentant, D., Malcorps, P., Derdelinckx, G., Van Dijck, P., Winderickx, J., Pretorius, I. S., Thevelein, J. M. and Delvaux, F. R. (2004). Glucose and sucrose: hazardous fast-food for industrial yeast? *TRENDS in Biotechnology* 22 (10): 531-537 doi:10.1016/j.tibtech.2004.08.001.
- Viana, F., Gil, J. V., Genovés, S., Vallés, S. and Manzanares, P. (2008). Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. *Food Microbiology*. 25:778-785. doi: 10.1016/j.fm. 2008.04.015.
- Vigentini, I., De Lorenzis, G., Fabrizio, V., Valdetara, F., Faccincani, M., Panont, C. A., Picozzi, C., Imazio, S., Failla, O. and Foschino, R. (2015). The vintage effect overcomes the terroir effect: a three year survey on the wine yeast biodiversity in Franciacorta and Oltrepò Pavese, two northern Italian vine-growing areas. *Microbiology*. 161: 362–373. doi: 10.1099/mic.0.000004.
- Viljoen, M., Subden, R.E., Krizus, A. and Van Vuuren, H.J. (1994). Molecular analysis of the malic enzyme gene (*mae2*) of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*. 10: 613–624.
- Viljoen, M., Volschenk, H., Young, R.A. and van Vuuren, H.J. (1999). Transcriptional regulation of the *Schizosaccharomyces pombe* malic enzyme gene, *mae2*. *Journal of Biological Chemistry*. 274:9969–9975.
- Walker, G.M. and van Dijck, P. (2006). Physiological and molecular responses of yeasts to the environment. In: Querol, A., Fleet, G.H. (Eds.). *Yeasts in Food and Beverages. The Yeast Handbook*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 111-152.
- Wang, C., Garcia-Fernández, D., Mas, A. and Esteve-Zarzoso, B. (2015). Fungal diversity in grape must and wine fermentation assessed by massive sequencing, quantitative PCR and DGGE. *Frontiers in Microbiology*. 6:1156. doi: 10.3389/fmicb.2015.01156.
- Whitener, M.E.B., Stanstrup, J., Panzeri, V., Carlin, S., Divol, B. and du Toit, M. D. (2015). Untangling the wine metabolome by combining untargeted SPME– GCxGC-TOF-MS and sensory analysis to profile Sauvignon blanc co-fermented in Wine with seven different yeasts. *Metabolomics* 12:53. doi: 10.1007/s11306-016-0962-4.
- Winzeler, E.A., Shoemaker, D.D., Astromoff, A., Liang, H. and Anderson, K. (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*. 285:901–906.
- Witkowsky, k. (2019). Historia de las bodegas y viñedos de la Patagonia Norte. EDITOR Witkowsky. Primera edición. EDUCO. ISBN 978-987-604-522-3.
- Woehrler, W. and Roehr, M. (1981). Regulatory aspects of bakers' yeast metabolism in aerobic fed-batch cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. 23:567–581.
- Zapparoli, G., Reguant, C., Bordons, A., Torriani, S. and Dellaglio F. (2000). Genomic DNA fingerprinting of *Oenococcus oeni* strains by pulsed-field gel electrophoresis and randomly amplified polymorphic DNA-PCR». *Current Microbiology*. 40:351-355.

CAPÍTULO 2

Diseño y Formulación del Medio de Cultivo

**Bagazo de manzana como sustrato para la propagación de biomasa
de levaduras de vino patagónicas**

2.1 INTRODUCCIÓN

Los residuos industriales de procesamiento de frutas constituyen un material rico en carbono disponible en muchas regiones del planeta y emergen actualmente como una fuente de recursos energéticos sostenibles y amigables con el medio ambiente (dos Santos Lima *et al.*, 2012). Por su abundante disponibilidad y bajo costo, esta materia prima renovable representa un sustrato alternativo interesante para la producción a nivel industrial de productos/compuestos de alto valor agregado (Zhu *et al.*, 2015; Santos Felix *et al.*, 2018).

En la región del Comahue (Argentina), la producción de frutas de pepitas (manzanas y peras) es uno de los pilares de la economía. La producción primaria está fuertemente concentrada en los valles de los ríos Negro (Alto Valle de la Provincia de Río Negro) y Neuquén (Departamentos de Confluencia y Añelo en la Provincia de Neuquén). El 60 % de la producción de pera y el 25 % de manzana se comercializan en fresco en el mercado externo, el resto se destina al mercado interno para su consumo en fresco o para su industrialización. En manzana, los productos procesados representan el 40 % de la producción, históricamente orientada a la elaboración de jugos concentrados y más recientemente a la de jugos exprimidos (*not from concentrate*). Por sus mayores volúmenes de producción, las variedades de manzanas utilizadas en la elaboración de jugos exprimidos son Red Delicious y Granny Smith.

En la elaboración industrial de jugos exprimidos, el 35 % de la fruta prensada se convierte en un sustrato que se desecha como bagazo y que aún mantiene una elevada carga nutricional. El bagazo de manzana es un subproducto agrícola, rico en carbohidratos solubles que se puede utilizar en procesos industriales que promueven el crecimiento de microorganismos (Castillo-Castillo *et al.*, 2016), habiéndose utilizado en fermentaciones en estado sólido llevadas a cabo por hongos filamentosos (Rodríguez *et al.*, 2008), en la producción de etanol y biohidrógeno por levadura (Pacheco *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2018) o en forma fermentada para la alimentación de rumiantes (Castillo-Castillo *et al.*, 2016). Sin embargo, no existen registros en la literatura del uso del bagazo de manzana como sustrato en procesos fermentativos destinados a la producción de biomasa de microorganismos, levaduras en particular.

La propagación de biomasa es una operación central en el proceso de producción de levadura destinada a distintos usos como panificación, producción de bebidas alcohólicas, complemento dietético para la alimentación humana y animal, producción de enzimas, entre otros (Fleet, 2007; Arevalo-Villena *et al.*, 2017) y la preparación de un medio de cultivo óptimo para el desarrollo del proceso es determinante para asegurar la productividad del mismo. Los componentes de los medios constituyen los efectores externos de naturaleza química esenciales para la propagación de las células y deben cumplir con los requerimientos nutricionales del microorganismo para su

crecimiento y mantenimiento celular. El desarrollo de un medio de cultivo incluye su diseño, formulación y optimización, en ese orden (Értola *et al.*, 2006).

En la etapa del diseño se deben identificar las variables que afectan el crecimiento de las células y la formación de productos, cuando correspondiera, relacionados con el proceso a desarrollar. Se deben tener en cuenta, entonces, los requerimientos nutricionales del microorganismo (macronutrientes, micronutrientes y factores de crecimiento), los requerimientos específicos del proceso (pH, T, fuerza iónica, oxígeno disuelto, entre otros), la disponibilidad real de los nutrientes y las consideraciones sobre las materias primas, en particular aspectos relacionados con sus costos, estabilidad química, etc. (Értola *et al.*, 2006). La disponibilidad de los nutrientes es un aspecto de fundamental importancia para el diseño y formulación de los medios de cultivo, en particular cuando se utilizan medios complejos como los corrientemente utilizados a nivel industrial.

La formulación y optimización de un medio se vincula con sus aspectos cuantitativos, es decir, establecer las concentraciones de cada componente en el medio de cultivo y los valores de las variables físicas. Una primera aproximación con respecto a las cantidades a utilizar de las diversas fuentes nutricionales lo da el conocimiento de la composición elemental de la biomasa del microorganismo a ser empleado. A partir del análisis de la estequiometría de crecimiento y de formación del producto, es posible formular adecuadamente un medio. No obstante, cuando el medio de cultivo a emplearse está constituido por fuentes nutricionales no convencionales resulta imperativa su optimización (Értola *et al.*, 2006).

En la producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae*, que constituye la mayor producción a granel de microorganismos unicelulares en el mundo (Gómez-Pastor *et al.*, 2011), la materia prima utilizada tradicionalmente para la propagación industrial de las células es la melaza de caña de azúcar y/o la de remolacha azucarera enriquecidas, un tipo de desechos inexistente en la región del Comahue. Por esta razón, en este capítulo se caracteriza fisicoquímicamente el bagazo de manzanas Red Delicious generado en la elaboración de jugos exprimidos regionales y se evalúa su potencialidad para ser utilizado como un sustrato alternativo a las melazas de caña y remolacha azucarera en medios de cultivos destinados a la propagación de biomasa de levaduras convencionales (*S. cerevisiae*) y no convencionales (*P. kudriavzevii*) a escala industrial.

Para el diseño del medio de cultivo, la selección de las variables que afectan el crecimiento microbiano se realizó mediante diseños experimentales multifactoriales (Plackett y Burman, 1946) y los parámetros del crecimiento de las levaduras ensayadas se calcularon ajustando los datos experimentales al modelo de Gompertz modificado (Zwietering *et al.*, 1990). La formulación del

medio se realizó utilizando un diseño central compuesto y la validación del mismo se llevó a cabo a través de fermentaciones a escala de laboratorio, calculándose el factor de precisión y el factor de sesgo. El proceso de diseño desarrollado cumple con los procedimientos estándares de la microbiología predictiva (Nikel *et al.*, 2005; Arroyo-Lopez *et al.*, 2009; Dasgupta *et al.*, 2013).

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 MATERIAS PRIMAS

2.2.1.1 Bagazo de manzana

Los bagazos ensayados en este trabajo resultan de la elaboración de jugos naturales exprimidos de manzana (*not from concentrate juices*) libres de aditivos (envase *bag in box*). Para la elaboración de este tipo de jugos, la manzana es inspeccionada por personal de control de calidad de la empresa para su aceptación o rechazo, aceptándose únicamente los frutos en su estado de madurez óptimo, sanos, de aspecto fresco y consistencia firme, y libres de ataques de insectos, de enfermedades que demeriten la calidad interna del fruto, de humedad externa anormal y de cualquier olor y/o sabor extraño. Luego pasan a producción, limpieza, lavado (Lavadora y fresadora WA LC40 con molino centrífugo y torre giratoria para prensas de cinta, capacidad 3.000 kg h⁻¹, totalmente de acero inoxidable, marca VORAN, Austria) y prensado (Prensa de correa simple EBP500, para el procesamiento continuo de frutas, capacidad 700 kg h⁻¹, Marca VORAN), temperatura de operación 25 °C. Después del prensado, el bagazo de manzana obtenido es un producto natural, no fermentado y sin aditivos. El bagazo de manzana utilizado en este trabajo de Tesis fue provisto la empresa Patagonia Beverage SRL, sita en la ciudad de Centenario, Neuquén (Argentina) que se dedica a la producción de jugos exprimidos. La disponibilidad de este subproducto industrial es anual. Para la caracterización fisicoquímica se tomaron 5 muestras de 1kg de bagazo de manzana por lote de producción (aproximadamente 1.500 kg de manzana procesada por lote), analizándose cuatro lotes a razón de un lote mensual. Las muestras se guardaron en bolsas estériles de 1 L de capacidad a -20 °C hasta su uso.

2.2.1.2 Melaza

La melaza utilizada fue melaza de caña de azúcar de 80 °Bx, conteniendo 27,21 g L⁻¹ Glucosa, 94,87 g L⁻¹ Fructosa y 323,52 g L⁻¹ Sacarosa. R.N.E N°01001454 procedente de Tucumán, Argentina.

2.2.2 CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DEL BAGAZO DE MANZANA

2.2.2.1 Humedad

La humedad se determinó gravimétricamente, sometiendo la muestra a estufa de aire caliente (Incubator SANYO, Argentina) a 100 °C y presión atmosférica, hasta peso constante. Este método es

aplicable a la mayoría de los productos alimenticios excepto aquellos que puedan contener compuestos susceptibles a la descomposición por calor. (Nielsen, 2003).

2.2.2.2 pH

El pH se determinó potenciométricamente utilizando un pHmetro ORION RESEARCH (Orion Research Incorporated, Cambridge, MA) modelo 231. Se colocaron aproximadamente 75 mL de muestra en un vaso de precipitado, y se midió directamente con un electrodo. (Pearson, 1993).

2.2.2.3 Actividad acuosa (aw)

Para medir el valor de aw se utilizó un equipo Testo 650 Humidity Meter (sonda de alta precisión y accesorios). Se colocaron aproximadamente 2 g de muestra en la cámara del equipo y se dejó estabilizar durante aproximadamente 30 minutos a una temperatura constante de 25°C, luego se lee directamente el valor. Testo (2000), Manual de instrucciones. www.testo.com.

2.2.2.4 Amonio

El contenido de amonio de las muestras se determinó potenciométricamente utilizando un electrodo selectivo de amonio marca ORION modelo 95-12 y curva de calibración preparada con una solución de NH_4Cl . (Orion Research Incorporated, 1986).

2.2.2.5 Nitrógeno Fácilmente Asimilable (FAN)

El FAN se determinó por el método de Sørensen (1909). El nitrógeno puede encontrarse en forma de catión amonio (NH_4^+), o en forma de nitrógeno orgánico como aminoácidos libres, polipéptidos y en menor proporción como nitrógeno amídico, nitrógeno nucleico y aminas biógenas (etilamina, histamina, etc.). El método consiste en adicionar un exceso de formaldehído que bloquea el grupo NH_4^+ y deja libres los grupos carboxilo, disminuyendo el pH de forma proporcional a la cantidad de éstos grupos en los compuestos nitrogenados del tipo de los aminoácidos.

2.2.2.6 Polifenoles

Los compuestos fenólicos se determinaron utilizando el método de Folin- Ciocalteu. Este reactivo contiene una mezcla de ácidos fosfotúngstico ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) y fosfomolibdico ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$), que se reducen por oxidación de los fenoles a óxidos de tungsteno (W_8O_{23}) y de molibdeno (Mo_8O_{23}), de color azul. La coloración azul producida es proporcional a la concentración de compuestos fenólicos presentes en la muestra y posee una absorción máxima a 765 nm. El procedimiento emplea el ácido gálico como compuesto de referencia para elaborar la curva de calibración. (Marinova *et al.*, 2005).

2.2.2.7 Azúcares Reductores Totales (ART)

Los ART se determinaron por el método de Fehling-Causse-Bonnans. El mismo se basa en la reducción del licor de Fehling en medio alcalino y en caliente por parte de los glúcidos reductores. El

ion cúprico pasa a cuproso precipitando como óxido de color rojo ladrillo. Para visualizar el punto final de esta reacción de óxido-reducción se agrega como indicador azul de metileno, que en estado oxidado es color azul y en estado reducido es incoloro (leucobase). La primera gota de solución del glúcido reductor en exceso reduce al azul de metileno, apareciendo el color rojo ladrillo del Cu_2O . Esta reacción no es estequiométrica, un mol de glucosa reduce aproximadamente entre 5 o 6 moles de $\text{Cu}(\text{OH})_2$, dependiendo de las condiciones del medio. Por ello para determinar la concentración del glúcido reductor se procede a titular el reactivo de Fehling con una solución de concentración conocida de azúcar invertido. (AOAC, 1990).

2.2.3 EXTRACTO DE BAGAZO DE MANZANA (EBM)

El extracto de bagazo de manzana se preparó agregando una proporción de 4 mL de agua cada 6 g de bagazo de manzana Red Delicious. La mezcla se agitó periódicamente durante 30 min y finalmente se centrifugó durante 5 min a $1.500 \times g$ y se filtró (si sus volúmenes fueron menores de 50 mL) o se prensó y filtró (si los volúmenes fueron mayores). La fracción líquida obtenida por centrifugado o prensado y filtrado constituye el EBM y su contenido de sólidos solubles expresado en grados Brix ($^{\circ}\text{Bx}$) se determinó refractométricamente según el método 932.12 de la A.O.A.C, utilizando un refractómetro ABBÉ, marca ATAGO tipo 1. El contenido de sólidos solubles del EBM preparado en las condiciones descritas es de aproximadamente 6°Bx . A partir de este extracto se prepararon las demás soluciones, diluyendo con agua destilada hasta el $^{\circ}\text{Bx}$ correspondiente.

2.2.4 MICROORGANISMOS

2.2.4.1 Levaduras

Las cepas de levaduras utilizadas en este trabajo fueron *Saccharomyces cerevisiae* F8 (*Sc* F8) y *Pichia kudriavzevii* 15 (*Pk* 15) (ex *Isatchenkia orientalis*), ambas cepas autóctonas de la región, aisladas en el norte de la Patagonia de vinificaciones en tinto (del Mónaco *et al.*, 2015 y 2016).

2.2.4.2 Banco de cepas de levadura

A partir del crecimiento de las cepas obtenido en el medio sólido GPY agar (glucosa 10 g L^{-1} , peptona 10 g L^{-1} , extracto levadura 10 g L^{-1} , agar 20 g L^{-1} y pH 5,9) y su posterior análisis molecular, se preparó el inóculo realizando una suspensión en 20 viales estériles con 1 mL de glicerol al 20 % por cada cepa de levadura Patagónica. Finalmente, los viales se almacenaron a -20°C .

2.2.4.3 Reactivación de las cepas de levaduras

Cultivos puros almacenados en glicerol al 20 % y a -20°C , se activaron en tubos de vidrio estériles de 10 mL de volumen total conteniendo 5 mL de caldo GPY (glucosa 10 g L^{-1} , peptona 10 g L^{-1} , extracto levadura 10 g L^{-1} y pH 5,9) a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Seguidamente, los

cultivos se centrifugaron, los sedimentos se lavaron y resuspendieron asépticamente en agua destilada estéril a una densidad celular de 2.6×10^7 células mL⁻¹.

2.2.4.4 Determinación del crecimiento microbiano

Se realizó por lectura de la densidad óptica (DO) a 600 nm.

2.2.5 DISEÑO ESTADÍSTICO EXPERIMENTAL (DEE)

2.2.5.1 Modelo primario de crecimiento microbiano

Los parámetros de crecimiento: velocidad máxima de crecimiento específico ($\mu_{\max}$, h⁻¹), máxima densidad óptica alcanzado (A, en unidades de absorbancia) y extensión de la fase de Lag (λ , en horas) para cada diseño experimental (DEE) se calcularon ajustando los datos experimentales al modelo de Gompertz modificado (Zwietering *et al.*, 1990), cuya ecuación se detalla a continuación:

$$Y = A \cdot \exp \{-\exp[(\mu_{\max} \cdot e) / A] \cdot (\lambda - t) + 1\} \quad \text{Ec. 2.1}$$

con $Y = \ln(DO_T / DO_0)$ donde DO_0 y DO_T corresponden a la densidad óptica inicial y en el tiempo t , respectivamente; $A = \ln(DO_{\infty} / DO_0)$ es el valor máximo de densidad óptica alcanzado con N_{∞} como máximo asintótico y e , es el número de Euler = 2,71828. Los datos correspondientes a cada experiencia se ajustaron mediante una estimación no lineal, minimizando la suma de las desviaciones al cuadrado de los valores observados de la variable dependiente respecto de los predichos por el modelo. Los parámetros de crecimiento se obtuvieron mediante el software STATISTICA 10.0 (StatSoft, Tulsa, OK, EE.UU.).

2.2.5.2 Diseño Plackett Burman (DPB)

Se realizaron diseños de “screening” con el objetivo de evaluar posibles variables que tuvieran influencia significativa en el crecimiento de las levaduras en estudio. Se eligieron diseños Plackett-Burman de dos niveles utilizando como fuentes de carbono extracto de bagazo de manzana Red Delicious (EBM) y melaza de caña de azúcar. Se seleccionaron 11 variables independientes: parámetros físicos como pH y componentes químicos habituales de los medios de cultivo por ser parte de la composición elemental de las células de levaduras como fuentes de carbono y nitrógeno, magnesio, anión fosfato, vitaminas del grupo B, entre otros. Las variables se codificaron de acuerdo con la siguiente Ecuación:

$$xi = Xi - X_0 / \Delta Xi \quad \text{Ec. 2.2}$$

donde $i = 1 \dots N$, xi corresponde a la variable codificada, Xi corresponde al valor real de la variable independiente, X_0 es el valor real de la variable independiente en el punto central y ΔXi corresponde al paso o diferencia entre los extremos y el punto central. Cada parámetro se calculó de acuerdo con

las concentraciones reportadas normalmente para la propagación de biomasa de levaduras, cuyos valores codificados como bajos (-1) y altos (+1) se presentan en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1: Relación entre los valores codificados y reales de las variables utilizadas en el diseño

FACTORES	Valores Codificados		
	-1	0	+1
Fte. Carbonada(°Bx)*	1,0	3,5	6,0
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g L ⁻¹)	0	5	10
Mn SO ₄ (mg L ⁻¹)	0	5	10
CaCl ₂ (g L ⁻¹)	0,0	0,5	1,0
MgSO ₄ (g L ⁻¹)	1,00	1,75	2,50
K ₂ HPO ₄ (g L ⁻¹)	1,0	5,5	10,0
Tiamina (mg L ⁻¹)	0	1	2
Ac. Pantoténico (mg L ⁻¹)	1,0	10,5	20,0
Piridoxina (mg L ⁻¹)	2	11	20
Biotina (mg L ⁻¹)	0,50	1,25	2,00
pH	3	5	7

* Las fuentes carbonadas fueron extracto de bagazo de manzana y melaza de caña diluida con agua destilada.

Los ensayos se llevaron a cabo mediante microfermentaciones en placas de 96 pocillos de 400 µL de volumen, conteniendo los medios de cultivo sugeridos por el modelo, previamente esterilizados mediante filtración (0,20 µm de poro). Los medios se inocularon con aproximadamente 2.10⁶ células mL⁻¹ de la cepa a estudiar y el crecimiento microbiano se siguió mediante mediciones de densidad óptica a 600 nm. Se diseñaron 12 series con diferentes combinaciones de valores para cada parámetro a evaluar incluyendo el punto central por duplicado. Adicionalmente, ensayos conteniendo valores medios (0) de C y N sin otros aditivos también se realizaron como control.

Las matrices de Plackett-Burman se obtuvieron mediante el software STATISTICA 10.0 (StatSoft, Tulsa, OK, EE.UU.) obteniéndose el siguiente polinomio lineal general:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_4 + \dots b_nX_n \quad \text{Ec. 2.3}$$

donde b_j representan los coeficientes de regresión, cuyos valores absolutos indican el efecto de la variable X_j sobre la variable dependiente Y para los n parámetros evaluados. En la búsqueda de efectos principales, los coeficientes de regresión se interpretan como el aumento o la disminución (coeficiente positivo o negativo) en la respuesta, cuando el factor cambia en una unidad. La validez del modelo se controló mediante la determinación del coeficiente de regresión R^2 (porcentaje de variabilidad de la respuesta explicada por el modelo) ajustado por encima de 0,95.

2.2.5.3 Diseño Compuesto Central (DCC)

Los efectos de la concentración de la fuente de carbono (extracto de bagazo de manzana o melaza de caña diluida) y la concentración de nitrógeno (sulfato de amonio) en el crecimiento de levaduras se probaron utilizando un Diseño Compuesto Central con dos repeticiones para el punto central. El diseño se generó con el software STATISTICA 10.0 (StatSoft, Tulsa, OK, EE. UU), y los niveles de las variables se establecieron en un rango de condiciones según los resultados obtenidos por los diseños Plackett Burman para la fuente carbonada y los valores que se encuentran generalmente en bibliografía para la fuente nitrogenada. Los “puntos estrella” se situaron a $\pm 1,68$ del centro para dar cuenta de la capacidad de rotación, lo que permite extraer la misma cantidad de información (y, en consecuencia, hacer predicciones con la misma precisión) en todas las direcciones de la superficie ajustada (Myers y Montgomery, 2002).

Las relaciones entre los valores físicos y codificados para las variables utilizadas se muestran en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2: Valores reales y codificados para los parámetros evaluados en los diseños compuestos centrales

#	Fuente C (°Bx)*		(NH ₄) ₂ SO ₄ (g L ⁻¹)	
1	1,20	(-1)	^B 6,00	(-1)
2	1,20	(-1)	^D 21,00	(+1)
3	5,00	(+1)	^B 6,00	(-1)
4	5,00	(+1)	^D 21,00	(+1)
5	0,30	(-1,68)	^C 10,80	(0)
6	5,68	(+1,68)	^C 10,80	(0)
7	3,00	(0)	^A 0,19	(-1,68)
8	3,00	(0)	^E 24,00	(+1,68)
9 (C)	3,00	(0)	^C 10,80	(0)

* La fuente carbonada fue bagazo de manzana y melaza de caña en diseños independientes. # = Número de corridas. Los valores codificados para cada parámetro se expresaron entre paréntesis. # 9 corridas (C) = Punto Central en el diseño estadístico. A equivale a 0,04 g L⁻¹ de FAN; B equivale a 1,2 g L⁻¹ de FAN; C equivale a 2,3 g L⁻¹ de FAN; D equivale a 4,5 g L⁻¹ de FAN y E equivale a 5 g L⁻¹ de FAN.

Los valores de los parámetros de crecimiento A, $\mu_{\max}$ y λ obtenidos del modelo primario se ajustaron posteriormente a una superficie de respuesta de la forma general:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^N \beta_i \cdot x_i + \sum_{j=1}^N \sum_{i=1}^{j-1} \beta_{ij} \cdot x_i \cdot x_j + \sum_{i=1}^N \beta_{ii} \cdot x_i^2 \quad \text{Ec. 2.4}$$

donde Y es el parámetro de crecimiento modelado, β_0 es el término medio/intercepto, β_i son los coeficientes que se estiman durante el ajuste de Superficie Respuesta SR (β_1 es el coeficiente para el efecto lineal de x_1 , β_{11} para el efecto cuadrático de x_1 , β_{12} para la interacción entre las

variables x_1 y x_2 , y así sucesivamente). x_1 y x_2 son las variables ambientales (concentración de la fuente de carbono y concentración de nitrógeno, respectivamente). El análisis de SR se realizó utilizando el módulo de Diseño Experimental del paquete de software STATISTICA 10.0 y el rendimiento del modelo se verificó mediante la prueba de falta de ajuste y el coeficiente de determinación R^2 (porcentaje de variabilidad en la respuesta que el modelo puede explicar). Para determinar los valores de las variables donde se obtuvieron los parámetros óptimos de crecimiento, se realizó un análisis numérico para resolver un sistema de derivadas parciales ($Y/\partial x_1, \partial Y/\partial x_2 \dots \partial Y/\partial x_n$) para las diferentes variables independientes.

2.2.5.4 Validación del modelo

Para la validación del modelo, se llevaron a cabo una nueva serie de experimentos en medios optimizados. Las microfermentaciones se realizaron a escala de laboratorio en tubos de 50 mL, conteniendo extracto de bagazo a 3,641 °Bx, suplementado con 0,19 g L⁻¹ de sulfato de amonio e inoculadas con cultivos frescos de levaduras de manera de tener una densidad inicial en el medio de 1.10⁶ cél mL⁻¹. Los cultivos se incubaron a 25±0,1°C sin agitación. La cinética del proceso se caracterizó por determinaciones de densidad óptica en muestras del cultivo y el crecimiento de ambas especies se ajustó al modelo de Gompertz modificado. Para obtener una medida cuantitativa del rendimiento de los modelos, se calcularon los índices de validación (factor de precisión (FP) y factor de sesgo (FS)), según lo descrito por Mellefont y colaboradores (2003).

2.2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante ANOVA y test de Tukey HSD, previa evaluación de la distribución normal de los datos y de la homocedasticidad de las varianzas, considerando significativo un $p < 0,05$ y utilizando el programa STATISTICA 8. (StatSoft, 2007).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DEL BAGAZO DE MANZANA

Con el fin de conocer la composición del bagazo de manzana Red Delicious y el grado de heterogeneidad entre los diferentes lotes muestreados en diferentes meses del período productivo, se realizó un análisis sensorial y fisicoquímico (Tabla 2.3 y 2.4, respectivamente). El análisis sensorial evidenció propiedades esperadas para un material como el analizado. Por otra parte, los resultados fisicoquímicos evidencian que, aunque algunos parámetros como el porcentaje de humedad, los sólidos totales y el contenido de azúcar reductores muestran diferencias significativas, las concentraciones de compuestos de nitrógeno fácilmente asimilables, de importancia para el crecimiento de las levaduras y representadas por el contenido de Nitrógeno Fácilmente Asimilable y NH_4^+ , no presentan diferencias significativas entre los lotes en las condiciones ensayadas. (Tabla 2.4).

Tabla 2.3: Características sensoriales del bagazo de manzana variedad Red Delicious

Aroma	Intenso y característico de la manzana madura y sana.
Color	Intenso y homogéneo, característico de la manzana, se observó un ligero cambio de color, por el proceso natural de oxidación.
Sabor	Característico e intenso de la manzana madura y sana. Libre de cualquier sabor extraño.
Apariencia	Uniforme, libre de materiales extraños, admitiéndose una separación de fases y la presencia mínima de trozos, partículas oscuras propias de la manzana

Tabla 2.4: Caracterización fisicoquímica del bagazo de manzana variedad Red Delicious

Lote	1	2	3	4
Humedad (% m/m)	78,42 ± 0,46 ^a	80,77 ± 1,46 ^b	80,38 ± 0,41 ^{ab}	79,51 ± 0,71 ^{ab}
ST (% m/m)= 100 - H	21,58 ± 0,46 ^b	19,23 ± 1,46 ^a	19,62 ± 0,41 ^{ab}	20,49 ± 0,71 ^{ab}
pH	4,57 ± 0,01 ^c	4,42 ± 0,01 ^a	4,56 ± 0,04 ^c	4,49 ± 0,04 ^b
Aw (%)	99,9 ^a	99,9 ^a	99,9 ^a	99,9 ^a
AR (% m/m)	8,22 ± 0,5 ^a	11,1 ± 1,1 ^b	9,34 ± 0,5 ^{ab}	9,63 ± 0,6 ^{ab}
FAN (mg N kg ⁻¹)	124,8 ± 5,5 ^a	140,6 ± 5,2 ^a	126,3 ± 11,7 ^a	133,8 ± 9,4 ^a
NH_4^+ (mg kg ⁻¹)	0,27 ± 4,0 ^a	0,04 ± 0,1 ^a	0,07 ± 0,1 ^a	0,15 ± 0,1 ^a
PT (mg kg ⁻¹)	1375,5 ± 138,2 ^a	2176,24 ± 177,2 ^b	1688,96 ± 95,8 ^a	1546,78 ± 125,4 ^a

H: Humedad; ST: sólidos totales; aw: actividad acuosa; AR: azúcares reductores; FAN: Nitrógeno Fácilmente Asimilable; PT: polifenoles totales. Letras distintas corresponden a diferencias significativas $p < 0,05$, $n = 5$.

Particularmente, para la concentración de azúcares y de nitrógeno total, 1.000 g de bagazo de manzana Red Delicious mostraron un contenido de glucosa, fructosa y sacarosa de $22,48 \pm 0,25$ g, $57,71 \pm 0,14$ g y $18,48 \pm 0,12$ g respectivamente (determinadas por cromatografía líquida de alto rendimiento, HPLC, ver ítem 3.2.6.6 en Materiales y Métodos del Capítulo 3) y $1,1 \pm 0,1$ g de nitrógeno determinado por el método de Kjeldahl (Pearson, 1993), en todos los casos $n=4$.

2.3.2 DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

2.3.2.1 Selección de variables (DPB)

Con el objetivo de evaluar la potencialidad del bagazo de manzana como fuente de carbono (C) para ser utilizado como medio de cultivo en la propagación de la biomasa de las cepas de levaduras *Sc F8* y *Pk 15* se realizaron, de manera comparativa y por triplicado, dos Diseños Plackett Burman (DPB) para cada cepa, uno con bagazo de manzana y otro con melaza de caña.

Las variaciones en la respuesta explicada por los modelos fueron $90,90 \pm 0,11$ % y $91,36 \pm 0,06$ % para *Sc F8* en bagazo de manzana y melaza de caña, respectivamente, y $93,01 \pm 0,70$ % y $93,57 \pm 0,06$ % para *Pk 15* en las mismas fuentes de C, respectivamente. El error estándar total observado para el análisis fue inferior a 0,04 en todos los casos.

Los resultados evidencian que ambas levaduras mostraron valores similares $\mu_{\max}$ y A a las distintas concentraciones de la fuente de carbono ensayadas. Se obtuvieron los mismos resultados para los otros parámetros evaluados, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH, tiamina, ácido pantoténico, piridoxina, biotina, MnSO_4 , CaCl_2 , MgSO_4 , K_2HPO_4) donde el p-valor de cada uno de ellos siempre fue $>0,05$. Sin embargo, se observó un coeficiente de regresión positivo significativo para la fase de latencia (λ) en ambas levaduras y medio de cultivo de melaza ($4,425 \pm 0,231$ para b_1 de *Sc F8* y $3,823 \pm 0,222$ para b_1 de *Pk 15*, con $P < 0,05$) indicativo de que cuanto mayor es la concentración de melaza en los medios, mayor es el período de adaptación de la levadura, lo que prolonga los tiempos de fermentación. Este resultado sugiere la necesidad de la levadura de modificar su metabolismo para hacer frente al crecimiento en esa fuente de C. En el diseño realizado con bagazo de manzana no se observaron diferencias estadísticas. Tampoco se observaron diferencias en el valor de A de *Sc F8* obtenida en ensayos adicionales realizados con EBM 3,5 °Bx y 5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ complementados con concentraciones medias de los demás constituyentes o sin adición de éstos ($3,253 \pm 0,151$ y $3,356 \pm 0,123$ respectivamente, $n=2$ y $p > 0,05$) pero sí en los realizados con melaza de caña en las mismas condiciones ($2,034 \pm 0,110$ y $0,915 \pm 0,104$ respectivamente, $n=3$ y $p < 0,05$). Para *Pk 15* no se observaron diferencias en ningún medio ($3,091 \pm 0,232$ vs. $3,283 \pm 0,093$ en EBM y $1,044 \pm 0,108$ y $0,894 \pm 0,097$ en melaza).

Es importante destacar que un comportamiento particular de las levaduras fue observado en alguno de los medios de cultivo evaluados en el DPB. La Figura 2.1 muestra que cuando las levaduras crecen en bagazo de manzana, el máximo de biomasa alcanzado es independiente de la adición de fuentes nitrogenadas al medio de cultivo. Sin embargo, en las condiciones ensayadas, pero utilizando melaza como fuente carbonada, se evidenció una disminución significativa en el máximo de biomasa obtenido para ambas levaduras cuando el medio de cultivo no fue adicionado con nitrógeno.

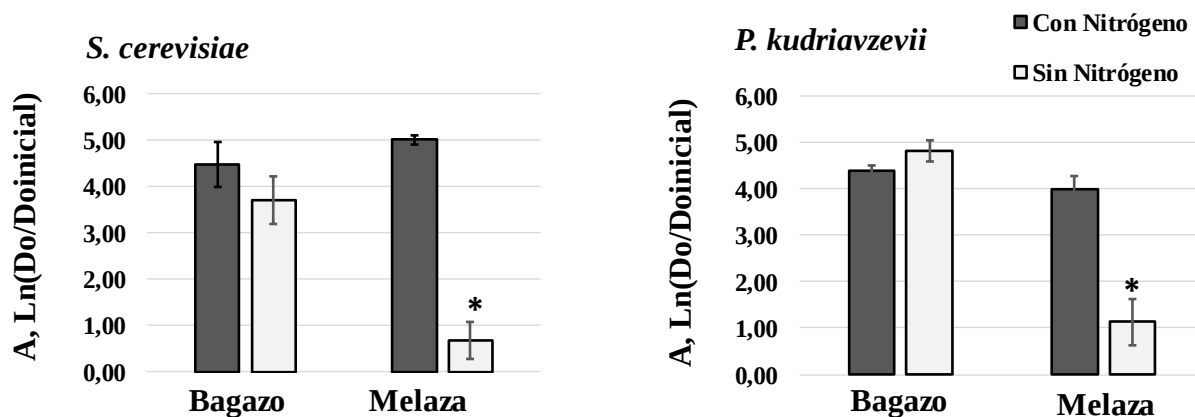


Figura 2.1: Comparación en el máximo de biomasa obtenido para medios de cultivo formulados con bagazo y melaza (6 °Bx), suplementados (10 g L⁻¹) o no con fuentes nitrogenadas. (*) Asterisco representa diferencias significativas entre tratamientos (p<0,05, n = 3).

2.3.2.2 Optimización de las variables (DCC)

Para continuar con el análisis de la composición del/de los medio/s a formular, se amplió el análisis sobre las concentraciones de carbono y nitrógeno utilizando un diseño compuesto central (DCC). En estos experimentos, y aunque estas variables no fueron significativas según el Diseño Plackett Burman, se expandieron los límites de concentraciones de las mismas con el objeto de detectar algún comportamiento diferencial de las levaduras en esos límites y optimizar los parámetros en el proceso. Los resultados muestran que, en las condiciones ensayadas, para *Sc* F8 y EBM no existen efectos significativos de las concentraciones de carbono y nitrógeno sobre los parámetros de $\mu_{\max}$ y λ (Tabla 2.5). No obstante, el parámetro de crecimiento A (biomasa máxima obtenida), presenta un coeficiente de regresión lineal negativo y significativo para la concentración de (NH₄)₂SO₄ indicativo de un desarrollo máximo en cultivos con la suplementación mínima de nitrógeno. Este efecto lineal negativo permite inferir que 0,19 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄ resulta el valor óptimo para el desarrollo de *Sc* F8 en EBM.

Por otro lado, cuando esta especie de levadura se cultivó en melaza de caña, el parámetro $\mu_{\max}$ se vio significativamente influenciado por ambas variables ensayadas, con coeficientes de regresión

cuadráticos negativos tanto para la fuente carbonada como para la nitrogenada ($p < 0,05$) evidenciando un requerimiento nutricional más exigente, con valores óptimos calculados en 3,28 °Bx para melaza y 14,99 g L⁻¹ para (NH₄)₂SO₄, respectivamente. El parámetro λ también mostró un efecto lineal y cuadrático significativo para la fuente de C e interacción significativa entre las fuentes C y N.

Tabla 2.5: Coeficientes de regresión estimados mediante el análisis ANOVA para el factor de respuesta Y: máxima densidad óptica alcanzada (A), máxima velocidad de crecimiento específico ($\mu_{\max}$), extensión de la fase lag de crecimiento (λ), obtenida en el Diseño Compuesto Central en función de la fuente carbonada (°Bx) y sulfato de amonio (g L⁻¹) para la levadura Sc F8

	Coeficiente de regresión	Bagazo de manzana			Melaza de caña		
		Valor	DE	p-valor	Valor	DE	p-valor
Sc F8 A	β_0 -Media/Intercep	0,120	0,638	0,859	0,039	0,266	0,890
	β_1 -Fuente carbonada lineal (1)	0,394	0,321	0,287	-0,081	0,134	0,577
	β_2 -Fuente carbonada cuadrát	0,079	0,430	0,862	0,084	0,179	0,665
	β_3 -lineal (NH ₄) ₂ SO ₄ (2)	-0,820	0,270	0,038	-0,193	0,113	0,161
	β_4 -cuadrático (NH ₄) ₂ SO ₄	0,601	0,285	0,102	0,164	0,119	0,239
	β_5 -Interacción 1*2	-0,610	0,427	0,226	-0,020	0,178	0,917
Sc F8 $\mu_{\max}$	β_0 -Media/Intercep	0,904	1,679	0,619	0,318	0,041	0,002
	β_1 -Fuente carbonada lineal (1)	-0,730	0,846	0,437	0,030	0,021	0,220
	β_2 -Fuente carbonada cuadrát	0,731	1,131	0,553	-0,163	0,028	0,004
	β_3 -lineal (NH ₄) ₂ SO ₄ (2)	0,918	0,712	0,267	0,039	0,017	0,090
	β_4 -cuadrático (NH ₄) ₂ SO ₄	0,085	0,749	0,915	-0,056	0,018	0,038
	β_5 -Interacción 1*2	-2,362	1,123	0,103	0,065	0,028	0,079
Sc F8 λ	β_0 -Media/Intercep	-3,386	10,136	0,755	2,384	7,060	0,753
	β_1 -Fuente carbonada lineal (1)	-8,043	5,106	0,190	-13,775	3,556	0,018
	β_2 -Fuente carbonada cuadrát	11,370	6,828	0,171	14,112	4,756	0,041
	β_3 -lineal (NH ₄) ₂ SO ₄ (2)	-0,278	4,300	0,952	3,035	2,995	0,368
	β_4 -cuadrático (NH ₄) ₂ SO ₄	0,143	4,524	0,976	-0,472	3,151	0,888
	β_5 -Interacción 1*2	1,495	6,780	0,836	-13,655	4,722	0,044

DE: desvío estándar. Los números en negrita representan valores estadísticamente significativos.

* Interacción entre las variables 1 y 2. Cuadrát = efectos cuadráticos.

Las superficies de respuestas obtenidas de estos ensayos y que muestran las diferencias señaladas se presentan en la Figura 2.2.

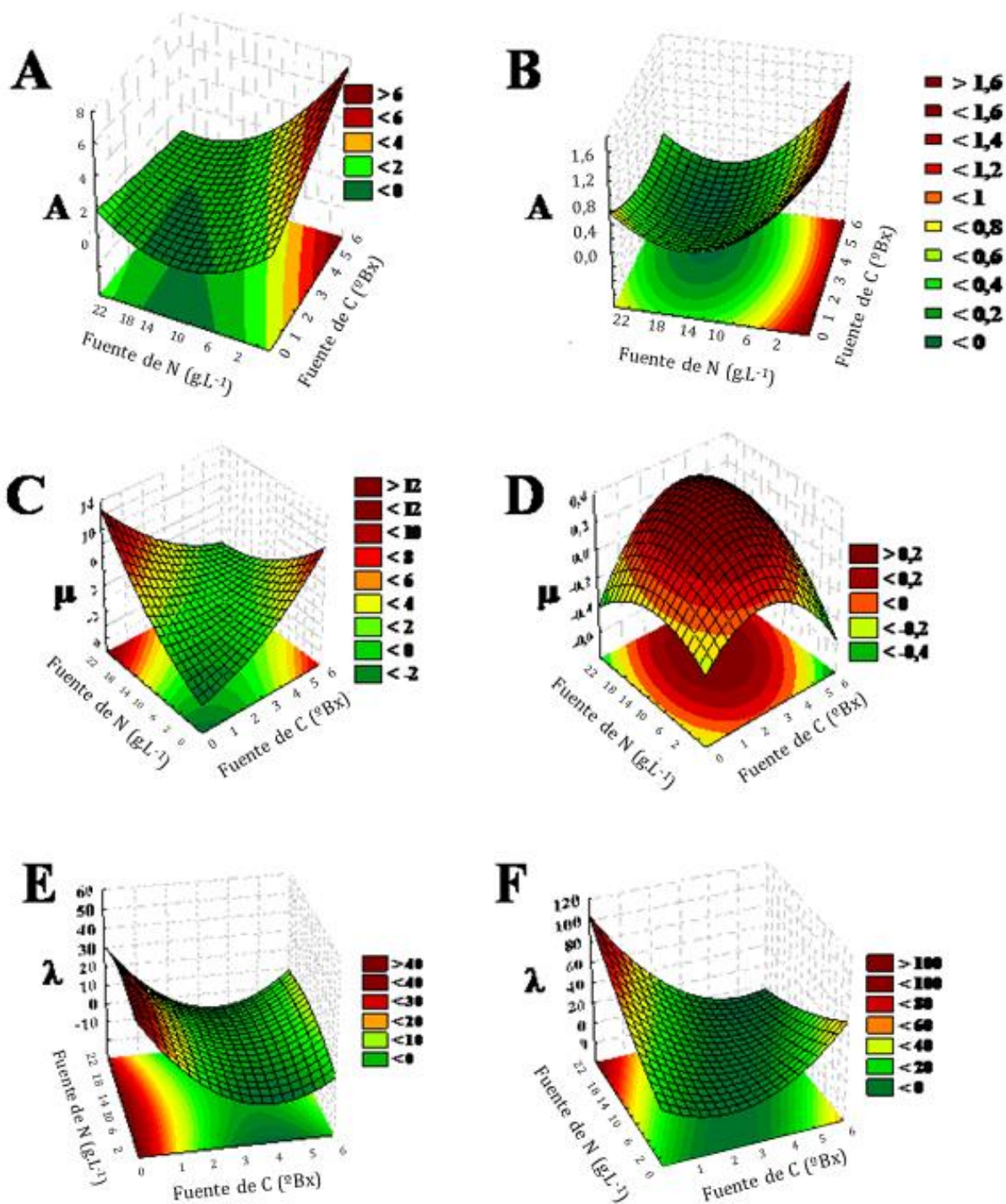


Figura 2.2: Parámetros de crecimiento y superficies de respuesta ajustadas para *Sc F8* utilizando como fuente de C bagazo de manzana (gráficos A, C y E) o melaza de caña, (gráficos B, D y F) y sulfato de amonio como fuente de N.

Respecto de los diseños realizados para *P. kudriavzevii*, la Tabla 2.6 muestra los resultados de la respuesta del microorganismo a la variación en los medios de cultivo evidenciando significativas diferencias en el comportamiento y la demanda nutricional de esta especie non-*Saccharomyces* respecto de *Saccharomyces*. *Pk* 15 desarrollada en extracto de bagazo de manzana mostró un coeficiente de regresión cuadrático negativo ($p < 0,05$) para la fuente de C y un coeficiente lineal negativo ($p < 0,05$) para la fuente de N significativos para el parámetro A, con valores óptimos de 3,641 °Bx y 0,19 g L⁻¹ para las fuentes C y N, respectivamente. Para el parámetro $\mu_{\max}$ se obtuvo un coeficiente de regresión lineal positivo significativo para la concentración de bagazo (°Bx), indicativo de una mayor velocidad de crecimiento cuando el bagazo es más concentrado (5,68 °Bx), y coeficientes lineal y cuadrático negativos para la concentración de N indicando un requerimiento mínimo de (NH₄)₂SO₄.

El ajuste del modelo para λ mostró un coeficiente de regresión lineal negativo para el bagazo, que puede explicarse por una mayor fase de retraso (mayor tiempo de fermentación) obtenida con una concentración más pequeña del sustrato C y un coeficiente lineal positivo con sulfato de amonio, lo que indica que la fermentación comenzó antes cuando la concentración de N fue más baja.

La Figura 2.3 muestra una representación gráfica de las superficies de respuesta ajustadas para *P. kudriavzevii* 15 mostrando respuestas más similares de esta cepa respecto de la fuente carbonada que *Sc* F8, aunque los valores de los parámetros deducidos de los gráficos son considerablemente diferentes.

2.3.2.3 Validación del modelo

Finalmente, la validación del modelo se realizó para bagazo de manzana con concentraciones de 3,641 °Bx como fuente de C y 0,19 g L⁻¹ como fuente de N. Se calcularon los índices de validación (FP, factor de precisión y FS, factor de sesgo) según Mellefont *et al.*, (2003) por la máxima biomasa obtenida en el proceso, observándose un buen comportamiento y reproducibilidad del modelo. *Sc* F8 reportó valores de 1,072 y 0,932 para FP y FS respectivamente. El factor de precisión proporciona una indicación de la extensión de los resultados sobre el valor predicho, por lo tanto, un factor de precisión de 1 (uno) representa una concordancia perfecta entre los valores observados y los valores pronosticados, siendo los valores "mayores que uno" menos precisos. Los resultados muestran una discrepancia de 7,2 y 6,7 % entre los valores predichos y los observados, incluyendo en esta evaluación, error experimental normal y variabilidad biológica. El factor de sesgo calculado se considera bueno en las evaluaciones de rendimiento del modelo. Por otro lado, los resultados de *Pk* 15 fueron 1,084 y 0,921 para FP y FS, respectivamente, mostrando una discrepancia de 8,4 y 7,8 % entre los valores predichos y los observados. El factor de sesgo (FS) para

ambas levaduras mostró valores muy cercanos a uno, con una ligera tendencia en el modelo a predecir menos producción de biomasa que la cantidad realmente obtenida.

Tabla 2.6: Coeficientes de regresión estimados mediante el análisis ANOVA para el factor de respuesta Y: máxima densidad óptica alcanzada (A), máxima velocidad de crecimiento específico ($\mu_{\max}$), extensión de la fase lag (λ), obtenida en el Diseño Compuesto Central en función de la fuente carbonada ($^{\circ}\text{Bx}$) y sulfato de amonio (g L^{-1}) para la levadura *Pk 15*.

	Coeficiente de regresión	Bagazo de manzana			Melaza de caña		
		Valor	DE	p-Valor	Valor	DE	p-Valor
<i>Pk15</i> A	β_0 - Media/Intercep	3,106	0,478	0,003	0,550	0,113	0,008
	β_1 -Fuente carbonada lineal (1)	0,520	0,245	0,101	0,077	0,058	0,256
	β_2 -Fuente carbonada cuadrát	-0,918	0,320	0,045	-0,202	0,076	0,056
	β_3 - lineal $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2)	-1,361	0,223	0,004	-0,182	0,053	0,026
	β_4 - cuadrático $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-0,629	0,257	0,071	-0,040	0,061	0,547
	β_5 - Interacción 1*2	-0,153	0,325	0,662	0,109	0,077	0,231
<i>Pk15</i> $\mu_{\max}$	β_0 - Media/Intercep	0,038	0,012	0,031	0,012	0,008	0,241
	β_1 -Fuente carbonada lineal (1)	0,025	0,006	0,013	0,004	0,004	0,378
	β_2 -Fuente carbonada cuadrát	-0,008	0,008	0,390	-0,005	0,006	0,391
	β_3 - lineal $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2)	-0,061	0,005	0,000	-0,011	0,004	0,053
	β_4 - cuadrático $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,034	0,006	0,005	0,010	0,004	0,093
	β_5 - Interacción 1*2	-0,005	0,008	0,556	0,006	0,006	0,372
<i>Pk15</i> λ	β_0 - Media/Intercep	2,839	8,330	0,750	4,836	8,748	0,610
	β_1 -Fuente carbonada lineal (1)	-16,507	4,266	0,018	-8,001	4,480	0,149
	β_2 -Fuente carbonada cuadrát	9,853	5,573	0,152	8,423	5,853	0,224
	β_3 - lineal $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2)	14,384	3,888	0,021	-2,297	4,083	0,604
	β_4 - cuadrático $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	7,221	4,473	0,182	-1,832	4,697	0,716
	β_5 - Interacción 1*2	-11,009	5,667	0,124	2,399	5,952	0,708

DE: desvío estándar. Los números en negrita representan valores estadísticamente significativos. * Interacción entre las variables 1 y 2. Cuadrát = efectos cuadráticos.

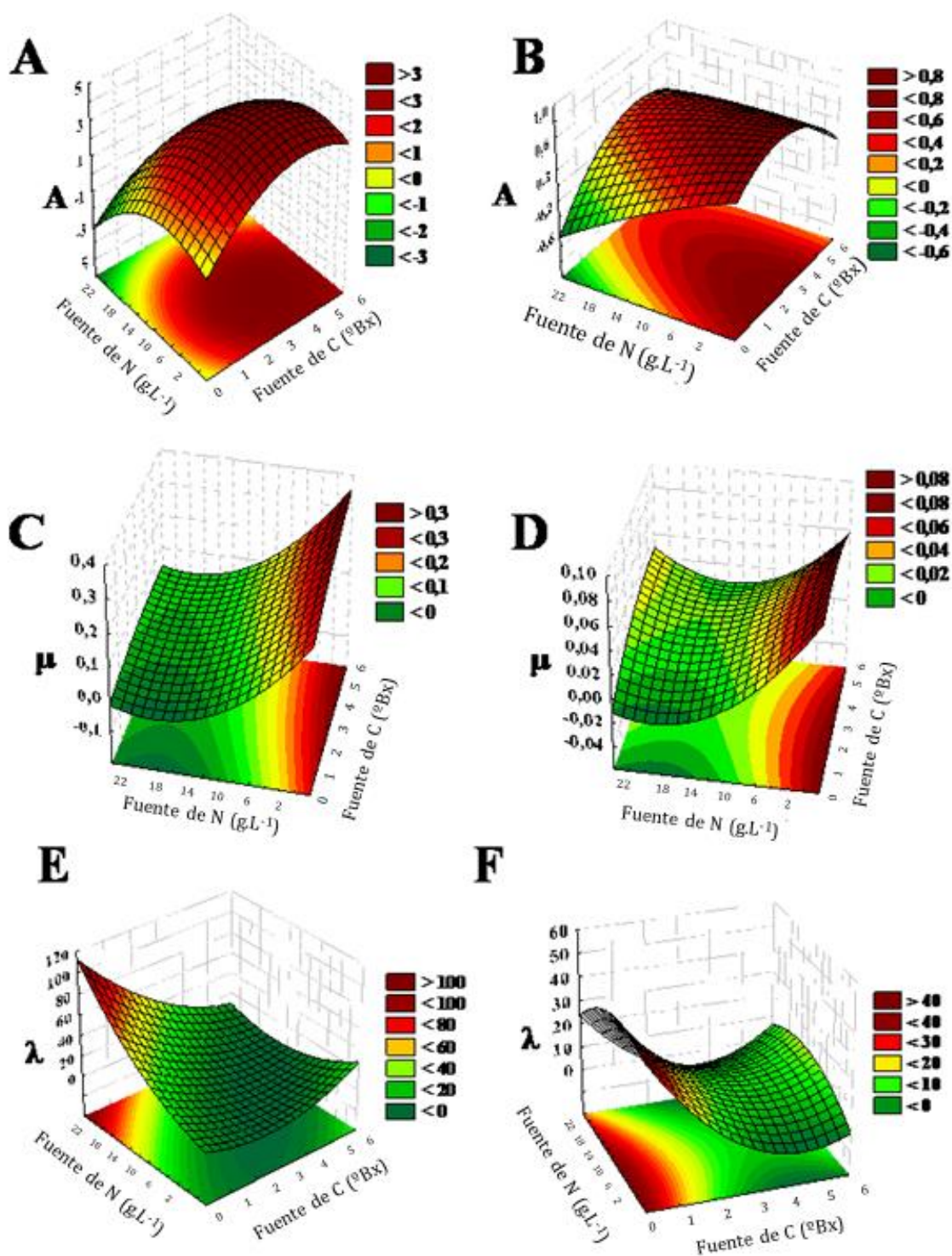


Figura 2.3: Parámetros de crecimiento y superficies de respuesta ajustadas para *Pk 15* utilizando como fuente de C bagazo de manzana (gráficos A, C y E) o melaza de caña, (gráficos B, D y F) y sulfato de amonio como fuente nitrogenada.

2.4 DISCUSIÓN

En los últimos años se está prestando mayor atención a los residuos de la industria de la fruta por ser materia prima renovable abundante y económica. El bagazo de manzana derivado de la producción de jugos exprimidos (*non from concentrate*) es un desecho/subproducto azucarado de muy bajo costo y su disponibilidad anual en la región del Comahue lo transforma en un potencial sustrato para la producción de biomasa de levaduras a escala industrial como alternativa a la melaza de caña históricamente utilizada.

En la producción de biomasa de levaduras, por las condiciones aeróbicas en las que deben conducirse los procesos, existe un riesgo alto de contaminación por hongos (Filtenborg *et al.*, 1996). El estricto control de la calidad de la fruta realizado por la empresa proveedora del desecho debido al producto que elabora (jugos exprimidos sin aditivos ni conservantes) garantiza un subproducto de muy buena calidad sanitaria (Tabla 2.3), fundamental para evitar contaminaciones de los cultivos de levaduras vínicas en la producción industrial. Por otra parte, los resultados obtenidos de su caracterización fisicoquímica (Tabla 2.4) además de ser consistentes con los reportados para manzanas regionales de su misma variedad Red Delicious (información provista por una juguera local, Jugos SA, www.jugossa.com, Villa Regina, Río Negro), evidencian un contenido de fuente carbonada en exceso en relación a lo requerido para el crecimiento óptimo de las levaduras, por lo que las diferencias observadas en esta fracción entre lotes carecen de importancia. Similar análisis podría realizarse para las variaciones de pH. Más allá de las diferencias significativas observadas entre lotes, todos presentan un pH adecuado para el crecimiento de las levaduras y perjudicial para el desarrollo de bacterias, permitiendo especular con una baja probabilidad de ocurrencia de contaminaciones bacterianas aunque no por hongos filamentosos, generalmente presentes en la cáscara de la fruta. La buena calidad sanitaria de la fruta procesada, característica señalada previamente, y una etapa inicial en condiciones de anaerobiosis en el proceso productivo, eliminaría esta posibilidad (Filtenborg *et al.*, 1996). Por otra parte, el contenido de nitrógeno total así como el contenido de nitrógeno fácilmente asimilable representado por la fracción FAN y el ión amonio (Tabla 2.4) no presenta diferencias entre lotes a lo largo del año. Los valores mínimos de las concentraciones de nitrógeno caracterizadas como ion amonio Tabla 2.4 evidencian que el FAN contenido en el bagazo de manzana se encuentra mayoritariamente en la forma de aminoácidos. En el jugo de manzana el contenido de aminoácidos está mayoritariamente representado por el ácido aspártico y la asparagina, dos aminoácidos que junto con el ácido glutámico son los preferentemente asimilados por *Saccharomyces cerevisiae* (Albers *et al.*, 1996). El contenido y la calidad de la fuente nitrogenada es determinante para el crecimiento de la levadura y la presencia

en la forma asimilable es un requisito importante durante la fase de crecimiento para maximizar la concentración de biomasa (Bely *et al.*, 1990; Albers *et al.*, 1996). En este contexto, las diferencias en la calidad fisicoquímica observadas entre lotes no comprometen, *a priori*, la calidad del bagazo como sustrato potencial para la propagación de biomasa.

Se diseñó entonces una segunda etapa experimental con el objetivo de evaluar al bagazo de manzana como sustrato alternativo a la melaza de caña para la propagación de células de levadura en un medio de cultivo real. La identificación y optimización de las variables que afectan la propagación de la biomasa realizada mediante diseños estadísticos experimentales eliminó las limitaciones presentadas por los enfoques experimentales que evalúan "una variable por vez" (Stanbury *et al.*, 1997; Singh y Satyanarayana, 2006). Los resultados obtenidos de ambos, el monitoreo para la selección (DPB) y la optimización (DCC y MSR) de variables brindan información importante sobre las fuentes de C evaluadas.

Los resultados de DPB y los presentados en la Figura 2.1 indican que, en las condiciones ensayadas, el bagazo de manzana no necesita de suplementos nutricionales adicionales para el máximo desarrollo de ambas levaduras indígenas *Sc* F8 y *Pk* 15. Este hecho es un hallazgo importante en el campo de la microbiología industrial, permitiendo inferir que un medio de cultivo a base de bagazo de manzana para la producción de la biomasa tendría un impacto bajo en el costo del proceso productivo de ambas levaduras. Por su parte, los resultados obtenidos en la optimización de los parámetros muestran diferencias significativas en el comportamiento del crecimiento de las cepas autóctonas determinados por el sustrato (Tablas 2.5 y 2.6 y Figura 2.2 y 2.3). Aunque la melaza, un subproducto de la industria azucarera, es una fuente de carbohidratos de bajo costo y ampliamente utilizada para la propagación de cepas de levaduras (Crueger y Crueger, 2000), las cepas locales de levaduras convencionales y no convencionales *Sc* F8 y *Pk* 15 presentan un mejor crecimiento en el medio bagazo de manzana que en el medio de melaza.

La melaza de caña de azúcar se ha usado tradicionalmente para bacterias (Beaulieu *et al.*, 1995; Agarwal *et al.*, 2016), algas (Liu *et al.*, 2012), hongos filamentosos (Ali *et al.*, 2002; Singh y Satyanarayana, 2006; He *et al.*, 2014), propagación de levaduras (Kida *et al.*, 1990; Bhosale y Gadre, 2001; Vohra y Satyanarayana, 2004) y la obtención de metabolitos secundarios. Sin embargo, la melaza presenta algunas restricciones en sus características nutricionales y organolépticas que en algunos casos exigen tratamientos previos, como la acidificación, la ebullición o la clarificación (Lee *et al.*, 1997; Bhosale y Gadre, 2001; Ali *et al.*, 2002; He *et al.*, 2014). Por otra parte, en los últimos años, el precio de la melaza aumentó significativamente debido a una derivación de su uso hacia otras aplicaciones industriales como la alimentación animal o la producción de bioetanol (Arshad *et*

al., 2008; Xandé *et al.*, 2010). Finalmente, las grandes distancias que separan a la región del Comahue de aquellas productoras de azúcar de caña donde se producen las melazas, determina una mayor logística para el transporte y la entrega de este subproducto, aumentando los costos de producción. En el contexto de un mercado globalizado y manejado por la demanda y con sobreoferta como es el sector vitivinícola (Roca, 2019), la producción de biomasa seca activa (LSA) de levaduras indígenas tendientes a elaborar vinos de calidad superior y diferencial es una necesidad. El hallazgo de sustratos alternativos para la propagación de las células de levaduras, de menor costo relativo que los tradicionales y más amigables con el medio ambiente como el bagazo de manzana, es un avance positivo para el desarrollo sostenible regional.

2.5 BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal, L., Isar, J., Meghwanshi, G.K. and Saxena, R.K. (2016). A cost effective fermentative production of succinic acid from cane molasses and corn steep liquor by *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*. 100:1348–1354.
- Albers, E., Larsson, C., Lidén, G., Niklasson, C. and Gustafsson, L. (1996). Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 3187– 3195.
- Ali, S., ul-Haq, I., Qadeer, M.A. and Iqbal, J. (2002). Production of citric acid by *Aspergillus niger* using cane molasses in a stirred fermenter. *Electronic Journal of Biotechnology* 5. ISSN 0717-3458.
- Arevalo-Villena, M., Briones-Perez, A., Corbo M.R., Sinigaglia, M. and Bevilacqua, A. (2017). Biotechnological application of yeasts in food science: Starter cultures, probiotics and enzyme production. *Journal of Applied Microbiology*. 123:1360-1372. doi:10.1111/jam.13548.
- Arroyo-Lopez, F.N., Orlic, S., Querol, A. and Barrio, E. (2009). Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid. *International Journal Food Microbiology*. 131:120–127.
- Arshad, M., Khan, Z.M., Khalil-ur-Rehman, Shah, F.A. and Rajoka, M.I. (2008). Optimization of process variables for minimization of by product formation during fermentation of blackstrap molasses to ethanol at industrial scale. *Lett Applied Microbiology*. 47:410–414.
- AOAC. (1990). Official Methods of Analysis.
- Beaulieu, M., Beaulieu, Y., Melinard, J., Pandian, S. and Goulet, J. (1995). Influence of ammonium salts and cane molasses on growth of *Alcaligenes eutrophus* and production of polyhydroxybutyrate. *Applied and Environmental Microbiology*. 61:165–169.
- Bely, M., Sablayrolles, J.M. and Barre, P. (1990). Description of alcoholic fermentation kinetics: Its variability and significance. *American Journal of Enology and Viticulture*. 41: 319–324.
- Bhosale, P. and Gadre, R.V. (2001). beta-carotene production in sugarcane molasses by a *Rhodotorula glutinis* mutant. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 26:327–332.

- Castillo-Castillo, Y., Ruiz-Barrera, O., Burrola-Barraza, M.E., Marrero-Rodríguez, Y., Salinas-Chavira, J., Angulo-Montoya, C., Corral-Luna, A. and Arzola-Alvarez, C. (2016). Isolation and characterization of yeasts from fermented apple bagasse as additives for ruminant feeding. *Brazilian Journal of Microbiology*. 47:889–895.
- Crueger, W. and Crueger, A. (2000). A substrate for industrial fermentation. *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology* eds. Crueger, W. and Crueger, A. 59–62.
- Dasgupta, D., Suman, S.K., Pandey, D., Ghosh, D., Khan, R., Agrawal, D., Jain, R.K. and Vadde, V.T. (2013). Design and optimization of ethanol production from bagasse pith hydrolysate by a thermotolerant yeast *Kluyveromyces* sp. IIPE453 using response surface methodology. *SpringerPlus*. 2:159.
- del Mónaco, S.M., Bravo, S.M.E., Curilén, Y.L., Carreño, V.A. and Caballero, A.C. (2014b). A regional starter for high quality wines: an Argentinean Patagonia experience. *Bulletin de l'OIV* 87 (998-999-1000):217–224. ISSN 0029-7127.
- del Mónaco, S.M., Rodríguez, M.E. and Lopes, C.A. (2015). *Pichia kudriavzevii* as a representative yeast of North Patagonian winemaking terroir. *International Journal of Food Microbiology*. 230:31-9.
- del Mónaco, S.M., Curilén, Y., Maturano, R.C., Bravo, S.M.E., Simes, A.B. and Caballero, A.C. (2016.). The use of indigenous yeasts to develop high-quality Patagonian Wines. En: *Morata A and Loira I Eds. Grape and Wine Biotechnology*. 325-344.
- dos Santos Lima, F.C., da Silva, F.L.H., Palmeira Gomes, J. and da Silva Neto, J.M. (2012). Chemical composition of the cashew apple bagasse and potential use for ethanol production. *Advances in Chemical Engineering and Science*. 2: 519–523.
- Értola, R., Yantorno, O. and Mignone, C. (2006). Microbiología industrial. OAS, Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, Washington, D. C.
- Filtenborg, O., Frisvad, J.C. and Thrane, U. (1996). Moulds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology*. 33: 85–102.
- Fleet, G.H. (2007). Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology*. 18:1–6.
- Gómez-Pastor, R., Pérez-Torrado, R., Cabisco, E. and Matallana, E. (2011). Transcriptomic and proteomic insights of the wine yeast biomass propagation process. *FEMS Yeast Reviews*. 10:870-884.
- He, J., Wu, A., Chen, D., Yu, B., Mao, X., Zheng, P., Yu, J. and Tian, G. (2014). Cost-effective lignocellulolytic enzyme production by *Trichoderma reesei* on a cane molasses medium. *Biotechnology for Biofuels*. 7:43.
- Kida, K., Asano, S., Yamadaki, M., Iwasaki, K., Yamaguchi, T. and Sonoda, Y. (1990). Continuous high-ethanol fermentation from cane molasses by a flocculating yeast. *Journal Bioscience and Bioengineering*. 69:39–45.
- Lee, I.-Y., Seo, W.T., Kim, G.J., Kim, M.K., Park, C.S. and Park, Y.H. (1997). Production of curdlan using sucrose or sugar cane molasses by two-step fed-batch cultivation of *Agrobacterium* species. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 18:255-259.

- Liu, J., Huang, J., Jiang, Y. and Chen, F. (2012). Molasses based growth and production of oil and astaxanthin by *Chlorella zofingiensis*. *Bioresource Technology*. 107:393–398.
- Marinova, D., Ribarova, F. and Atanassova, M. (2005). Total phenolics and total flavonoids in bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurg*, 40(3): 255-260.
- Mellefont, L.A., McMeekin, T.A. and Ross, T. (2003). Performance evaluation of a model describing the effects of temperature, water activity, pH and lactic acid concentration on the growth of *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*. 82:45–58.
- Myers, R.H. and Montgomery, D.C. (2002). Response surface methodology: product and process optimization using designed experiments, 2nd edn. New York: John Wiley & Sons.
- Nielsen, S. (2003). Food Analysis Laboratory Manual. Kluwer Academic.
- Nikel, P.I., Pettinari, M.J., Mendez, B.S. and Galvagno, M.A. (2005). Statistical optimization of a culture medium for biomass and poly (3-hydroxybutyrate) production by a recombinant *Escherichia coli* strain using agroindustrial byproducts. *International Microbiology*. 8:243-250.
- Pacheco, A.M., Gondim, D.R. and Goncalves, L.R.B. (2010). Ethanol production by fermentation using immobilized yeast cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 161: 209–217.
- Plackett, R.L. and Burman, J.O. (1946). The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*. 33:305-325.
- Pearson, D. (1993). Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza (España).
- Roca, P. (2019). Conjoncture Vitivinicole Mondiale 2018. Conference OIV. 11 de abril 2019.
- Rodríguez, T.H.S., Pinto, G.A.S. and Goncalves, L.R.B. (2008). Effects of inoculum concentration, temperature and carbon sources on tannase production during solid state fermentation of cashew apple bagasse. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 13:571-576.
- Santos Felix, A.C., Novaes, C.G., Pires Rocha, M., Barreto, G.E., do Nascimento, B.B. Jr and Giraldez Alvarez, L.D. (2018). Mixture design and doehlert matrix for the optimization of the extraction of phenolic compounds from *Spondias mombin* L apple bagasse agroindustrial residues. *Frontiers in Chemistry*. 5: 116.
- Silva, J.S., Mendes, J.S., Correia, J.A.C., Rocha, M.V.P. and Micoli, L. (2018). Cashew apple bagasse as new feedstock for the hydrogen production using dark fermentation process. *Journal Biotechnology*. 286: 71-78.
- Singh, B. and Satyanarayana, T. (2006). A marked enhancement in phytase production by a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* using statistical designs in a cost-effective cane molasses medium. *Journal Applied Microbiology*. 101:344–352.
- Sörensen, S. (1909). Enzyme Studies II. The Measurement and Meaning of Hydrogen Ion Concentration in Enzymatic Processes. *Biochemische Zeitschrift*. 131-134 and 159-160.
- Stanbury, P.F., Whitaker, A. and Hall, S.J. (1997). Principles of Fermentation Technology. 2:93–122.
- StatSoft, Inc. (2007). STATISTICA (data analysis software sytem). Version 8.0. www.statsoft.com.

- Vohra, A. and Satyanarayana, T. (2004). A cost-effective cane molasses medium for enhanced cell-bound phytase production by *Pichia anomala*. *Journal Applied Microbiology*. 97:471-476.
- Zhu, S., Huang, W., Huang, W., Wang, K., Chen, Q. and Wu, Y. (2015). Pretreatment of rice straw for ethanol production by a two-step process using dilute sulfuric acid and sulfomethylation reagent. *Applied Energy*. 154:190-196.
- Zwietering, M., Jongenburger, I., Rombouts, F. and Van't Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*. 1875-1881.

CAPÍTULO 3

Producción de Levaduras para Uso Enológico

Optimización del proceso de propagación de la biomasa y evaluación de su calidad

3.1 INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las industrias relacionadas con alimentos y bebidas fermentadas que utilizan levadura como insumo muestran preferencias por el uso de ésta en la forma de levadura seca activa (LSA) (Foerst y Santivarangkna, 2015). Esta forma de presentación mejora la estabilidad genética y disminuye el riesgo de contaminación a temperatura ambiente facilitando su manejo y disminuyendo los costos de transporte y almacenamiento (Chen y Chiger, 1985; Foerst y Santivarangkna, 2015). La producción de LSA conlleva el procesado de la biomasa de levadura hasta obtener un producto final con un porcentaje de humedad residual por debajo de 8 % (Reed y Nagodawithana, 1991). Aunque la deshidratación de las células aumenta la estabilidad del producto final, el desarrollo del proceso produce en ellas diferentes tipos de estrés, térmico, osmótico, y oxidativo (Gómez Pastor *et al.*, 2010), pasibles de provocar daños severos en sus macromoléculas y estructuras, afectando la fisiología celular, en particular su viabilidad y vitalidad (Morris *et al.*, 1986; Gervais *et al.*, 1992; Bayrock e Ingledew, 1997; Guyot *et al.*, 2006; Garré *et al.*, 2010). Estas pérdidas de viabilidad y vitalidad de las células, definidas como su capacidad para reproducirse y como la medida de la actividad metabólica relacionada con la robustez del cultivo, respectivamente (Rodríguez Porrata *et al.*, 2008), dependen no sólo de las características del proceso de secado/deshidratado (Taskila, 2017) sino del estado metabólico de las células al momento en que el agua es removida (Potts, 2001; de Anchieta Câmara Júnior *et al.*, 2018 y 2019). Una producción eficiente del cultivo iniciador, que asegure una mayor calidad del producto en términos de viabilidad y vitalidad, implica, entonces, tener una visión integral del proceso, de la interacción entre las distintas operaciones unitarias que constituyen el mismo y la identificación de las etapas decisivas (Bauer *et al.*, 2012). Adicionalmente al secado/deshidratación, cuya importancia ya se señaló, la otra etapa decisiva para la calidad del producto es la propagación de las células o fermentación (Foerst y Santivarangkna, 2015).

La influencia de las condiciones operativas (calidad del sustrato, pH, temperatura y aireación) sobre los aspectos cinéticos y productivos de la propagación de la biomasa se han descrito en el ítem 1.5 de la Introducción General. Adicionalmente, durante la etapa de propagación de la biomasa las células de levaduras están expuestas a un medioambiente dinámico capaz de generarles, según las condiciones en las que se opere, el estadio y/o sistema de cultivo, diferentes tipos de estrés, principalmente osmótico, oxidativo, y por limitación de nutrientes (Pérez Torrado *et al.*, 2005; Gamero Sandemetrio, 2016). Entre las múltiples respuestas generales y específicas a estos tipos de estrés, extensamente estudiadas en *S. cerevisiae* (Brewster *et al.*, 1993; Hohmann y Magger, 1997; Gamero Sandemetrio, 2016; Dawes y Perrone, 2020), se encuentran la expresión de genes que

codifican las enzimas destinadas a la eliminación de ROS (catalasas, superóxido dismutasas) así como enzimas involucradas en vías metabólicas que contribuyen al mantenimiento del estado redox celular (Gamero Sandemetrio, 2016; Pérez Torrado *et al.*, 2009) y en la síntesis de compuestos con capacidad de proteger a las células como el glicerol, cuya acumulación intracelular evita la salida de agua (deshidratación) de la célula (Hohmann, 2002), y la trehalosa.

La trehalosa es un disacárido no reductor constituido por moléculas de D (+) glucosa. Presente en una amplia variedad de organismos vivos, fue inicialmente considerada un carbohidrato de reserva, pero hoy se conoce que su acumulación en la células está estrechamente relacionada con la respuesta de éstas a situaciones de estrés (François y Parrou, 2001; Divatte *et al.*, 2017). En levaduras, el contenido intracelular de trehalosa puede superar el 25 % del peso seco de la célula dependiendo de las condiciones de crecimiento y del estadio del ciclo de vida (Kim *et al.*, 1996; Bolat, 2008) y su síntesis se ha relacionado con respuestas al estrés térmico (De Virgilio *et al.*, 1994; Magalhaes *et al.*, 2018), osmótico (Hounsa *et al.*, 1998) y oxidativo (Lewis *et al.*, 1997; Gamero Sandemetrio, 2016). Concentraciones intracelulares elevadas de trehalosa mejoran la viabilidad de las células frente a estos tipos de estrés mediante la estabilización de las membranas biológicas y protección de sus macromoléculas constituyentes. La incapacidad de reaccionar con aminoácidos y proteínas para dar la reacción de Maillard por su naturaleza no reductora y su capacidad de formar enlaces puente hidrógeno le permiten a la trehalosa interaccionar con las regiones polares de los constituyentes de las membranas biológicas, previniendo los eventos de transiciones de fases de la bicapa lipídica (Kim *et al.*, 1996) y protegiendo a las proteínas de la desnaturalización por deshidratación (Bolat, 2008); también está descrita su capacidad de prevenir la oxidación de los ácidos grasos insaturados constituyentes de los fosfolípidos y ocasionada por calor (Higashiyama, 2002). Por otra parte, está reportada la síntesis y acumulación intracelular de la trehalosa en respuesta al estrés nutricional generado por limitación de nitrógeno, fósforo o azufre (Lillie y Pringle, 1997) así como también la participación de esta molécula en ciertos aspectos regulatorios de la represión por catabolito de C y de N (Bolat, 2008), situaciones que pueden presentarse durante el proceso de propagación de la biomasa. Recientemente, de Anchieta Câmara Júnior y *et al.* (2018) reportaron que la acumulación de trehalosa intracelular generada por el cultivo de *S. cerevisiae* en medios nutricionalmente pobres mejora la resistencia de las células al secado en lecho fluidizado y aumentan su viabilidad en la rehidratación. En el caso de las levaduras vínicas estas mejoras en la calidad bioquímica del producto impactan positivamente sobre su eficiencia para conducir y completar adecuadamente el proceso de vinificación (Garre, 2008).

En este capítulo se describe cómo se ajustaron las condiciones operacionales para la propagación de células de las levaduras autóctonas *S. cerevisiae* F8 y *P. kudriavzevii* 15 en términos de optimizar la productividad y el rendimiento de sustrato en biomasa y la calidad bioquímica de ésta (contenido de trehalosa) en cultivos *batch* utilizando medio de cultivo a base de extracto de bagazo de manzanas (EBM) y se evaluó la calidad tecnológica y enológica de la biomasa obtenida mediante vinificaciones en tinto regionales a escala industrial (Bodega).

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 MICROORGANISMOS

3.2.1.1 Levaduras

S. cerevisiae F8 (Sc F8) y *P. kudriavzevii* 15 (Pk 15). Ambas cepas autóctonas de la Patagonia y de origen enológico (del Mónaco *et al.*, 2014 y 2015). Con fines comparativos (control) se realizaron vinificaciones conducidas con *S. cerevisiae* F15 (Laffort), cultivo iniciador comercial en la forma de LSA y el más frecuentemente utilizado en vinificaciones en tinto regionales, y *S. cerevisiae* BACOFER A (Tudela) una levadura nacional comercializada en forma líquida.

3.2.1.2 Reactivación de las cepas de levaduras y preparación de los cultivos de trabajo

Los cultivos de levaduras indígenas almacenados en glicerol al 20 % v/v y a -20 °C, se activaron en tubos de vidrio estériles de 10 mL de volumen, conteniendo 5 mL de caldo GPY (glucosa 10 g L⁻¹, peptona 10 g L⁻¹, extracto levadura 10 g L⁻¹ y pH 5,9) a 25±1 °C durante 12 horas con agitación. Seguidamente los cultivos se sembraron por agotamiento en superficie en placas de GPY agar (Figura 3.1). Entre 3 y 5 colonias de cada cepa, con buen desarrollo y confirmada su identidad a nivel de especie y cepa, se repicaron por siembra en estría en picos de flauta de GPY agar y se conservaron refrigeradas (heladera ≅4 °C) para la preparación de los inóculos.

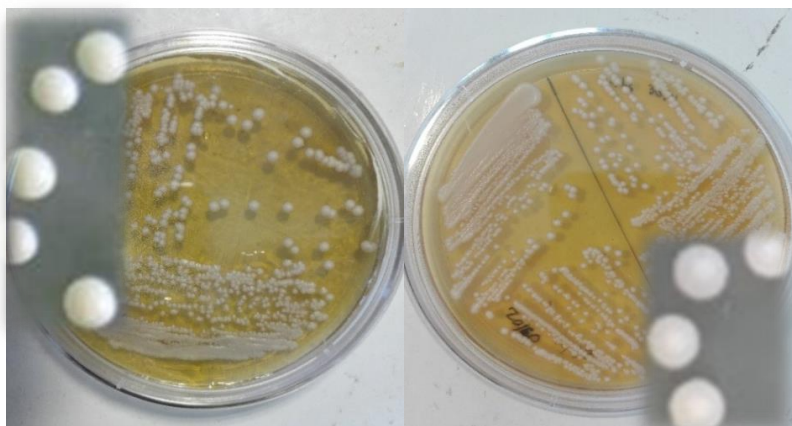


Figura 3.1: Placas de GPY agar de aislamiento en superficie de *S. cerevisiae* (izquierda) y *P. kudriavzevii* (derecha). En el margen de la imagen se observan las colonias luego de 72hs.

3.2.1.3 Identificación de levaduras y discriminación de cepas

La identidad de las levaduras a nivel de especie se realizó mediante la amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2 del complejo genético nuclear del ADNr por la reacción en cadena de la polimerasa y análisis del polimorfismo de sus fragmentos de restricción utilizando las endonucleasas *Cfo* I, *Hae* III y *Hinf* I (ITS1-5.8SADNr-ITS2 PCR-RFLP) (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999) y la discriminación de cepas por análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción del ADN mitocondrial utilizando la endonucleasa *Hinf* I (ADNmit RFLP) (Lopes *et al.*, 2007), los que se describen a continuación.

ITS1-5.8SDNAr -ITS2 PCR-RFLP utilizando las endonucleasas *Cfo* I, *Hae* III y *Hinf* I

La región fue amplificada en un termociclador Progene (Techne, Cambridge, UK) utilizando los cebadores ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') previamente descritos por White y colaboradores (1990). Cada colonia aislada y seleccionada fue tocada desde una placa de YEPD (extracto de levadura, peptona y dextrosa) utilizando un palillo estéril y resuspendida en 49 μ L de la mezcla de amplificación de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) conteniendo 1 μ L de solución acuosa, 50 μ M de cada cebador, 5 μ L de solución reguladora para *Taq* ADN polimerasa y 37 μ L de agua miliQ. Luego de un primer ciclo de 15 min a 95 °C, se adicionó a la mezcla 1 μ L de *Taq* ADN polimerasa (1U μ L⁻¹). Los parámetros del termociclador se fijaron conforme a lo descrito por Esteve-Zarzoso y colaboradores (1999). Los amplificados (10 μ L o 0,5-10 μ g) fueron digeridos sin previa purificación con las endonucleasas de restricción *Cfo* I, *Hae* III y *Hinf* I, de acuerdo con las especificaciones del proveedor. Los productos de PCR como también los fragmentos de restricción obtenidos fueron separados en geles de agarosa al 1,4 m/m % y 3 % m/m respectivamente, con tampón TAE (Tris Acetato EDTA) como solución reguladora de corrida. La electroforesis se realizó a un voltaje constante (80 V). Luego de la electroforesis, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (5 μ g mL⁻¹) y revelados bajo luz ultravioleta en un transiluminador (TFX-20M, Vilber Lourmat, Francia). Como marcador de peso molecular se utilizó una escala de fragmentos de 100-pares de bases (pb) de ADN.

ADNm-RFLP utilizando la endonucleasa *Hinf* I

A 15 μ L de ADN, obtenido como se explica a continuación, se agregaron 2 μ L de ARNasa, 1,5 μ L de la enzima de restricción *Hinf* I, 2,5 μ L de la solución reguladora apropiada para la enzima y 4 μ L de agua destilada estéril. Se incubó la mezcla durante 12-16 h a 37 °C. Los fragmentos se separaron por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1 % m/m, utilizando tampón TAE (Tris Acetato EDTA) (Fernández-Espinar *et al.*, 2000). Luego de la electroforesis, los geles se tiñeron con bromuro de etidio (5 μ g mL⁻¹) y se revelaron con luz ultravioleta.

Extracción del ADN total de levaduras *Saccharomyces*. Los aislamientos de levaduras se cultivaron en un tubo Eppendorf conteniendo 1 mL de medio GPY a 30 °C sin agitación durante toda la noche y la extracción del ADN se realizó conforme al protocolo propuesto por Querol *et al.*, (1992), con modificaciones menores, el que se describe a continuación:

1. Se centrifugaron las muestras a 8.000 g durante 5 min.
2. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 1 mL de agua destilada estéril y se centrifugó nuevamente en las condiciones anteriores. Este paso se repitió una vez más para lavar bien el sedimento de células.
3. Se descartó el sobrenadante y resuspendió el sedimento en 500 µL de la Solución 1.
4. Se añadieron 30 µL de una suspensión de Zimoliasa (Sigma) (1 mg mL⁻¹, 20.000 U g⁻¹) y se homogeneizó bien la suspensión con ayuda de una micropipeta.
5. Se incubó durante 20 min a 37 °C.
6. Se centrifugó a 10.000 g durante 3 min y se descartó el sobrenadante.
7. El sedimento se resuspendió con ayuda de la pipeta automática en 500 µL de Solución 2.
8. Se añadieron 13 µL de una solución de SDS al 10 % y se agitó en vórtex.
9. Se incubó a 65 °C durante 5 min.
10. Se añadieron 200 µL de acetato potásico 5 M/3 M y dejó en hielo durante 5 min.
11. Las muestras se centrifugaron a 20.800 g durante 15 min a 4 °C.
12. Se conservó el sobrenadante durante 15 min a -20 °C.
13. Se centrifugó nuevamente a 20.800 g durante 15 min a 4 °C y esta vez el sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorff con 700 µL de isopropanol.
14. Se agitó suavemente y se dejó a temperatura ambiente durante 10 min.
15. Se centrifugó a 15.300 g durante 15 min.
16. Se descartó el sobrenadante y se lavó el sedimento con 500 µL de etanol al 70 %.
17. Se centrifugó a 15.300 g durante 3 min.
18. Se secó el alcohol con ayuda de una bomba de vacío y se evaporaron los restos del alcohol a 37 °C durante 15 min aproximadamente.
19. Una vez seco, se resuspendió el sedimento en 15-17 µL agua miliQ estéril.
20. Se conservaron las muestras a -20 °C hasta su utilización.

Todas las centrifugaciones se realizaron en una centrífuga refrigerada Sorvall RC 50 Plus, Dupont (USA).

Soluciones**EDTA 0,5 M y pH 8** (stock para las demás soluciones)

Se disolvieron 186,1 g de etilen diamino tetracetato di sódico.2H₂O en 800 mL de H₂O destilada. Se ajustó el pH a 8,0 con NaOH (20 g aprox.) y se aforó a 1.000 mL con H₂O destilada.

Tris-HCl 1M y pH 8 (stock para las demás soluciones)

Se disolvieron 121,1 g de Tris-base en 800 mL de H₂O destilada y se añadieron 42 mL de HCl. Se dejó enfriar la solución y se ajustó el pH a 8,0. Se aforó a 1.000 mL con H₂O destilada.

SDS 10 % y pH 7,2 (stock para las demás soluciones)

Se disolvieron 100 g de SDS (grado electroforético) en 900 mL de agua destilada. Se calentó a una temperatura de 65-68 °C para que se disuelva bien. Se ajustó el pH a 7,2 con HCl. Se aforó hasta 1.000 mL con H₂O destilada.

Solución 1. (400 mL) (Sorbitol 0,9 M, EDTA 0,1 M)

Se preparó una solución de sorbitol 1 M (72,88 g de sorbitol en 400 mL de H₂O destilada). Se esterilizó la solución de sorbitol y se dejó enfriar. Cuando estuvo frío se mezclaron 372,27 g de sorbitol 1 M con 72,7 mL de EDTA 0,5 M.

Solución 2. (400 mL) (Tris-HCl 50 mM, EDTA 20 mM)

Se mezclaron 20 mL Tris-HCl 1 M con 16 mL EDTA 0,5 M. Se aforó a 400 mL con H₂O destilada y se ajustó a pH 7,4. Luego se autoclavó.

Acetato de potasio (5M/3M)

Se preparó una solución de acetato de potasio 5 M (se pesaron 58,94 g de acetato de potasio, se disolvió en 80 mL de H₂O destilada y se enrasó con agua destilada hasta 120 mL). Se tomaron 60 mL de esta solución y se añadió ácido acético glacial hasta pH 4,8, se enrasó con H₂O destilada hasta 100 mL.

Buffer TAE (25x) (Tris 1 M; Acetato de sodio 125 mM; EDTA 15 mM; pH 7,8-8)

Para un volumen de 500 mL, se preparó una solución con 60,5 g de Tris, 5,1 g de acetato de sodio, 9,3 g de EDTA y 3,75 mL H₂O destilada, luego se ajustó el pH a 8,0 con ácido acético glacial y se enrasó con H₂O destilada hasta 500 mL.

Para un volumen de 1.000 mL, se preparó una solución con 121 g de Tris, 10,2 g de acetato de sodio, 18,6 g de EDTA y 750 mL H₂O destilada, luego se ajustó el pH a 8,0 con ácido acético glacial y se enrasó con H₂O destilada a 1.000 mL.

3.2.2 PRODUCCIÓN DE BIOMASA A ESCALA DE PLANTA PILOTO

3.2.2.1 Biorreactor y accesorios

Los ensayos de cultivo se llevaron a cabo en un biorreactor de 20 litros de capacidad (New Brunswick™ BIOFLO 415 SIP Fermentor) totalmente construido en acero inoxidable, diseñado para un volumen de trabajo de 3 a 15 litros y conectado a una unidad de medición y control (software BIO COMMAND *Batch Control*, Alemania) (Figura 3.2).

El biorreactor es un fermentador versátil esterilizable en el lugar (SIP) y puede emplearse para cultivo discontinuo o continuo, aunque en este último caso se requieren accesorios no disponibles en el equipo instalado en la Facultad de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y PROBIEN, utilizado en esta tesis. El recipiente del fermentador consta de una placa frontal, una ventana de visualización y agitación magnética con impulsores Rushton. La placa frontal contiene puertos con la finalidad de inocular, adicionar base y ácidos, termo pozo para un sensor de temperatura, sensor de espuma, tubo de muestreo, condensador de escape y electrodos para medir porcentaje de oxígeno disuelto (OD) y pH. Para la aireación del medio de fermentación se utiliza un conducto que transporta aire estéril con 10 psi (70.000 Pa) de presión relativa hacia su interior utilizando un compresor. La temperatura se mide con una sonda, que se sumerge en el medio de cultivo dentro del fermentador, y se controla por una camisa refrigerada por la cual circula agua a 20 psi (140.000 Pa) de presión. Además, y como ya se señaló, todos los procesos de producción de biomasa se monitorean por un software (Programa: BIO COMMAND *Batch Control*, Alemania) que a la vez guarda los datos en una computadora conectada a la unidad de medición.

3.2.2.2 Esterilización de equipos y medios

Para eliminar el riesgo de contaminación se esterilizaron los medios de cultivo, el biorreactor y accesorios (puntas de pipetas automáticas, tubos, mangueras, agua destilada, embudos, etc.). El biorreactor conteniendo el medio de cultivo requerido para cada ensayo se esterilizó a 101.325 Pa y 120 °C durante 40 minutos. Los erlenmeyers de 250 mL de volumen, conteniendo 150 mL de medio de cultivo diluido a 3,6 °Bx para inocular al biorreactor, se



Figura 3.2: Biorreactor New Brunswick™ BIOFLO 415 SIP Fermentor.

esterilizaron a una temperatura de 120 °C durante 20 minutos en autoclave. Al finalizar cada ciclo completo de esterilización y con el fin de evaluar la efectividad del sistema automático de esterilización del biorreactor, se realizó, una siembra por agotamiento en superficie en placas GPYagar. El muestreo consintió en extraer 30 mL del medio de cultivo y sembrar 1 mL en superficie. Luego de 48 horas se verificó la presencia o ausencia de contaminación microbiana.

3.2.2.3 Preparación de los inóculos

Las cepas *Sc* F8 y *Pk* 15 procedentes de los picos de flauta GPY (cultivos de trabajo) se inocularon en tubos de ensayo conteniendo 10 mL del mismo medio, se cultivaron *over night* a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) y seguidamente se transfirieron a Erlenmeyers de 250 mL de volumen conteniendo 140 mL de los medios (Fermentador 1, F1). F1 se incubó a 25 ± 1 °C con agitación (150 rpm) en un baño termostatzado marca FAC, Modelo BT-40D DUBROFF (Industria Argentina) hasta alcanzar una concentración celular del orden de 10^8 cél mL⁻¹ (recuento en cámara de Neubauer). Finalmente 100-130 mL del inóculo se transfirieron asépticamente en el biorreactor.

3.2.2.4 Ensayos de propagación de la biomasa (Fermentaciones)

3.2.2.4.1 Ensayos iniciales (validación del medio de cultivo diseñado)

La propagación de la biomasa se llevó a cabo en el biorreactor utilizando en todos los casos un volumen de medio de cultivo de 10 L y sistema de cultivos por lote (*batch*). En estos ensayos el medio de cultivo fue extracto de bagazo de manzana (variedad Red Delicious) con 3,6 °Bx, suplementado con 0,19 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄ y pH 4,15. Las condiciones operativas que se evaluaron en los experimentos fueron caudal de aire (Q) y temperatura (T) de proceso. Los ensayos denominados S130 y P130 se realizaron con un caudal de aire de 1 SLPM (litro estándar por minuto) a una temperatura de 30 °C, los denominados S1030 y P1030 se realizaron con un caudal de aire de 10 SLPM y una temperatura de 30 °C y los S1025 y P1025 se realizaron con un caudal de aire de 10 SLPM y una temperatura de 25 °C. En todos los casos el tiempo de corrida fue 24 h. El pH de los procesos osciló entre 4,3-3,8 y la velocidad de agitación entre 200-400 rpm (Tabla 3.1). El crecimiento microbiano se siguió por absorbancia a 600 nm, recuento de células viables y/o recuento de totales y la cuantificación de los constituyentes de los medios de cultivo y fermentados por HPLC. Se determinaron los valores de la productividad volumétrica de biomasa (P_X : gramos de levadura por litro de medio producida en 24 h), el rendimiento de sustrato en biomasa ($Y_{X/S}$: gramos de levadura por gramo de azúcar consumido en el medio de cultivo) y a través del modelo de Gompertz modificado se obtuvo el valor de la fase lag (λ), la velocidad máxima de crecimiento específico (μ_{max}) y la máxima densidad óptica alcanzada, A (en unidades de absorbancia e igual a $\ln(DO_{\infty}/DO_0)$) como se describió en el Capítulo 2, ítem 2.2.5.1 de Materiales y Métodos.

Tabla 3.1: Ensayos de evaluación del medio de cultivo diseñado frente al cambio de escala en el biorreactor BIOFLO

Cinética	°Bx	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g L ⁻¹)	Q (SLPM)	T (°C)	V. A (rpm)	pH	OD (%)	cél (UFC mL ⁻¹)	tiempo (h)
S1025	3,6	0,19	10	25	200	4,2	20	10 ⁶	24
S1030	3,6	0,19	10	30	200	4,2	20	10 ⁶	24
S130	3,6	0,19	1	30	200-400	4,2	20	10 ⁶	24
P1025	3,6	0,19	10	25	200-400	4,2	20	10 ⁶	24
P1030	3,6	0,19	10	30	200-400	4,2	20	10 ⁶	24
P130	3,6	0,19	1	30	200-400	4,2	20	10 ⁶	24

Q: Caudal de aire. T: Temperatura. V. A: Velocidad de Agitación. OD: Oxígeno disuelto % de saturación. cél: células.

3.2.2.4.2 Ensayos de optimización de las condiciones del cultivo a escala piloto

Se realizaron una serie de experiencias *batch* y se evaluó la demanda de fuente nitrogenada. La propagación de la biomasa se llevó a cabo en el biorreactor utilizando en todos los casos un volumen de medio de cultivo de 10 L y sistema de cultivos por lote (*batch*). Para evitar potenciales efectos oxidativos en la etapa inicial, los procesos se iniciaron con un Q=2 SLPM fijándose la T en 30 °C y el pH en 5,00. Se siguió la evolución de la DO en el cultivo como indicativo de potenciales cambios metabólicos en las células en propagación (tendencia a aumentar la DO en el medio).

En el primero de los ensayos realizados, a las 6 h, 8 h y 10 h de iniciado el proceso, el EBM 3,6 °Bx se adicionó con 5 g, 2,5 g y 2,5 g de nitrógeno fácilmente asimilable, respectivamente, por lo que la disponibilidad total de nitrógeno en el medio de cultivo resultó de 12 g totales o 1,2 g L⁻¹ de N asimilable (menor concentración de (NH₄)₂SO₄ utilizada en el diseño de compuesto central, Capítulo 2 ítem 2.2.5.3). Mediante el manejo del caudal de aire y la agitación, el oxígeno disuelto se mantuvo próximo al 30 % de saturación. El pH se ajustó entre 5 y 6 mediante el agregado de cantidades adecuadas de una solución de NaOH 5 M. En función de los resultados obtenidos en este ensayo, se evaluaron la influencia de dos concentraciones de N asimilable 1,2 y 4,0 g L⁻¹ (aproximadamente la mayor concentración de (NH₄)₂SO₄ utilizada en el DCC, Capítulo 2 ítem 2.2.5.3) y de dos temperaturas (30 °C y 25 °C). En todos los ensayos el medio de cultivo base fue extracto de bagazo de manzana 3,6 °Bx y la fuente de nitrógeno (NH₄)₂SO₄. Los ensayos se realizaron por duplicado.

La evolución de las cinéticas se siguió por lecturas de la absorbancia a 600 nm de muestras de medio de cultivo de un mL tomadas con intervalos de una hora. Adicionalmente, en todos los ensayos se determinaron la productividad volumétrica de biomasa (P_x), el rendimiento de sustrato en biomasa (Y_{x/s}) y la calidad bioquímica de la biomasa propagada conforme al esquema de muestreo que se describe a continuación. A través del modelo de Gompertz modificado, se obtuvo el valor de los parámetros de la curva de crecimiento (Zwietering *et al.*, 1990).

Protocolo de muestreo. Antes y después de los agregados de nitrógeno en el ensayo de optimización, al inicio y final de todos los ensayos de propagación y a intervalos regulares de tiempo de 1-2 h o más del proceso (indicadas oportunamente en las figuras de Resultados) se tomaron por duplicado, diferentes volúmenes de muestras del medio de cultivo. Muestras de 50 mL se destinaron a la cuantificación del nitrógeno fácilmente asimilable contenido en el cultivo. Muestras de 10 mL y de 5 mL se destinaron a la cuantificación de la biomasa y compuestos carbonados y a la cuantificación del contenido de trehalosa intracelular. Desde una u otra de estas muestras se tomaron alícuotas de un mL para el recuento de células viables y totales. Seguidamente, todas las muestras se centrifugaron a 3.500 g durante 10 minutos utilizando una centrifuga de laboratorio (ROUTINE RMP-44, Argentina). Los sobrenadantes de las muestras de 50 y 10 mL se congelaron hasta el momento de su caracterización química por el método de Sörensen (FAN) y por HPLC (azúcares, alcoholes y ácidos), respectivamente. Ambos, los sedimentos de las muestras de 50 mL y los sobrenadantes de las muestras de 5 mL se descartaron. Los sedimentos procedentes de las muestras de 10 y 5 mL se lavaron dos veces con agua estéril y se destinaron a la determinación del peso seco y a la determinación del contenido endógeno de trehalosa, respectivamente.

3.2.2.4.3 Ensayos de producción

Estos ensayos se realizaron en cultivos por lote (*batch*) operados a 30 °C de temperatura, OD>26 %, pH = 5-6 utilizando como medio de cultivo EBM 3,6 °Bx conteniendo 1,2 g L⁻¹ y 4,0 g L⁻¹ de N asimilable adicionado en la forma de (NH₄)₂SO₄ para *S. cerevisiae* y *P. kudriavzevii*, respectivamente. El crecimiento microbiano se siguió por absorbancia a 600 nm, recuento de células viables y/o recuento de totales y la cuantificación de los constituyentes de los medios de cultivo por HPLC. Finalizados los ensayos, se determinaron los valores de la calidad microbiológica y bioquímica de la biomasa obtenida. Para la evaluación de la calidad tecnológica de la biomasa propagada, los lotes de cultivos se transportaron a una bodega y se utilizaron como cultivos iniciadores en vinificaciones en tinto.

3.2.3 DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO MICROBIANO

3.2.3.1 Concentración de levaduras. Absorbancia a 600 nm

Se utilizó un espectrofotómetro marca SHIMADZU modelo UV-1800 y se expresó como el logaritmo neperiano de la absorbancia relativa respecto del valor inicial, $\ln(DO_T/DO_0)$.

3.2.3.2 Recuento de levaduras viables cultivables

Se realizó por el método de las diluciones sucesivas. Un mL de la muestra original se adicionó a un tubo de ensayo conteniendo nueve mL de agua destilada estéril y se mezcló vigorosamente

(dilución 1/10 o 10^{-1}), seguidamente un mL de este tubo se transfirió a otro tubo conteniendo también nueve mL de agua destilada estéril (dilución 1/100 o 10^{-2}) y así sucesivamente hasta lograr una dilución de 10^{-6} . Seguidamente, alícuotas de 0,1 mL de la muestra original y de cada una de las diluciones se sembraron por diseminación en superficie en placas de Petri conteniendo entre 10-15 mL de GPY agar (glucosa 10 g L⁻¹, peptona 10 g L⁻¹, extracto levadura 10 g L⁻¹, agar 20 g L⁻¹ y pH 5,9). Las placas se incubaron a 25 ± 1 °C por 48 ± 2 h. Los ensayos se realizaron por duplicado (Figura 3.3).

Conteo e informe: a) se seleccionaron las placas que presentaban entre 30 y 300 colonias. Se contaron las colonias de cada placa. Se calculó de acuerdo con las diluciones el número de unidades formadoras de colonias UFC por mL de muestra, según la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{UFC}}{\text{mL}} = \frac{\text{Colonias contadas}}{\text{Volumen de muestra en las placas (mL)} \cdot \text{°N inverso de la dilución}} \quad \text{Ec. (3.1)}$$

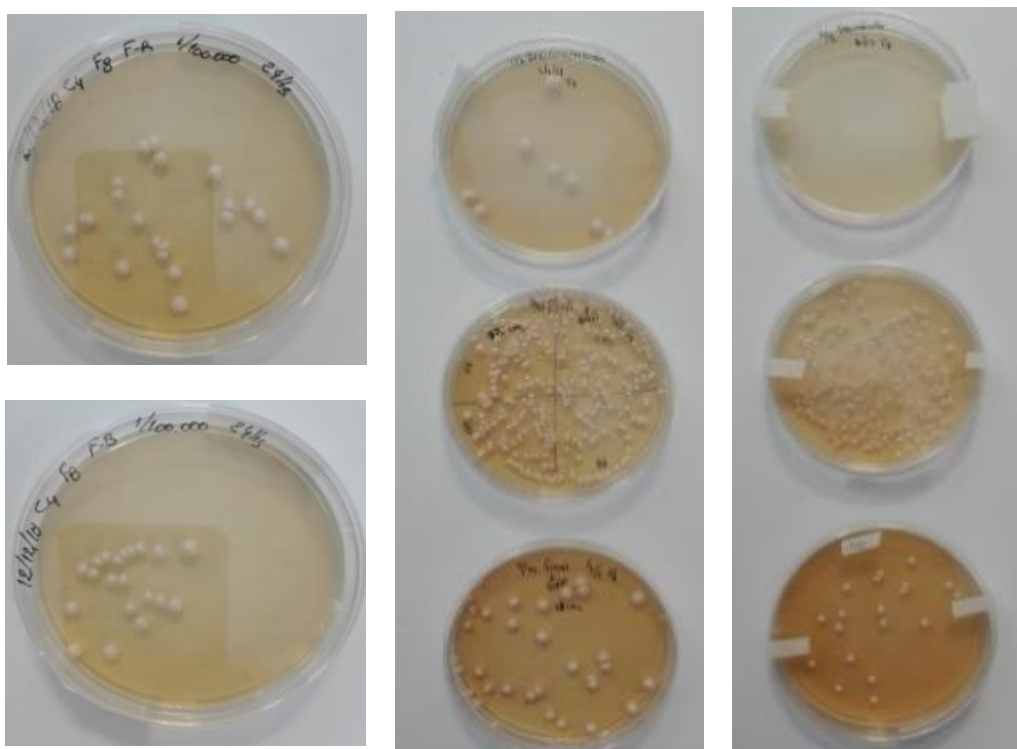


Figura 3.3: Recuento de levaduras viables por el método de las diluciones sucesivas y siembra en superficie. **Izquierda:** duplicados de una dilución. **Centro y Derecha:** placas en duplicados mostrando tres diluciones sucesivas de la misma muestra. Microorganismo: *S. cerevisiae*.

3.2.3.3 Recuento de totales

Se realizó en cámara de Neubauer utilizando un microscopio binocular Olympus III.

1. Preparación de la muestra. Dependiendo del tipo de muestra a evaluar, se preparó una dilución con una concentración apta para el recuento.

La muestra debe tener una concentración en torno a 10^6 (1 millón) aplicando las diluciones correspondientes. Por debajo de 250.000 ($2,5 \cdot 10^5$) células mL^{-1} la cantidad de células contadas no es suficiente para poder dar una estimación lo suficientemente confiable de la concentración celular. Por encima de 2,5 millones ($2,5 \cdot 10^6$) células mL^{-1} la probabilidad de cometer errores de conteo crece demasiado, y también el tiempo y esfuerzo necesario para realizar el recuento. Por encima de esta concentración es conveniente diluir la muestra para acercar la concentración al rango óptimo.

2. Recuento.

Cargado de la cámara de Neubauer. Se colocan con micropipeta 10 μL de la muestra preparada en el paso 1 entre la cámara y el cubre objeto.

Enfoque del microscopio y conteo

1. Se coloca la cámara de Neubauer cargada con la muestra en la bandeja del microscopio.
2. Se enciende la luz del microscopio y se enfoca con un aumento de 10x, enfocado el retículo de toma, se pasa a mayor aumento (Figura 3.4).
3. Se realiza el recuento de células en el primer cuadro.
4. Se repite el proceso para el resto de los cuadros que se contarán (5 en total), anotando el resultado de cada uno de ellos.

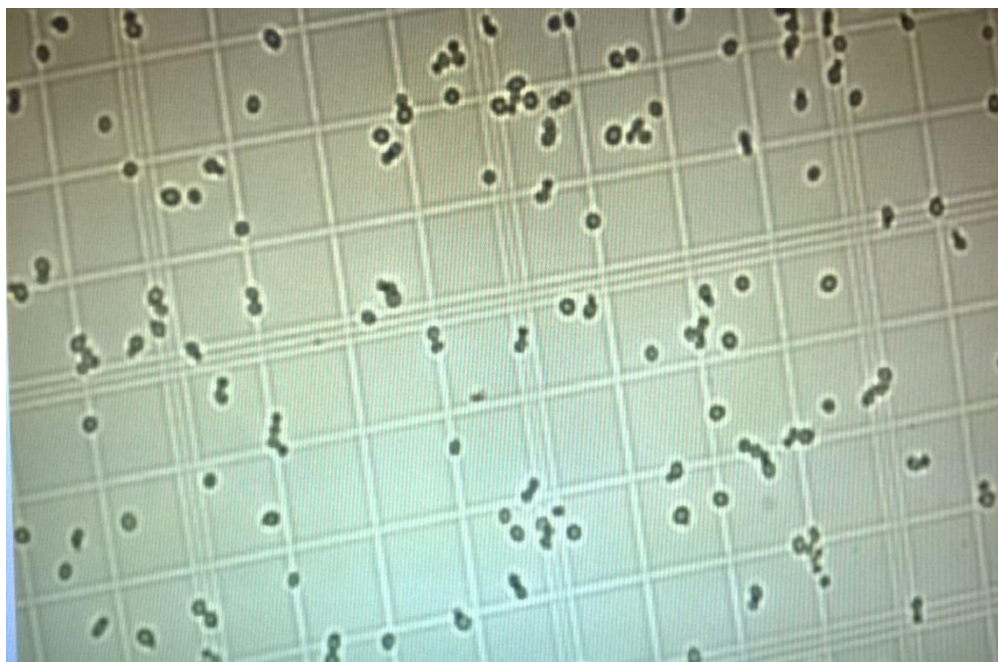


Figura 3.4: Recuento de células totales por microscopía de campo claro en cámara de Neubauer (400x). Microorganismo: *S. cerevisiae*.

3. Cálculo de la densidad celular

Fórmula del cálculo de concentración celular.

$$\frac{\text{Cél}}{\text{mL}} = \frac{\text{Número de células}}{\text{Volumen (mL)}} \quad \text{Ec. (3.2)}$$

El número de células es la suma de todas las células contadas en todos los cuadros.

El volumen es el volumen total de todos los cuadros donde se realizó el recuento.

El volumen de 1 cuadro grande es: 0,0001 mL.

La fórmula para recuento con cuadros grandes en cámara de Neubauer.

$$\frac{\text{Cél}}{\text{mL}} = \frac{\text{Número de células} \times 10.000}{\text{Número de cuadrados}} \quad \text{Ec. (3.3)}$$

En el caso de aplicar una dilución, se transformó la concentración obtenida durante el recuento celular en la concentración de la muestra original.

En este caso se dividió el resultado por la dilución aplicada.

Fórmula.

$$\frac{\text{Cél}}{\text{mL}} = \frac{\text{Número de células} \times 10.000}{\text{Número de cuadrados} \times \text{dilución}} \quad \text{Ec. (3.4)}$$

3.2.4 DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE DUPLICACIÓN, DEL PESO SECO, DE LA PRODUCTIBILIDAD VOLUMÉTRICA Y DEL RENDIMIENTO

El tiempo de duplicación (T_D), se determinó dividiendo 0,693 por la $\mu_{\max}$ de cada ensayo, ya que la cinética de crecimiento es de primer orden.

Para determinar la productibilidad volumétrica (P_x) se debe cuantificar el peso seco ya que,

$$P_x = \frac{\text{Peso levadura seca (g)}}{\text{Volumen de medio (L) x tiempo de proceso (h)}} \quad \text{Ec. (3.5)}$$

Para ello, los sedimentos procedentes de 10 mL de muestra del cultivo se transfirieron a tubos de centrifuga previamente pesados hasta peso constante y mantenidos en desecador (P1). Las muestras se centrifugaron en una centrifuga (Routine-RMP-44) a 3.500 x g durante 5 min y previo descarte del sobrenadante se volvieron a pesar (P2). Los gramos de biomasa húmeda correspondientes a 10 mL de cultivo se calcularon por diferencia de pesada (P2-P1). Seguidamente, los sedimentos se transfirieron a una cápsula de aluminio previamente pesadas hasta peso constante y mantenidas en desecador (PC1), y se secaron en estufa a 60 ± 2 °C hasta peso constante (PC2). Los gramos de biomasa seca correspondientes a 10 mL de cultivo se calcularon por diferencia de pesada (PC2-PC1).

El rendimiento ($Y_{x/s}$) representa la cantidad de sustrato que el microorganismo emplea para el crecimiento y no para funciones de mantenimiento. Se determinó el rendimiento, de la siguiente manera.

$$Y_{x/s} = \frac{\text{Levadura seca producida (g L}^{-1}\text{)}}{\text{Azúcar consumido (g L}^{-1}\text{)}} \quad \text{Ec. (3.6)}$$

Los gramos de azúcares consumidos se estimaron por diferencia de sus concentraciones entre el sobrenadante de la muestra del cultivo contenida al tiempo t y sus concentraciones en el sobrenadante de las muestras al inicio del cultivo (t_0) determinadas por HPLC.

3.2.5 EVALUACIÓN DE LA CALIDAD TECNOLÓGICA Y ENOLÓGICA DE LA BIOMASA OBTENIDA

La evaluación de la calidad tecnológica y enológica se realizó en entorno real mediante vinificaciones en bodega.

3.2.5.1 Vinificaciones

Las vinificaciones se realizaron en la BODEGA FAVRETTO, ubicada en la Región del Alto Valle, Provincia de Río Negro, Argentina utilizando mosto de uva variedad Malbec (*Vitis vinífera L*) como sustrato. La uva madura, sana y limpia se recolectó durante la Vendimia 2019, previa determinación del grado de madurez de las bayas realizado por personal de la bodega. La fruta molida, despalillada y sulfitada (mosto sulfitado) se desplazó mediante bombas a piletas de fermentación de 20.000 litros de volumen total, cargándose 15.000 litros de mosto.

Se elaboraron cuatro vinos distintos conforme a los protocolos de vinificación que se describen a continuación:

1. FA conducida por el cultivo iniciador autóctono Sc F8 (*S. cerevisiae* líquida)

La piletas de fermentación conteniendo 15.000 litros del mosto industrial descrito se inoculó con levadura Sc F8 propagada en el BIOFLO 415 en medio EBM de manera de obtener una densidad celular inicial en el mosto de 10^7 cél mL⁻¹.

2. FA conducida por el cultivo iniciador comercial BACOFER A (*S. cerevisiae* líquida)

La piletas de fermentación conteniendo 15.000 litros del mosto industrial descrito se inoculó con la levadura líquida BACOFER A (BA) de manera de tener una densidad celular inicial en la piletas de 10^7 cél mL⁻¹.

3. FA conducida por el cultivo iniciador comercial F15 (*S. cerevisiae* LSA)

La piletas de fermentación conteniendo 15.000 litros del mosto industrial descrito se inoculó con el cultivo puro de *S. cerevisiae* F15 (Laffort) en una proporción de 20 g de LSA por cada 100 L de mosto (densidad celular inicial estimada en el mosto inoculado, 10^7 cél mL⁻¹). La LSA fue

previamente rehidratada por resuspensión en agua a 30 °C en una relación de 10 veces su peso; transcurridos 20 minutos la suspensión se inoculó en el mosto de uva mediante remontaje con aireación. La cantidad de levadura rehidratada depende del volumen de mosto de uva a inocular.

4. FA conducida por el cultivo autóctono mixto *Pk 15 + Sc F8* (*P. kudriavzevii* y *S. cerevisiae* líquidas)

La pileta de fermentación conteniendo 15.000 litros de mosto industrial, se inoculó con el cultivos de las levaduras autóctonas *P. kudriavzevii* 15 y *S. cerevisiae* F8 en la forma de co-cultivo (inoculación simultánea) en una relación de densidades celulares *Pk: Sc* 100:1.

En todos los ensayos, las piletas se mantuvieron a 21 ± 3 °C hasta completar el secado del mosto (contenido de azúcares reductores totales, ART < 2 g L⁻¹). Seguidamente, los vinos fueron descubados y transferidos a otras piletas de igual tamaño y mantenidos a 20 ± 2 °C para permitir el desarrollo de la fermentación maloláctica, que en todos los casos se llevó a cabo en forma espontánea. Finalmente, los vinos se filtraron, estabilizaron y se embotellaron.

La cinética de la fermentación alcohólica se siguió diariamente por evolución de la densidad (°Bmé). Las densidades celulares iniciales (2 días después de la inoculación ≈ 13 °Bmé) y finales (ART ≤ 5 g) de la FA se determinaron por recuento de viables en GPY agar (1 % glucosa, 1 % peptona, 1 % extracto de levaduras, 2 % de agar y pH 5,0) utilizando el método de las diluciones sucesivas. Veinte colonias aisladas y bien desarrolladas procedentes de estos estadios por cada fermentación, se identificaron a nivel de especie por el método ITS1-5.8SADNr-ITS2 PCR-RFLP usando las endonucleasas *Cfo* I, *Hae* III y *Hinf* I (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999). La discriminación de cepas se realizó únicamente en *S. cerevisiae* mediante el análisis de los perfiles de restricción del ADN mitocondrial utilizando la endonucleasa *Hinf*I (Lopes *et al.*, 2007).

Finalmente, se realizó una prueba de preferencia de los consumidores de los vinos elaborados con F8, F15 y BA. Los vinos se rotularon con las letras A, B y C y los consumidores asignaron a cada uno un valor 1, 2 o 3 según su preferencia. Uno, el preferido en primer lugar, dos en segundo lugar y tres en tercer lugar. Para cada vino se obtuvo un promedio.

3.2.6 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE MEDIOS DE CULTIVO Y VINOS

3.2.6.1 Determinación de la gravedad específica (°Bmé)

Permite evaluar la concentración de azúcares en el mosto de uva. Se utilizó un mosto-densímetro Marca FITE calibrado a 15 °C que mide la gravedad específica de un mosto y permite estimar aproximadamente la graduación alcohólica del vino a elaborarse. Se colocaron 200 mL de mosto en una probeta de 250 mL de capacidad y se midió el °Bmé. La lectura se realizó en la tangente al menisco formado por la superficie del líquido.

3.2.6.2 Determinación de la concentración (°Bx)

Se determinó según el método 932.12 de la A.O.A.C, utilizando un refractómetro ABBÉ, marca ATAGO tipo 1. También se utilizó un refractómetro de mano, el cual tiene la ventaja de requerir poca cantidad de mosto para hacer la medición. Esta medida indica la concentración de sólidos solubles.

3.2.6.3 Determinación de pH (Método Potenciométrico)

Se determinó potenciométricamente utilizando un pHmetro ORION RESEARCH 231 (Orion Research Incorporated, Cambridge, MA).

3.2.6.4 Nitrógeno Fácilmente Asimilable (FAN)

Se determinó por el método de Sørensen (1908). El nitrógeno puede encontrarse en forma de catión amonio (NH_4^+), o en forma de nitrógeno orgánico como aminoácidos libres, polipéptidos y en menor proporción como nitrógeno amídico, nitrógeno nucleico y aminas biógenas (etilamina, histamina, etc.). El método consiste en adicionar un exceso de formaldehído que bloquea el grupo NH_4^+ y dejando libres los grupos carboxilo lo que hace disminuir el pH de forma proporcional a la cantidad de estos grupos en los compuestos nitrogenados del tipo de los aminoácidos.

Se colocaron 25 mL de muestra en un vaso de precipitado de 100 mL. Se lleva a pH 8,1 con NaOH 0,5 N. Luego, el pH de una solución de Formaldehído al 35 % se ajusta a 8,1 con NaOH 0,5 N. Se agregaron 10 mL de esta solución a la muestra. Se espera 1 minuto exacto, y se titula con NaOH 0,1 N en un pH-metro hasta pH=8,1.

El FAN se puede calcular a través de la siguiente ecuación:

$$\text{FAN (mg L}^{-1}\text{)} = 56 \cdot V_{\text{NaOH } 0,1\text{N}} \quad \text{Ec. (3.7)}$$

Siendo $V_{\text{NaOH } 0,1\text{N}}$ el volumen de NaOH 0,1 N, consumido en la titulación (mL).

OBSERVACIÓN: el Formaldehído al 35 % es relativamente inestable y se polimeriza disminuyendo el pH por lo que hay que ajustar su pH a 8,1 diariamente.

3.2.6.5 Cuantificación de la trehalosa intracelular

Los extractos para la cuantificación de trehalosa se obtuvieron según describen Parrou y François (1997). Diez miligramos de las células obtenidas por centrifugación de muestras del cultivo (ver en el ítem 3.2.2.4.2 el apartado Protocolo de muestreo) se pesaron en una balanza analítica a la cuarta cifra decimal y se resuspendieron en 0,25 mL de Na_2CO_3 250 mM, seguidamente se incubaron a 95 °C durante 4 horas. Tras este tratamiento se añadieron 0,75 mL de una mezcla de ácido acético 1 M y tampón acetato sódico 0,2 M pH 5,2 (1:4), se filtraron con filtros 0,5 μm y se congelaron en freezer a -20 °C hasta el momento de su cuantificación por HPLC. La cantidad de trehalosa intracelular se expresó en mg de trehalosa por g de peso seco de células. El peso seco se obtuvo secando las células en una estufa a 60 ± 2 °C como se describió en el ítem 3.2.4.

La cuantificación se realizó en un HPLC Agilent 1260 equipado con bomba cuaternaria, inyector automático, termostato de columna, detectores de índice de refracción. Para la cuantificación se utilizó el software: OPEN Lab CHEMSTATION. Se trabajó con las siguientes condiciones operativas: fase estacionaria Columna HIPLEX H, guarda columna (Dimensiones: 300 x 7,7 mm, 8 μ m); fase móvil gradiente isocrático 100 % H_2SO_4 0,001 M, flujo: 0,4 mL min^{-1} ; temperatura de columna 75 $^{\circ}\text{C}$; presión inicial 40,4 bar y final 39 bar; volumen de inyección: 20 μL y temperatura del detector: 55 $^{\circ}\text{C}$. El tiempo de retención de la trehalosa fue de: 13,64 min (Figura 3.5).

La cuantificación se realizó mediante una curva de calibración empleando trehalosa (Sigma Aldrich, pureza >99 %) y agua miliQ. Se preparó una solución madre y se realizaron sucesivas diluciones, las concentraciones de los puntos de la curva de calibración fueron entre 0,001 y 0,5 g L^{-1} (Figura 3.5).

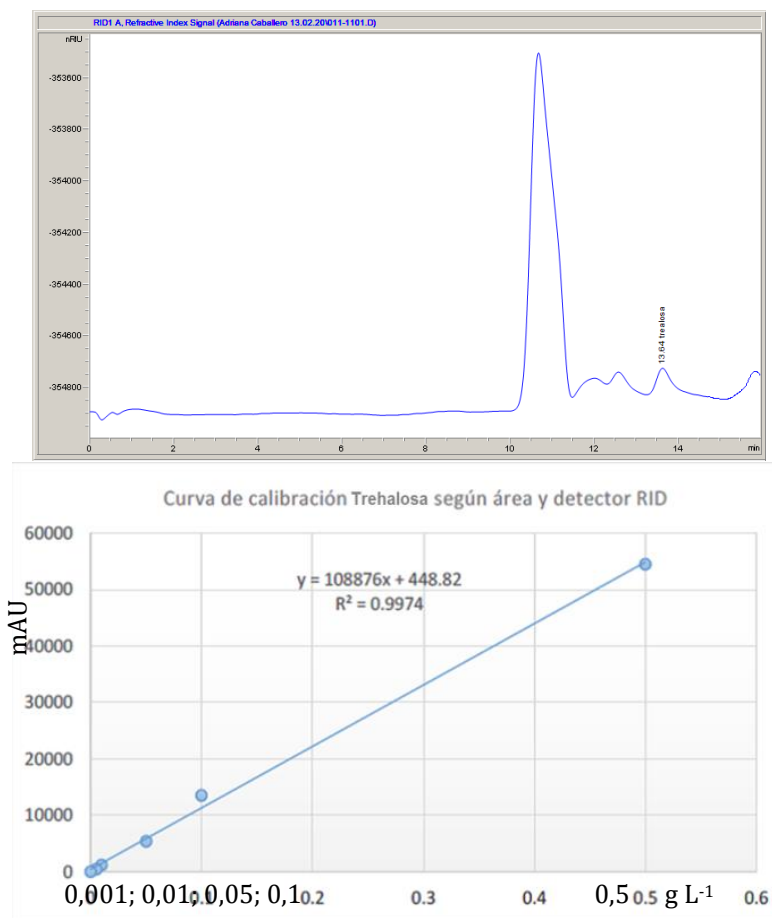


Figura 3.5: Cuantificación de trehalosa por HPLC utilizando un detector de índice de refracción (RID). **Arriba:** cromatograma. **Abajo:** curva de Calibración. Condiciones operativas en el texto.

3.2.6.6 Cuantificación de metabolitos en medios y vinos por HPLC

Las determinaciones se realizaron en el laboratorio de cromatografía del PROBIEN (CONICET-UNCo), Buenos Aires 1400, Neuquén, Argentina. Se utilizó un HPLC Agilent 1260 (Quat Pump VL, ALS, TCC, RID). El procesamiento de datos se llevó a cabo mediante el Software: OPEN Lab CHEMSTATION y la cuantificación de los compuestos se realizó por el método del estándar externo. Para ello se realizaron curvas de calibración preparando soluciones estándares para cada uno de los compuestos presentes en las muestras. La preparación y cuantificación de las muestras se realizaron por duplicado. Todos los solventes utilizados fueron grado HPLC. Para realizar el análisis fue necesario que las muestras recolectadas tanto de medios como de vinos, estuvieran libres de células y otros compuestos en suspensión, por esta razón, se utilizaron filtros esterilizantes (poro de 0,20 μm). Todos los resultados se informaron en gramos por litro (g L^{-1}).

Para la cuantificación se utilizaron dos métodos cromatográficos, los que se describen a continuación:

Método 1. Metabolitos cuantificados:

Azúcares: Glucosa y Fructosa.

Alcoholes: Etanol, Glicerol y Sorbitol.

Ácidos orgánicos: Ácido Acético, Ácido Málico, Ácido Cítrico, Ácido Tartárico, Ácido Succínico y Ácido Láctico.

Condiciones operativas. Fase estacionaria columna: HIPLEX H con guarda columna, dimensiones: 300 x 7,7 mm, 8 μm . Fase móvil: gradiente isocrático de composición 100 % H_2SO_4 0,001 M y flujo: 0,4 mL min^{-1} , temperatura de columna: 75 $^{\circ}\text{C}$, volumen de inyección: 20 μL . Detectores: RID (temperatura: 55 $^{\circ}\text{C}$) y detector de arreglo de diodos DAD (214 nm).

Tiempos de retención (min). Glucosa: 15,4; Fructosa: 16,9; Etanol: 32,4; Glicerol: 21,35; Sorbitol: 17,3; Ácido Acético: 23,9; Ácido Málico: 16,1; Ácido Cítrico: 13,06; Ácido Tartárico: 13,4; Ácido Succínico: 19,67; Ácido Láctico: 20,4. (Figura 3.6).

Método 2. Metabolitos cuantificados:

Azúcares: Sacarosa, Glucosa y Fructosa.

Condiciones operativas. Fase estacionaria: columna ZORBAX Carbohydrate, dimensiones: 150 x 4,6 mm, 5 μm . Fase móvil: gradiente: isocrático de composición: 75 % Acetonitrilo + 25 % H_2O y flujo: 1,4 mL min^{-1} . Temperatura de columna: 30 $^{\circ}\text{C}$. Volumen de inyección: 20 μL . Detector: RID. (Temperatura: 30 $^{\circ}\text{C}$).

Tiempos de retención (min). Sacarosa: 5,05; Glucosa: 3,53; Fructosa: 3,22. (Figura 3.7).

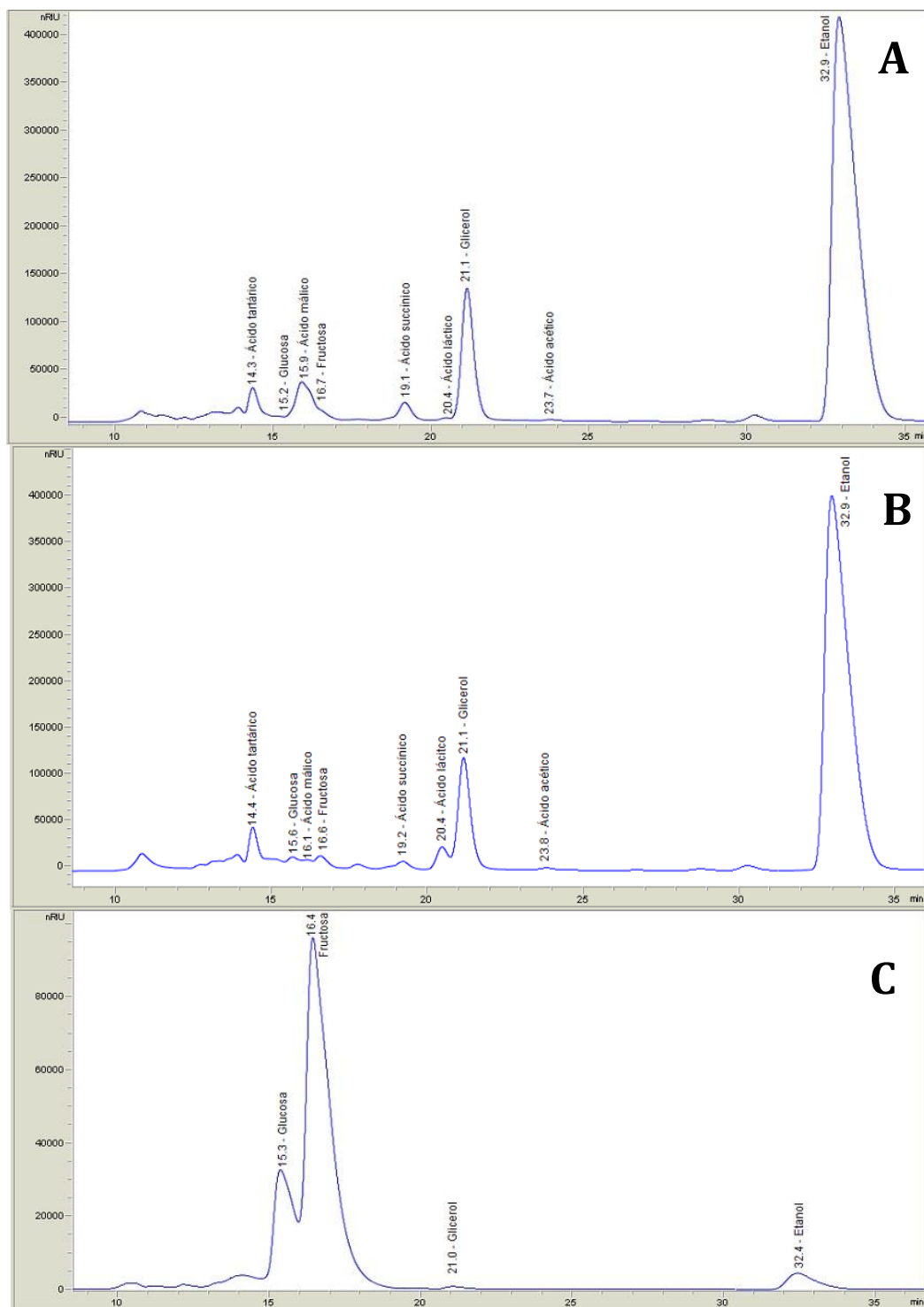


Figura 3.6: Cromatogramas de muestras de vinos y medios de cultivo. Condiciones operativas: fase sólida HIPLEX, fase móvil gradiente isocrático 100 % H_2SO_4 0,001M y flujo: 0,4 mL min^{-1} . Temperatura de columna: 75 °C. Detector RID. **A:** vino Malbec *S. cerevisiae* F8 finalizada la FA. **B:** Malbec *S. cerevisiae* F8 finalizada la FML. **C:** S1030 Medio extracto de bagazo de manzana 13 h fermentación. Obsérvese la buena reproducibilidad de los tiempos de retención.

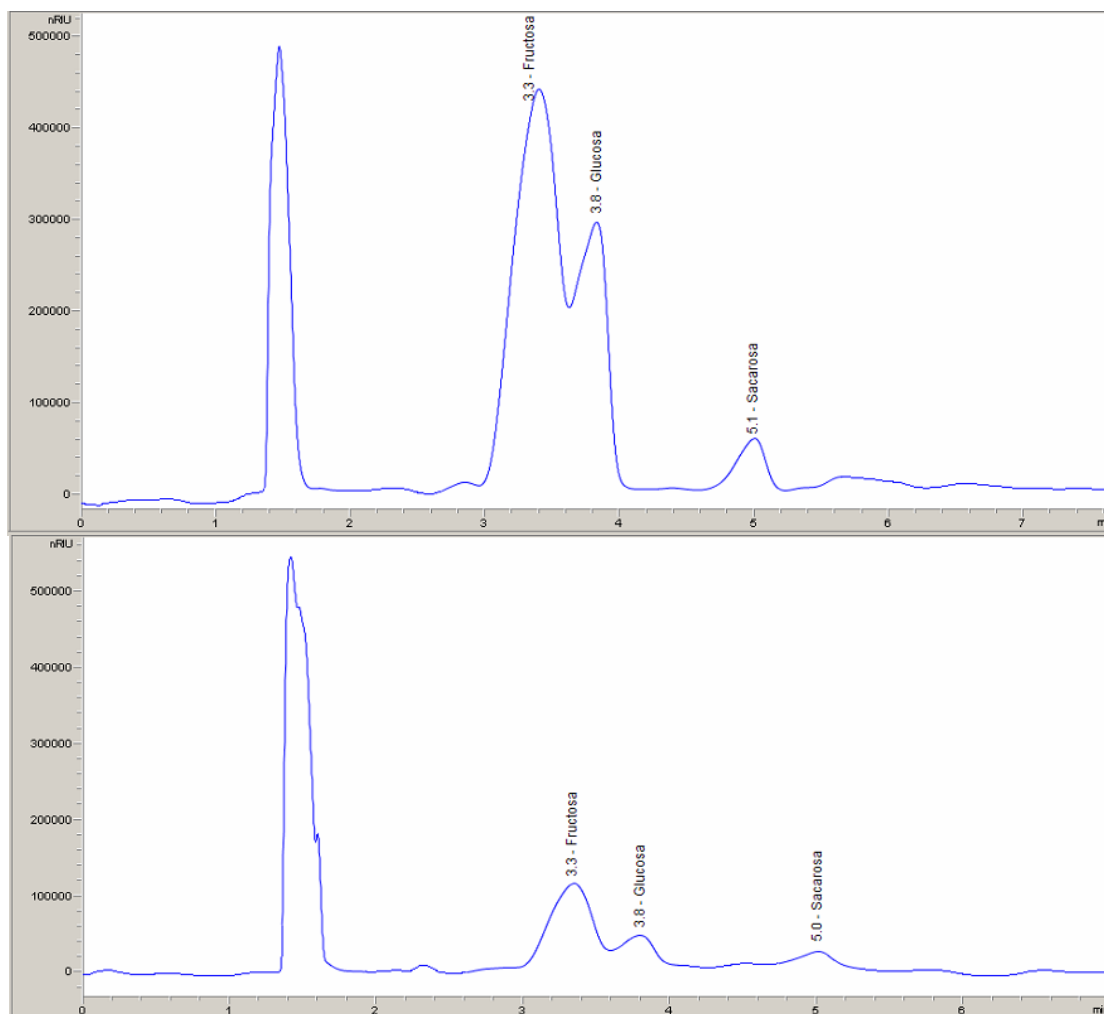


Figura 3.7: Cromatogramas de muestras de medios de cultivo fermentación S1025 y 3,6 °Bx extracto de bagazo de manzana suplementado con 6g de $(\text{NH}_4^+)_2\text{SO}_4$ ($1,2 \text{ g L}^{-1}$ de N) a las 10 h (arriba) y 17 h (abajo) de iniciada la fermentación. Condiciones operativas: columna ZORBAX Carbohydrate, fase móvil gradiente isocrático 75 % ACN + 25 % H_2O , flujo $1,4 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura de columna: 30°C . Detector RID. Obsérvese la buena reproducibilidad de los tiempos de retención.

Curvas de calibración para metabolitos cuantificados con la columna HIPLEX-H

Los compuestos D-(+)-Glucosa, D-(-)-Fructosa, Ácido L(-) Málico, Ácido L(-) Láctico, Ácido Acético y Glicerol fueron calidad Sigma Aldrich, pureza >99,5 %, el alcohol etílico absoluto (Etanol) fue Dorwil, pureza >99,5 % y el ácido L-(+)- tartárico fue RP ACS, pureza >99,5 %. En todos los casos se utilizó agua miliQ. La concentración de las soluciones patrones para la construcción de las curvas están indicadas en cada gráfico. Para los azúcares y alcoholes las curvas de calibración se confeccionaron según áreas y detector RID y para los ácidos orgánicos según áreas y detector DAD. (Figura 3.8).

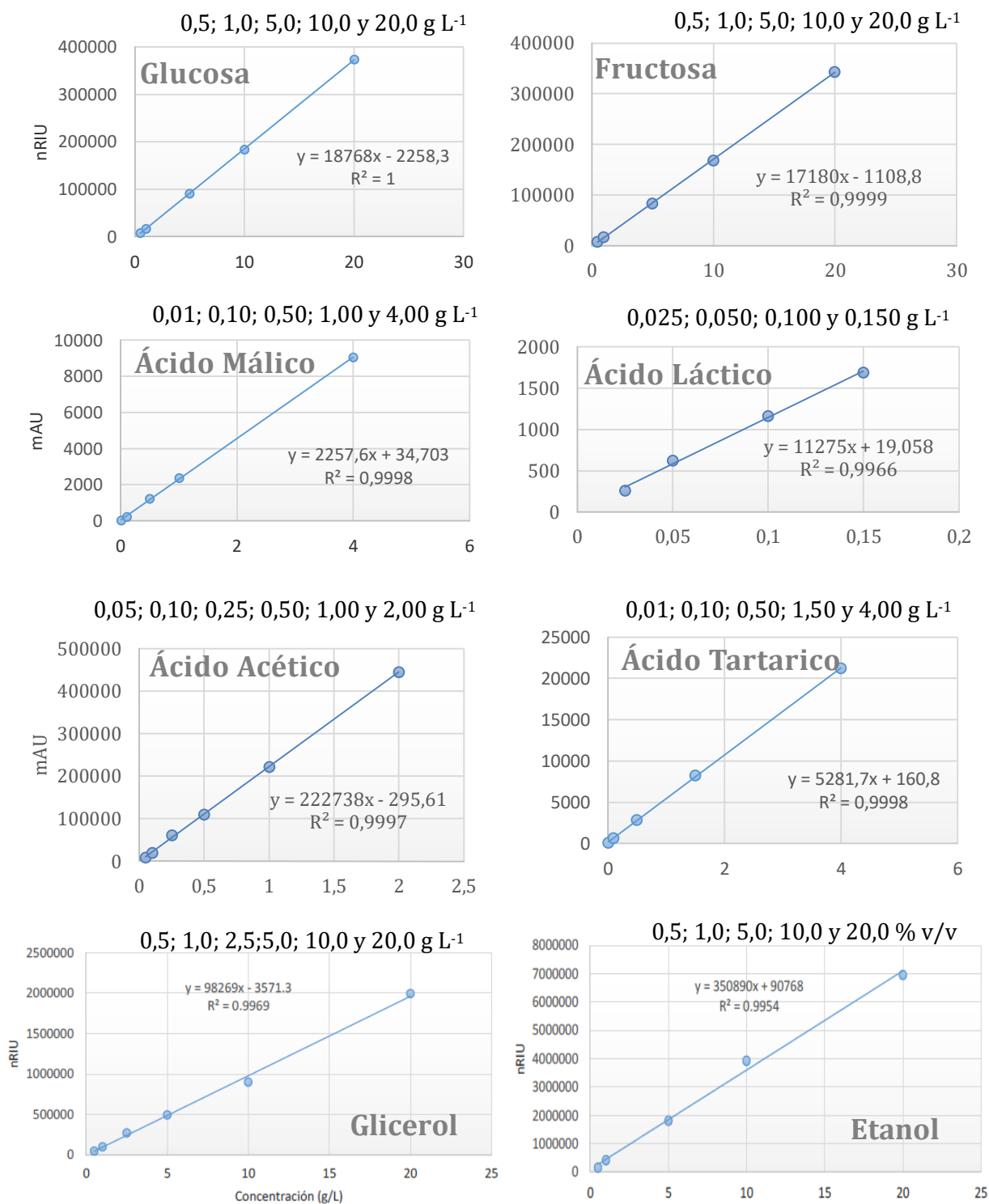


Figura 3.8: Curvas de calibración usando columna HIPLEX-H y detector RID (azúcares y alcoholes) o DAD (ácidos). En el margen superior de cada gráfico se indican las concentraciones de los patrones de las curvas de calibración.

Curvas de calibración para metabolitos cuantificados con columna ZORBAX Carbohydrate

Los compuestos D-(+)-Glucosa, D-(-)-Fructosa fueron calidad Sigma Aldrich, pureza >99,5 % y la Sacarosa marca Merck 1.07687.0250; lote: K46372987. En todos los casos se usó agua miliQ.

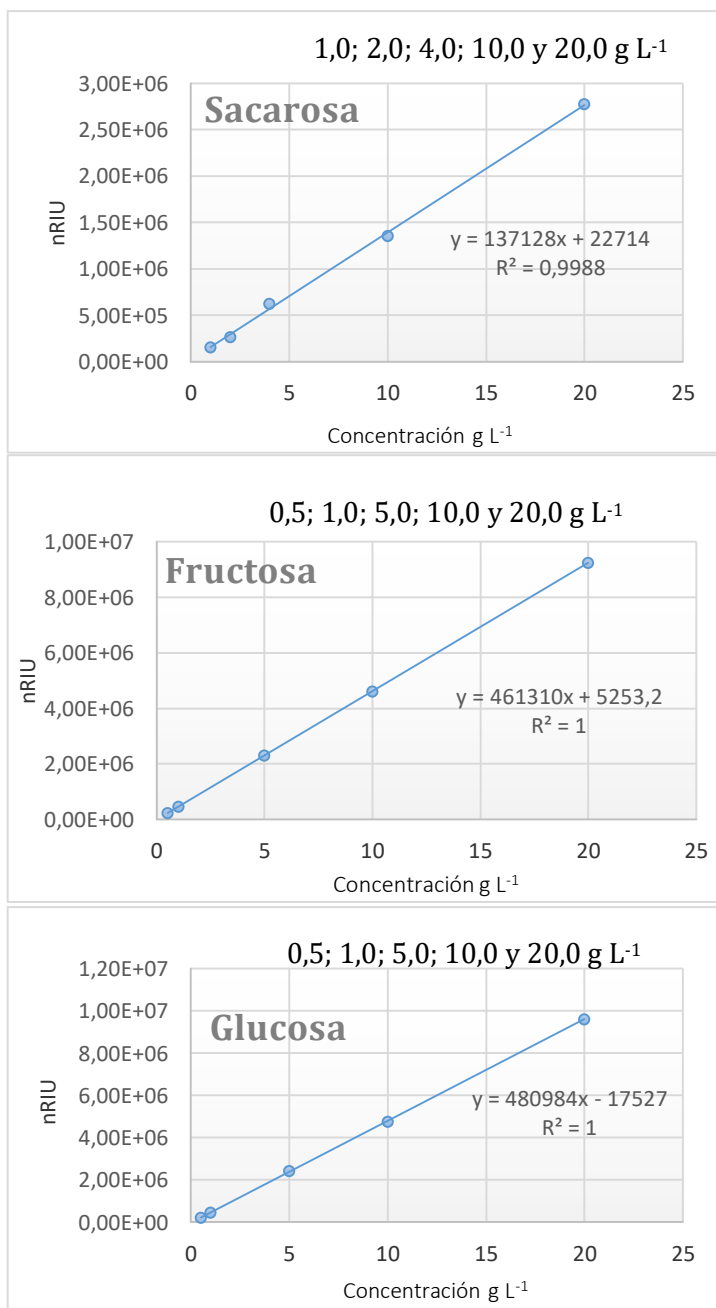


Figura 3.9: Curvas de calibración usando columna ZORBAX Carbohydrate y detector RID.

3.2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Previa verificación de los supuestos de normalidad de los datos y homocedasticidad de las varianzas mediante la pruebas de Lilliefors y Bartlett, respectivamente, los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA y prueba de Tukey de la diferencia significativa honesta (prueba de Tukey HSD). Aquellos datos que no cumplieron con el supuesto de homocedasticidad de las varianzas se analizaron mediante un modelo lineal general con varianza diferencial en los errores y prueba de comparaciones múltiples de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves (DGC) (Di Rienzo *et al.*, 2002). Todos los análisis estadísticos de los datos, incluido el análisis de componentes principales (PCA) para variables cuantitativas centradas y estandarizadas, se realizaron a través del software INFOSTAT (Di Renzo *et al.*, 2020).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 PROPAGACIÓN DE LA BIOMASA

Los ensayos iniciales tuvieron como objetivo evaluar a escala piloto la bondad del medio de cultivo en base a extracto de bagazo de manzana (EBM) diseñado a partir de ensayos realizados a microescala y ajustar parámetros operacionales particulares de la escala que afectan significativamente el crecimiento celular como son la aireación (disponibilidad de oxígeno) y la temperatura. En este marco, se decidió fijar dos valores para el caudal de aire (Q), 1 y 10 SLPM, regulándose el OD mediante el manejo de la agitación (se inició con 200 rpm), y dos temperaturas (T) de fermentación, 25 y 30 °C y evaluar sus influencias sobre la evolución del proceso fermentativo, la productividad y el rendimiento. Por otra parte, y mientras el bagazo de manzana es un subproducto/desecho industrial de calidad variable, estos ensayos se realizaron por duplicado con diferentes lotes de materia prima en cada réplica, permitiendo evaluar la reproducibilidad de los procesos en la escala ensayada así como también confirmar las diferencias entre extracto de bagazo y melaza observadas en los micro ensayos.

Los resultados cinéticos presentados en la Tabla 3.2 y en las Figuras 3.10 y 3.11 evidencian la capacidad del extracto de manzana para sostener el crecimiento de levaduras a escala piloto, aunque demuestran diferencias significativas entre cepas y entre tratamientos. Los valores obtenidos para las velocidades máximas de crecimiento específico evidencian, en general, una mayor velocidad de crecimiento de la levadura non-*Saccharomyces Pichia kudriavzevii* (P) respecto de *S. cerevisiae* (S). En consecuencia, el requerimiento de oxígeno es mayor en la primera especie que en la última y queda comprobado por la necesidad de aumentar la agitación en todos los ensayos de *Pichia* para mantener el OD por encima del 20 % de saturación en el cultivo, un

requerimiento sólo necesario para *Saccharomyces* en el ensayo de menor caudal de aire (Figura 3.10). No obstante, la capacidad de esta especie para adaptarse más rápidamente a las condiciones del cultivo es superior a la de *P. kudriavzevii* bajo todas las condiciones de ensayo (Tabla 3.2 y Figura 3.10) y ambas levaduras se adaptaron más rápidamente al medio de extracto de bagazo que al de melaza (Tabla 3.2 y Figura 3.11). En este último medio la $\mu_{\max}$ de *S. cerevisiae* es significativamente menor que en EBM.

Tabla 3.2: Parámetros de crecimiento para las cepas *S. cerevisiae* (S) y *P. kudriavzevii* (P) obtenidos mediante el modelo de Gompertz modificado a partir de los ensayos iniciales de propagación realizados a escala piloto (10 L), en sistema *batch* y diferentes combinaciones de caudal de aire (1 o 10 SLPM) y temperatura (25 o 30 °C) utilizando extracto de bagazo de manzana o melaza (M) como medio de cultivo

Cinética	R ²	λ	$\mu_{\max}$	A
S1025	0,98	0,68±0,15 ^d	0,51±0,00 ^b	6,24±0,02 ^b
S1030	0,99	0,00±0,00^e	0,68 ±0,02^a	6,55±0,00^a
S130	0,99	0,17±0,08 ^e	0,68±0,04 ^{ab}	5,15±0,01 ^d
SM1030	0,99	1,37±0,00 ^c	0,41±0,01 ^c	4,13±0,03 ^e
P1025	0,99	3,22±0,15 ^a	0,71±0,05 ^a	5,93±0,00 ^c
P1030	0,99	0,16±0,10^e	0,68±0,03^a	6,24±0,03^b
P130	0,99	1,69±0,04 ^b	0,73±0,00 ^a	5,97±0,07 ^c
PM 1030	0,99	1,08±0,06 ^c	0,70±0,00 ^a	5,98±0,01 ^c

λ : extensión de la fase de latencia o fase lag (h); $\mu_{\max}$: velocidad máxima de crecimiento específico (h⁻¹); A: máxima producción de biomasa. Medias con letras iguales no son significativamente diferentes (p>0,05), modelo lineal general y prueba de DGC con n=2.

En particular, en los cultivos con EBM, *P. kudriavzevii* mostró velocidades máximas independientes de las condiciones ensayadas (Q, T y calidad del medio) aunque su capacidad de adaptarse a las condiciones del medio fue afectada significativa y positivamente por la temperatura y la aireación (Tabla 3.2). En tanto para *Saccharomyces* se observó un efecto positivo de T sobre ambas, la velocidad máxima de crecimiento específico y sobre la fase lag. Respecto de la producción de biomasa, los valores obtenidos para A fueron consistentes con los observados para $\mu_{\max}$ y λ de sus mismos ensayos, resultando máxima para ambas cepas cuando la temperatura es 30 °C y el caudal 10 SLPM (Tabla 3.2).

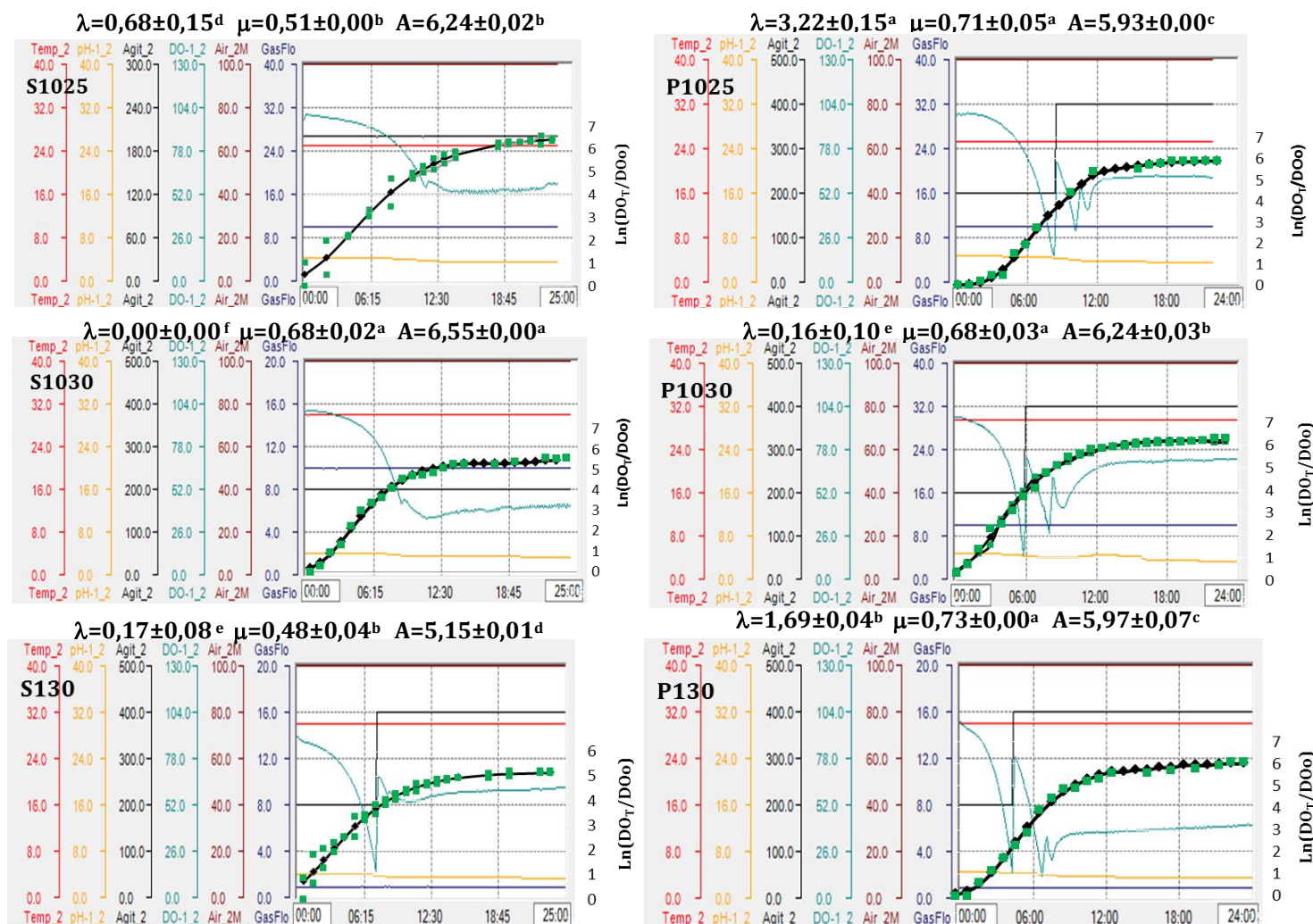


Figura 3.10: Evolución y parámetros cinéticos de los ensayos iniciales de propagación de la biomasa de *S. cerevisiae* F8 (S) y *P. kudriavzevii* 15 (P) en cultivos batch a escala piloto (10 L) y medio de fermentación EBM 3,6 °Bx y 0,19 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄. **1025:** Caudal de aire (Q)=10 SLPM (litro estándar por minuto) (■) y Temperatura (T)=25 °C (■); **1030:** Q=10 SLPM (■) y T=30 °C (■) y **130:** Q=1 SLPM (■) y T=30 °C (■). Otros parámetros: pH (■); Agitación en rpm (■); Oxígeno disuelto (OD) en % de saturación (■); Aire en % (■); Absorbancia Ln(DO_T/DO₀) datos experimentales n=2 (■) y Modelado Ln(DO_T/DO₀) (◆).

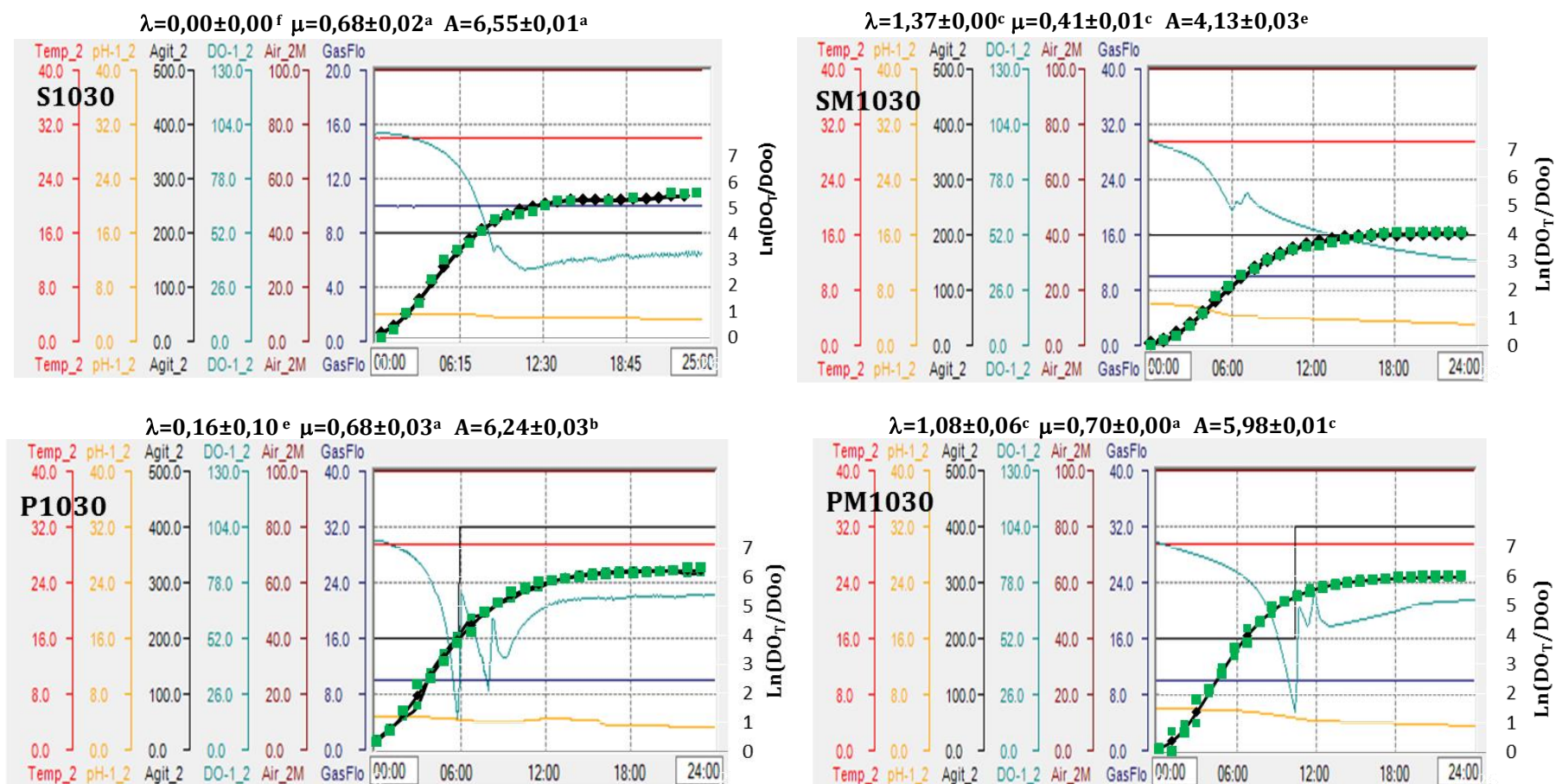


Figura 3.11: Evolución y parámetros cinéticos durante los ensayos iniciales de propagación de la biomasa de *S. cerevisiae* F8 (S) y *P. kudriavzevii* 15 (P) en cultivos *batch* a escala piloto (10 L) y medio de fermentación extracto de bagazo de manzana (izquierda) y melaza (M, derecha). **1030:** Caudal de aire (Q)=10 SLPM (litro estándar por minuto) (■) y Temperatura (T)=30 °C (■). Otros parámetros: pH (pH 1_2) (■); Agitación (Agit-2) en rpm (■); Oxígeno disuelto (OD 1_2) en % de saturación (■); Aire en % (■); Absorbancia $\ln(DO_T/DO_o)$ datos experimentales $n=2$ (■) y Modelado $\ln(DO_T/DO_o)$ (♦).

Los datos cinéticos mostraron que la combinación de 30 °C de temperatura y 10 SLPM de caudal de aire, resultó la más adecuada para la propagación de la biomasa en el medio extracto de bagazo de manzana 3,6 °Bx y 0,19 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄. Estos resultados fueron consistentes con los datos de productividad volumétrica y rendimiento de sustrato en biomasa reportados en la Tabla 3.3 aunque los resultados presentados en la Tabla 3.4 evidencian que el consumo de azúcares en los cultivos no superó nunca el 40 % de su contenido en el medio inicial. Este resultado y los bajos valores de los parámetros productivos obtenidos para *S. cerevisiae* en melaza respecto de los reportados en bibliografía (Solomon *et al.*, 1982), obligaron a revisar las condiciones operativas del proceso, en particular aquellos relacionados con la composición del medio de cultivo.

Tabla 3.3: Parámetros productivos obtenidos para la propagación de biomasa de *S. cerevisiae* (S) y *P. kudriavzevii* (P) en sistema *batch* a escala piloto y operados en diferentes condiciones de caudal de aire (1 y 10 SLPM) y temperatura (25 y 30 °C)

Cinética	T _D * h ⁻¹	UFC # cél mL ⁻¹	Productividad g L ⁻¹ d ⁻¹	AT Consumidos g L ⁻¹ d ⁻¹ (%)	Rendimiento* g g ⁻¹
S1025	1,36±0,00 ^b	3,0E+07±9,2E+06 ^e	5,52±0,72	20,46±2,04 (33)	0,27±0,02 ^d
S1030	1,00±0,12 ^a	3,2E+07±5,7E+06 ^d	7,26±0,50	21,38±1,29 (30)	0,34±0,04 ^c
S130	1,45±0,12 ^b	2,1E+07±2,8E+06 ^f	4,81±0,64	20,95±2,29 (31)	0,23±0,03 ^d
SM1030	1,65±0,10 ^c	1,7E+07±5,7E+06 ^g	2,38±0,30	11,61±0,81 (33)	0,20±0,01 ^d
P1025	0,98±0,07 ^a	1,7E+08±7,1E+07 ^b	3,14±0,50	7,24±1,23 (24)	0,43±0,01 ^b
P1030	1,02±0,05 ^a	5,6E+08±4,2E+07 ^a	4,61±0,64	10,22±1,73 (33)	0,45±0,01 ^a
P130	0,95±0,00 ^a	1,4E+08±7,1E+06 ^c	3,90±0,32	12,56±1,80 (40)	0,31±0,02 ^c
PM1030	0,98±0,01 ^a	4,9E+07±1,8E+07 ^d	2,80±0,35	9,83±1,23 (27)	0,28±0,02 ^d

T_D: Tiempo de duplicación. UFC: Unidades formadoras de colonias. AT: Azúcares Totales. Dentro de cada columna, medias con superíndices diferentes, son significativamente diferentes: *Modelo Lineal General, #Modelo Lineal Generalizado y prueba de DGC, con p<0,05 y n=2 para ambos análisis.

No obstante, estos ensayos confirmaron la incapacidad de la especie *P. kudriavzevii* de asimilar sacarosa y su capacidad de consumir ácido málico (del Mónaco *et al.*, 2014) y brindaron información relevante relativa a la influencia de los parámetros operativos evaluados sobre el comportamiento metabólico de las cepas. Mientras *P. kudriavzevii* mostró un carácter francamente glucofílico en todas las condiciones ensayadas, las preferencias de *S. cerevisiae* por uno u otro monosacárido (glucosa o fructosa) o por el disacárido sacarosa dependen de las condiciones operativas del cultivo, mostrando un comportamiento fructofílico a la menor temperatura ensayada (P1025) y sacarofílico a mayor temperatura y menor caudal de aire (P130) (Tabla 3.4). Esta preferencia por la sacarosa, también observada en melaza, está asociada a un aumento del metabolismo fermentativo, evidenciado por las mayores concentraciones de etanol en el medio (Tabla 3.4), resultados consistentes con los menores rendimientos de sustrato en biomasa observado en S130 y SM1030 (Tabla 3.3).

Tabla 3.4: Composición química inicial y residual (al finalizar los ensayos, 24 h de cultivo) del medio de fermentación (en g L⁻¹) de los ensayos iniciales de propagación de la biomasa a escala piloto (10 L) y sistema *batch* de las cepas *S. cerevisiae* (S) y *P. kudriavzevii* (P) y diferentes combinaciones de caudal de aire (1 o 10 SLPM) y temperatura (25 °C o 30 °C)

Cinética	Glucosa#	Fructosa#	Sacarosa#	Ác. Máltico#	Ác. Acético	Glicerol*	Etanol*
EBM	8,26±1,48 (100 %)	19,44±2,32 (100 %)	2,94±0,16 (100 %)	0,27±0,03 (100 %)	<LOD	ND	<LOC
Melaza	3,1±0,57 (100 %)	7,3±0,64 (100 %)	25,27±1,35 (100 %)	ND	ND	ND	ND
S1025	7,12±1,18 ^a (86 %)	11,35±0,04 ^c (58 %)	2,31±0,15 ^{cd} (79 %)	0,29±0,04 ^b (108 %)	<LOD	0,07±0,01 ^c	1,04±0,08 ^c
S1030	5,42±1,03 ^b (65 %)	14,49±0,17 ^a (75 %)	2,00±0,22 ^{de} (68 %)	0,45±0,06 ^a (167 %)	<LOD	0,10±0,01 ^b	1,27±0,09 ^c
S130	5,90±0,82 ^b (71 %)	12,79±1,32 ^{ab} (66 %)	1,48±0,23 ^e (50 %)	0,39±0,05 ^a (144 %)	<LOD	0,09±0,01 ^b	1,88±0,20 ^b
SM1030	2,6±0,43 (84 %)	3,4±1,56 ^d (47 %)	19,25±1,06 ^b (76 %)	0,39±0,02 (144 %)	ND	0,10 ±0,00 ^b	4,08±0,17 ^a
P1025	4,00±0,84 ^{bc} (48 %)	15,65±1,76 ^a (81 %)	2,87±0,13 ^c (98 %)	0,16±0,02 ^c (59 %)	0,17±0,10 ^a	0,18±0,08 ^a	0,19±0,03 ^d
P1030	4,02±0,58 ^{cd} (48 %)	13,77±1,54 ^{ab} (71 %)	2,89±0,14 ^c (98 %)	0,00±0,00 ^d (0 %)	<LOD	0,10±0,04 ^a	<LOC
P130	3,22±0,46 ^d (38 %)	12,07±1,56 ^b (62 %)	2,95±0,17 ^c (100 %)	0,13±0,02 ^c (44 %)	<LOD	0,21±0,08 ^a	<LOC
PM1030	ND (0 %)	1,21±0,29 ^c (17 %)	25,35±2,05 ^a (100 %)	ND	<LOC	0,27±0,06	0,02±0,00

EBM: Extracto de bagazo de manzana y Melaza: Melaza de caña, diluidos a 3,6 °Bx y suplementados con 0,19 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄. Los valores entre paréntesis indican porcentaje del compuesto con respecto al valor inicial. LOD: Límite de detección. LOC: límite de cuantificación. ND: no detectado. Dentro de cada columna, medias con superíndices diferentes, son significativamente diferentes: # ANOVA y prueba de Tukey HSD; *Modelo Lineal General y prueba de DGC con p<0,05 y n=2 en ambos tipos de análisis.

Finalmente, en la Figura 3.12, se presenta un análisis de componentes principales (CP1 y CP2) realizado a partir de los datos presentados en la Tabla 3.4 en el que claramente se observan las diferencias metabólicas entre las cepas propagadas descritas previamente. También el gráfico evidencia una buena reproducibilidad de los ensayos fermentativos, y en consecuencia de las determinaciones analíticas involucradas en la cuantificación de los metabolitos cuyos coeficientes de variación estuvieron siempre por debajo del 15 %.

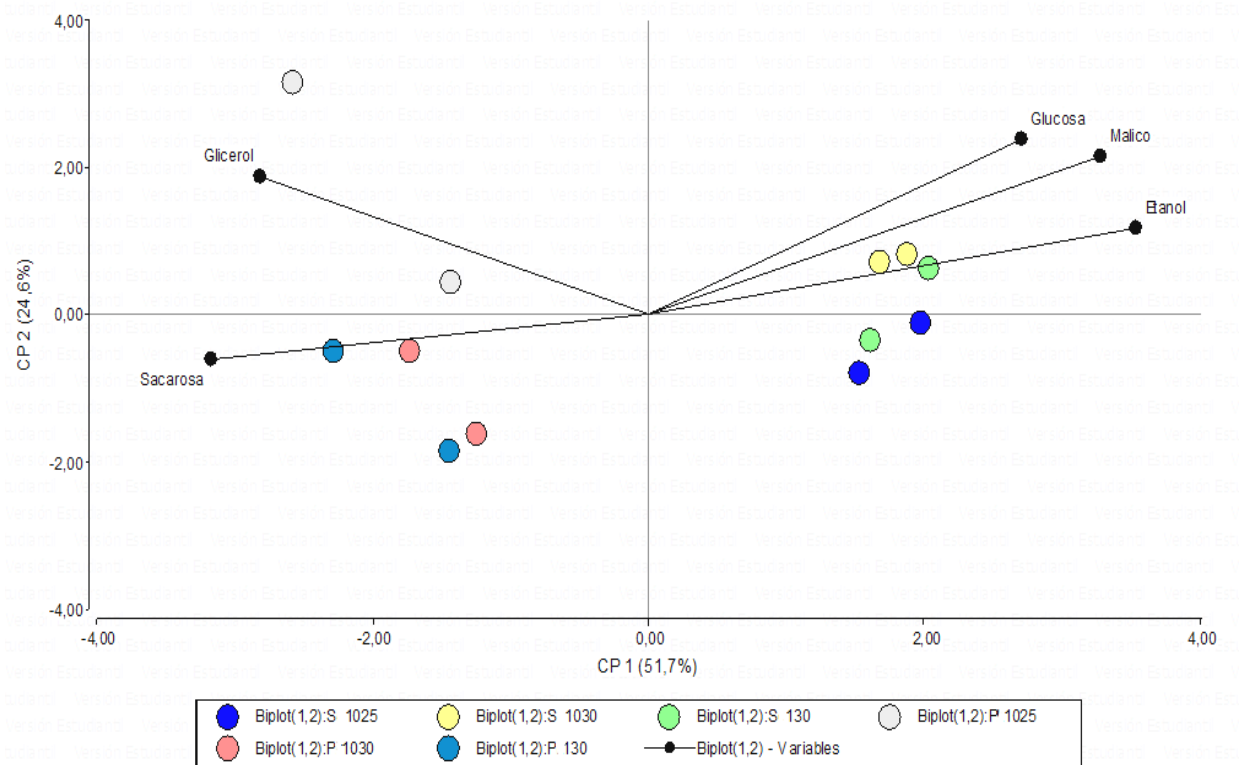


Figura 3.12: Análisis de componentes principales de los constituyentes del medio de cultivo al finalizar los procesos fermentativos de propagación de las células de *S. cerevisiae* (S) y *P. kudriavzevii* (P) bajo diferentes condiciones operativas del cultivo *batch*. **1025:** Caudal de aire (Q) 10 SLPM y Temperatura (T)=25 °C; **1030:** Q=10 SLPM y T=30 °C y **130:** Q=1 SLPM y T=30 °C.

Tabla 3.5: Valores de los autovectores

Variables	Componentes	
	e1	e2
Glucosa	0,37	0,32
Fructosa	-0,18	0,62
Sacarosa	-0,43	-0,08
Málico	0,45	0,29
Acético	-0,26	0,58
Glicerol	-0,38	0,25
Etanol	0,48	0,16

Tabla 3.6: Correlación de los componentes principales con las variables originales

Variables	CP1	CP2
Glucosa	0,70	0,43
Fructosa	-0,35	0,81
Sacarosa	-0,82	-0,11
Málico	0,85	0,38
Acético	-0,50	0,76
Glicerol	-0,73	0,33
Etanol	<u>0,91</u>	<u>0,21</u>

Correlación cofenética=0,946

3.3.2 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DEL CULTIVO PARA LA PROPAGACIÓN DE LA BIOMASA DE LEVADURAS A ESCALA PILOTO

Teniendo en cuenta los valores de los parámetros productivos presentados en la Tabla 3.4 estos ensayos sólo se realizaron con la levadura *S. cerevisiae*, evaluándose en primer lugar la demanda de nitrógeno.

En el primer ensayo se preparó el medio de cultivo a base de extracto de manzana con 3,6 °Bx. Como se describió en el ítem 3.2.2.4.2 de Materiales y Métodos, el proceso se inició a 30 °C con pH=5 y Q=2 SLPM. Los resultados cinéticos y metabólicos de este ensayo de propagación se presentan en la Figura 3.13.

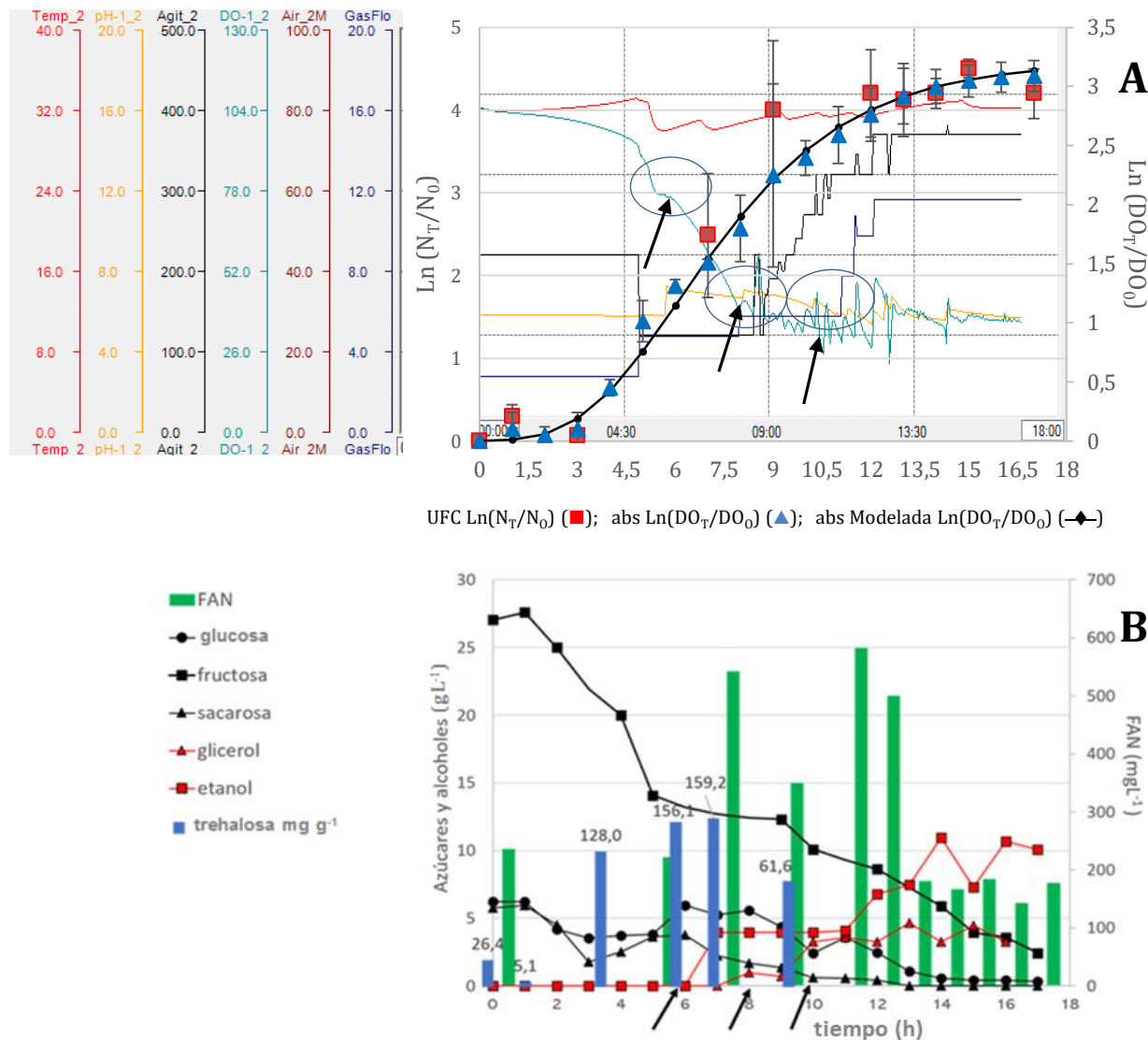


Figura 3.13: Parámetros cinéticos (A) y fisicoquímicos (B) del proceso de propagación de la biomasa para la cepa *S. cerevisiae* F8 a escala de planta piloto. Medio de fermentación 10 L de extracto de bagazo de manzana 3,6 °Bx suplementado con 5 g, 2,5 g y 2,5 g de nitrógeno en la forma de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a los tiempos indicados (Flechas). Sistema *batch*. Condiciones operativas de A: Temperatura (■); pH 6 (■); Agitación en rpm (■); Oxígeno disuelto (OD) en % de saturación (■); Caudal de aire en SLPM (litro estándar por minuto) (■).

Durante las primeras 3-4 h de cultivo se observó un rápido consumo de azúcares, mayoritariamente de fructosa (en este tiempo se consumió el 50 % de su concentración inicial) (Figura 3.13 B) con aumento de la temperatura y a una significativa demanda de oxígeno que obligó

uplicar el caudal de aire sin un significativo crecimiento celular (Figura 3.13 A). El contenido del FAN es bajo y a pesar del alto contenido de azúcares del medio no se observó producción de etanol, pero si un significativo aumento de la trehalosa intracelular (Figura 3.13 B). En esta situación y ante un cambio significativo en la cinética del OD, a las 6 h de cultivo se adicionaron al medio 5 g de nitrógeno en la forma de amonio, operación que se repitió a las 8 h y 10 h aunque a estos tiempos las cantidades adicionadas fueron de 2,5 g cada vez. Durante la etapa de adición de nitrógeno se observó un activo crecimiento celular (Figura 3.13 A) acompañado por una significativa producción de etanol indicativa de un metabolismo respiro-fermentativo (Figura 3.13 B). Los niveles de FAN se mantienen elevados y la concentración intracelular de trehalosa disminuyó. A partir de las 13-15 h de cultivo se observó nuevamente un cambio en el metabolismo que pasó a ser respiratorio como lo indica el inicio de consumo del etanol presente en el medio, cuya concentración al finalizar el cultivo (24 h) fue de $6,12 \pm 2,31 \text{ g L}^{-1}$. La Tabla 3.7 muestra que a este tiempo los azúcares del medio están prácticamente agotados, la concentración intracelular de trehalosa recuperó los valores similares a los iniciales (Tabla 3.7) y tanto la productividad como el rendimiento fueron significativamente mayores que el obtenido en los ensayos iniciales para la misma temperatura (Tablas 3.3 y 3.7), evidenciando efectivamente una limitación del crecimiento por deficiencia de nitrógeno en aquellos ensayos y ahora revertida por la adición de fuente nitrogenada adicional al medio de cultivo.

La figura 3.14 muestra la cinética de propagación de la biomasa cuando el cultivo *batch* se realizó con EBM 3,6 °Bx adicionado con $1,2 \text{ g L}^{-1}$ de nitrógeno en la forma de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (6 g L^{-1}).

Esta condición, reflejada en la mayor disponibilidad de FAN desde el inicio del ensayo, permitió el consumo prácticamente total de los azúcares del medio triplicando la productividad volumétrica y duplicando el rendimiento respecto de los ensayos iniciales (Tablas 3.7 y 3.3). El máximo rendimiento se obtuvo a las 13 h de cultivo cuando todavía quedan en el medio entre el 30-40 % de azúcares sin consumir. A este tiempo los valores de FAN estuvieron por debajo del 25 % de su valor inicial y el cultivo ingresa en la fase estacionaria. A las 24 h, momento en el que se dio por finalizado el ensayo, los azúcares del medio se agotaron observándose un aumento de la productividad volumétrica con disminución del rendimiento en comparación al observado a las 13 h (Tabla 3.7), adicionalmente, se observó una gran acumulación de trehalosa intracelular (Tabla 3.7).

Se observó que, en las condiciones del cultivo, a pesar de las elevadas concentraciones de azúcares reductores durante las diez primeras horas las células presentan un metabolismo respiratorio (acreditado por la ausencia de etanol en el medio de cultivo) y asociado mayoritariamente al consumo de fructosa (Figura 3.14 A y B). El etanol, indicativo de un metabolismo respiro-fermentativo recién pudo ser cuantificado a las 11 h de cultivo (Figura 3.14B)

y su producción estuvo acompañada por un consumo significativo de glucosa y sacarosa. El contenido de etanol al finalizar el ensayo fue de $7,1 \pm 1,3$ g L⁻¹ y a este tiempo las células presentaron una concentración de trehalosa significativamente elevada (Tabla 3.7).

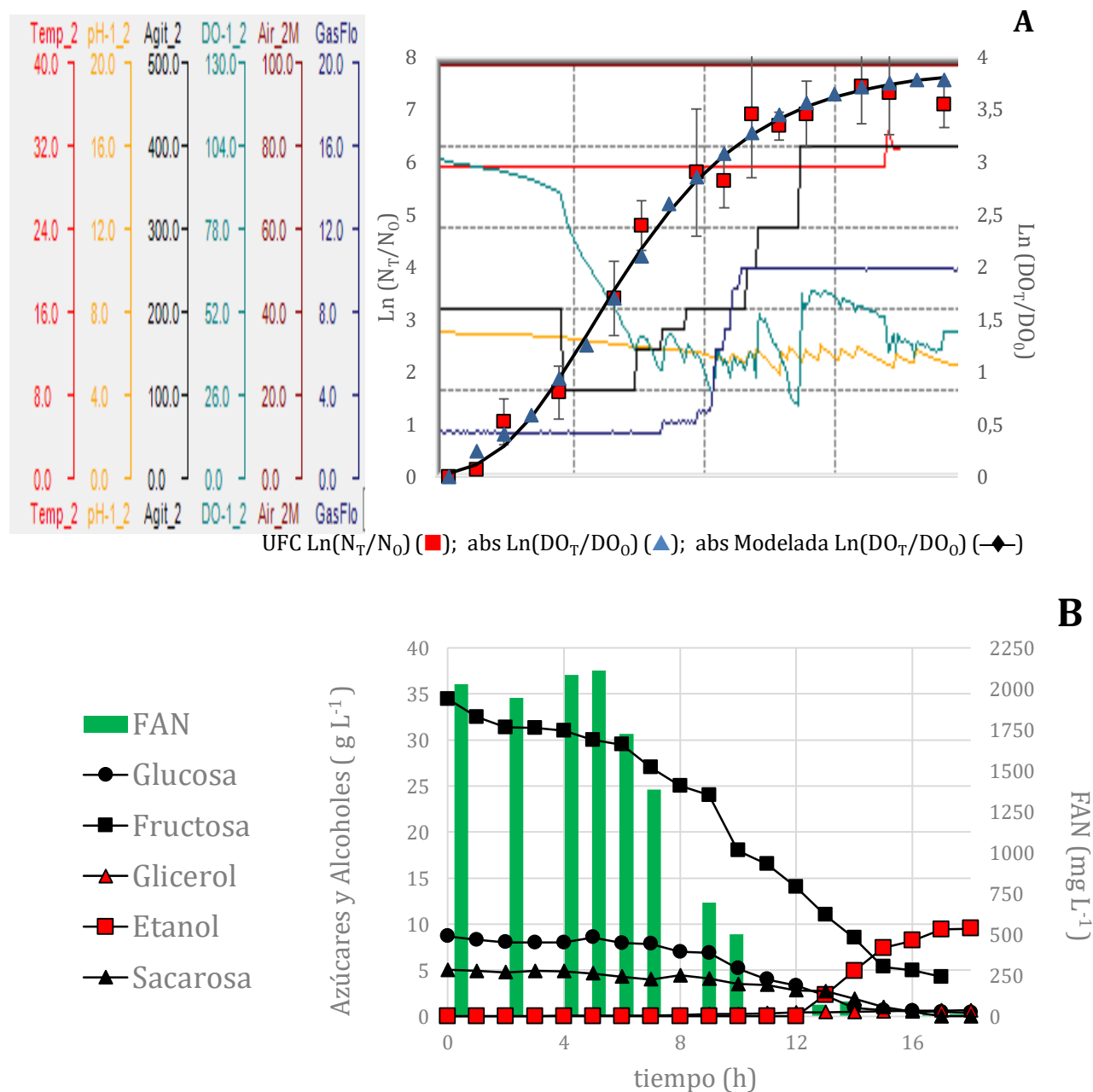


Figura 3.14: Parámetros cinéticos (A) y fisicoquímicos (B) del proceso de propagación de la biomasa para la cepa *S. cerevisiae* F8 a escala de planta piloto, 30 °C y medio EBM 3,6 °Bx suplementado con 1,2 g L⁻¹ de nitrógeno. Sistema *batch*. Condiciones operativas de A: Temperatura (■); pH (■); Agitación en rpm (■); Oxígeno disuelto (OD) en % de saturación (■); Caudal de aire en SLPM (litro estándar por minuto) (■).

Tabla 3.7: Parámetros fisicoquímicos, bioquímicos, productivos y cinéticos de los procesos de propagación de biomasa de las levaduras *S. cerevisiae* (Sc) y *P. kudriavzevii* (Pk) realizados bajo diferentes condiciones operativas

Cepa	tiempo	AT	FAN	Trehalosa	P _x	Y _{x/s}	λ (h)	μ (h)	A (UA)
Temperatura	(h)	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(mg g ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(g g ⁻¹)	(sd)	(sd)	(sd)
N (g L ⁻¹)#									
Sc 30 °C OPT	0	39,05	0,216	26,5	-	-			
	24	0,56	0,034	1,3	20,5	0,54	2,73	0,35	3,24
Sc 30 °C 1,2	0	49,45±5,13 ^a	2,02±0,12 ^b	21,2±1,6 ^d	-	-			
	13	20,97±4,04 ^b	0,30±0,06 ^d	37,9±1,2 ^c	20,3±1,7 ^a	0,68±0,10 ^a	1,83 ^d	0,52 ^a	3,88 ^h
	24	0,52±0,07 ^d	0,01±0,01 ^e	406,0±62,2 ^a	26,5±6,7 ^a	0,52±0,04 ^b	(0,06)	(0,02)	(0,02)
Sc 25 °C 1,2	0	42,36±6,19 ^a	2,08±0,11 ^b	38,5±3,5 ^c	-	-	2,63 ^c	0,36 ^c	3,69 ⁱ
	24	0,62±0,18 ^d	0,04±0,01 ^e	1,5±0,4 ^e	15,1±2,5 ^b	0,37±0,13 ^c	(0,34)	(0,02)	(0,21)
Sc 30 °C 4,0	0	41,57±9,23 ^a	3,76±0,20 ^a	20,0±2,1 ^d	-	-	7,10 ^a	0,47 ^{ab}	3,92 ^h
	24	1,11±0,38 ^d	0,38±0,05 ^d	24,9±3,1 ^d	18,1±5,6 ^a	0,45±0,05 ^c	(0,16)	(0,02)	(0,02)
Pk 30 °C 4,0	0	42,40±8,49 ^a	3,92±0,61 ^a	ND	-	-			
	12	20,87±4,43 ^b	2,34±0,35 ^b	44,4±3,7 ^c	12,7±1,2 ^b	0,65±0,05 ^a	1,82 ^d	0,45 ^b	4,36 ^f
	24	13,77±3,00 ^c	1,26±0,24 ^c	82,3±4,2 ^b	18,2±1,7 ^a	0,64±0,19 ^a	(0,06)	(0,02)	(0,02)

Adicionado en la forma de (NH₄)₂SO₄; AT: Azúcares totales y FAN: nitrógeno fácilmente asimilable iniciales (t=0) y residuales en el medio de cultivo a los tiempos indicados. P_x: productividad volumétrica; Y_{x/s} rendimiento de sustrato en biomasa. UA: unidades de absorbancia. OPT: Ensayo de optimización con agregados de (NH₄)₂SO₄. Dentro de cada columna, medias con superíndices diferentes son significativamente diferentes, Modelo Lineal General y prueba de DGC con p<0,05 y n=2.

Un mayor contenido de nitrógeno en el medio (4,0 g L⁻¹) no mejoró el proceso de propagación de células de la levadura *S. cerevisiae* evaluado a partir de los parámetros productivos (Tabla 3.7). En estas condiciones se observó una extensión temporal del proceso generado por un aumento significativo de la etapa de adaptación de la células al medio (fase lag) sin mejorar significativamente la velocidad máxima de crecimiento (Figura 3.15A y Tabla 3.7). Como consecuencia en estas condiciones de ensayo la productividad volumétrica a las 24 h de cultivo fue similar a la alcanzada a las 13 h en cultivos con menor contenido de nitrógeno y el rendimiento fue significativamente menor que en éstos (Tabla 3.7).

Este resultado es consistente con el metabolismo fermentativo predominante bajo las condiciones de ensayo utilizadas y se reflejó en la producción de etanol desde etapas muy tempranas del cultivo (4 h) (Figura 3.15B). Este metabolito se acumuló en el medio alcanzando su máxima concentración a las 24 h de cultivo, momento a partir del cual comenzó a consumirse. La

concentración de etanol al momento de finalizar el proceso (28 h, $8,2 \pm 1,1$ g L⁻¹) evidenció que el cultivo estaba todavía transitando la etapa respiratoria final necesaria para mejorar la calidad bioquímica de las células (Figura 3.15B). El contenido de trehalosa intracelular, significativamente menor que el observado en las células propagadas con 1,2 g L⁻¹ de nitrógeno (Tabla 3.7) fue consistente con este supuesto.

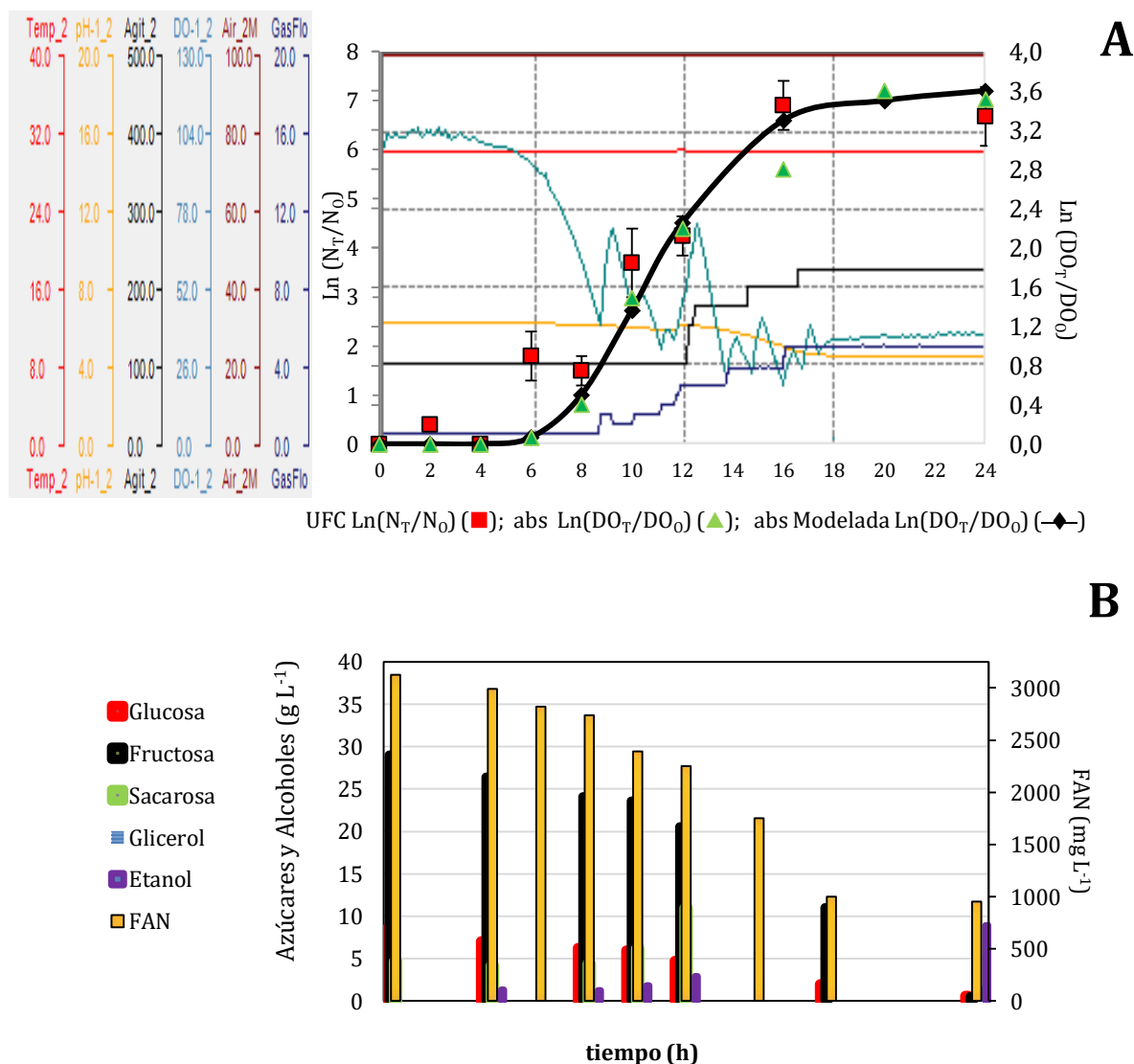


Figura 3.15: Parámetros cinéticos (A) y fisicoquímicos (B) del proceso de propagación de la biomasa para la cepa *S. cerevisiae* F8 a escala de planta piloto. Temperatura 30 °C. Medio de fermentación extracto de bagazo de manzana con 3,6 °Bx suplementado con 4,0 g L⁻¹ de nitrógeno. Sistema *batch*. Condiciones operativas de A: Temperatura (■); pH (■); Agitación en rpm (■); Oxígeno disuelto (OD) en % de saturación (■); Caudal de aire en SLPM (litro estándar por minuto) (■).

Se evaluó entonces el efecto de una menor temperatura (25 °C) sobre la propagación de la biomasa manteniendo la concentración inicial de nitrógeno en 1,2 g L⁻¹ (Figura 3.16 A y B).

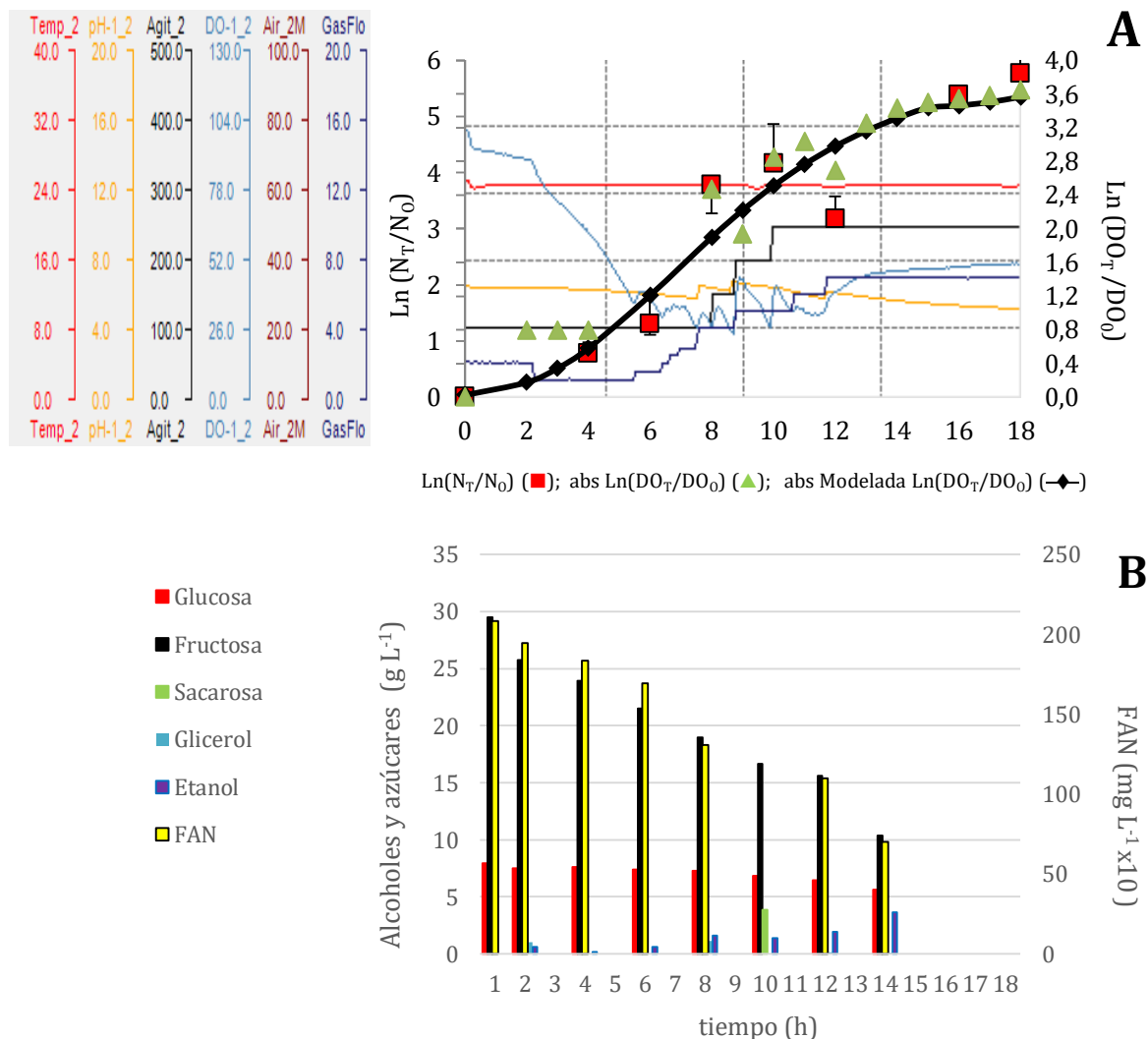


Figura 3.16: Parámetros cinéticos (A) y fisicoquímicos (B) del proceso de propagación de la biomasa para la cepa *S. cerevisiae* F8 a escala de planta piloto. Medio de fermentación extracto de bagazo de manzana con 3,6 °Bx y suplementado con 1,2 g L⁻¹ de nitrógeno y 25 °C. Sistema *batch*. Condiciones operativas de A: Temperatura (■); pH (■); Agitación en rpm (■); Oxígeno disuelto (OD) en % de saturación (■); Caudal de aire en SLPM (litro estándar por minuto) (■).

Una menor temperatura de proceso tampoco permitió mejorar la productividad y el rendimiento, los que fueron significativamente menores que los obtenidos para 30 °C (Tabla 3.7 y Figura 3.16), resultados consistentes con la menor velocidad máxima (Tabla 3.7) y el menor número de ciclos de crecimiento respecto de los observados cuando se opera a 30 °C (Figuras 3.14 A y 3.16 A) y que puede relacionarse con un metabolismo respirofermentativo de la cepa durante todo el proceso evidenciado por la presencia de etanol en el medio de cultivo (Figura 3.16B). Al igual que

las células propagadas con mayor contenido de nitrógeno, las propagadas a 25 °C no acumularon trehalosa al momento de finalizar el proceso (Tabla 3.7).

Finalmente se propagaron las células de *P. kudriavzevii*, la propagación de la biomasa se realizó con EBM 3,6 °Bx adicionado con 4,0 g L⁻¹ de nitrógeno también en la forma de (NH₄)₂SO₄ (19,0 g L⁻¹) y en función de los resultados de los ensayos iniciales la temperatura seleccionada fue de 30 °C. Los resultados cinéticos y fisicoquímicos se presentan en la Figura 3.17.

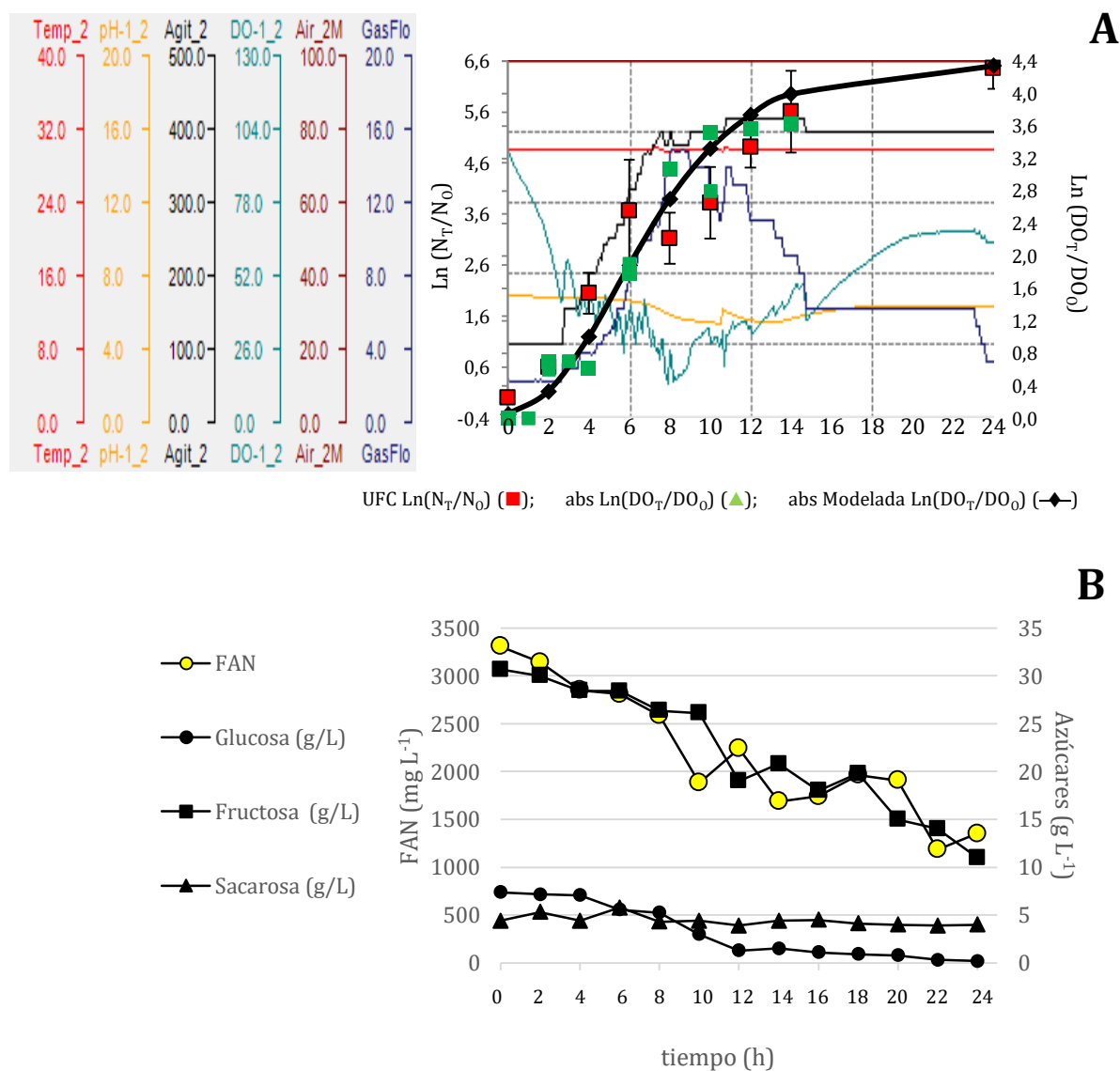


Figura 3.17: Parámetros cinéticos (A) y fisicoquímicos (B) del proceso de propagación de la biomasa para la cepa *P. kudriavzevii* a escala de planta piloto. Temperatura 30 °C. Medio de fermentación extracto de bagazo de manzana con 3,6 °Bx y suplementado con 4,0 g L⁻¹ de nitrógeno. Sistema *batch*. Condiciones operativas de A: Temperatura (■); pH (■); Agitación en rpm (■); Oxígeno disuelto (OD) en % de saturación (■); Caudal de aire en SLPM (litro estándar por minuto) (■).

Como era esperable por su comportamiento previo, esta cepa demostró crecer sin inconvenientes en las condiciones ensayadas y el crecimiento estuvo asociado a un metabolismo estrictamente respiratorio dado que el etanol nunca fue detectado en el medio de cultivo. Esta característica metabólica es consistente con los valores observados para la velocidad de crecimiento y los buenos resultados de productividad volumétrica y rendimiento de sustrato en biomasa obtenidos para esta cepa (Tabla 3.7), aunque la fuente carbonada del medio no pudo ser agotada (Figura 3.17 A) y las células mostraron concentraciones significativamente elevadas de trehalosa intracelular a las 24 h de cultivo. Los contenidos de FAN en el medio de fermentación (Figura 3.17 B y Tabla 3.7) demostraron que la disponibilidad de este sustrato no ha sido la limitante para detener el crecimiento.

En la Figura 3.18 se presenta el resultado de aplicar el análisis de componentes principales a los datos provenientes de los procesos productivos descritos previamente.

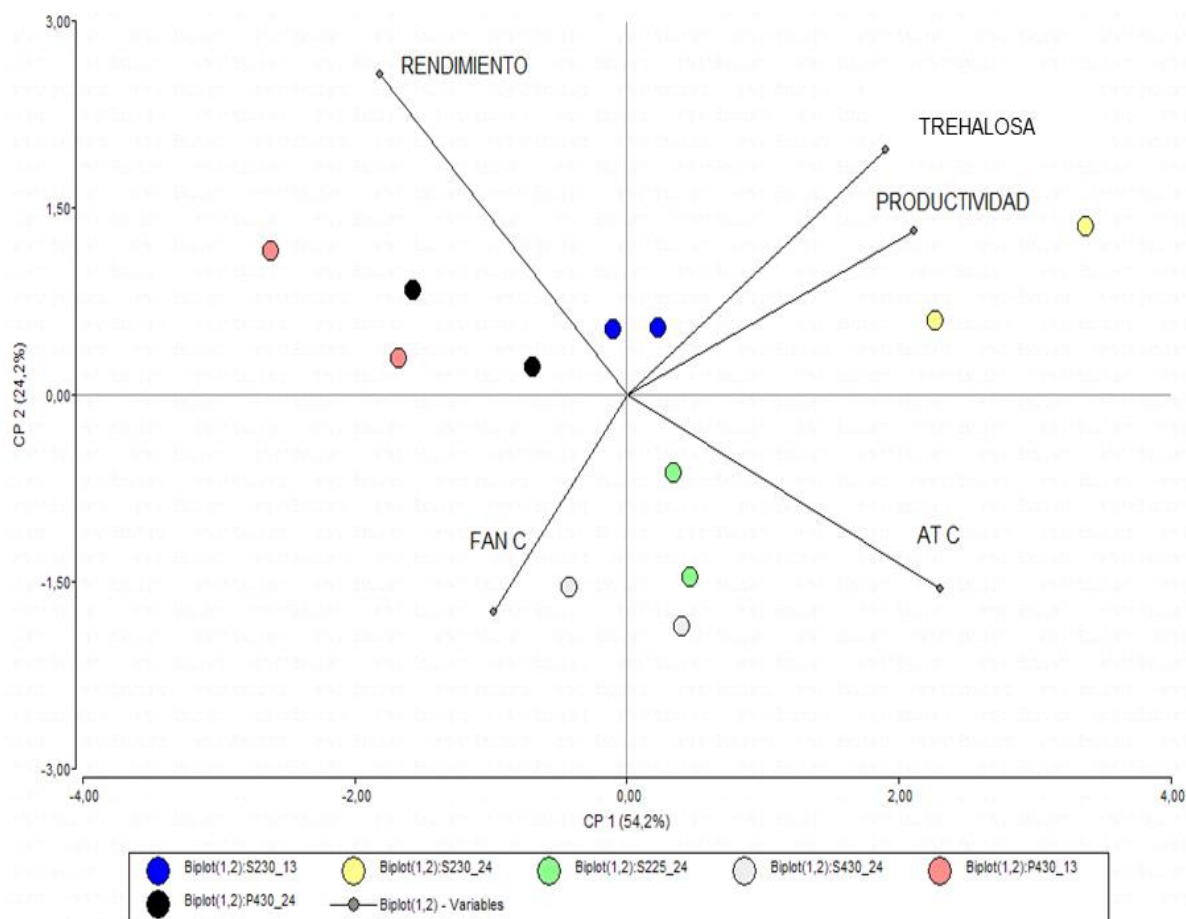


Figura 3.18: Análisis de componentes principales de variables fisicoquímica, bioquímicas y productivas a diferentes tiempos (13 y 24 h) de iniciados los procesos óptimos de propagación de células de *S. cerevisiae* (S) y *P. kudriavzevii* (P) realizados con EBM 3,6 °C adicionado con 1,2 g L⁻¹ (2) y 4,0 g L⁻¹ (4) de N, respectivamente, a 25 °C (25) y 30 °C (30) de temperatura.

Tabla 3.8: Valores de los autovectores

Variables	Componentes	
	e1	e2
TREHALOSA	0,45	0,47
AT C	0,56	-0,36
FAN C	-0,23	-0,42
PRODUCTIVIDAD	0,49	0,32
RENDIMIENTO	-0,44	0,61

Tabla 3.9: Correlación de los componentes principales con las variables originales

Variables	CP1	CP2
TREHALOSA	0,73	0,52
AT C	0,91	-0,40
FAN C	-0,38	-0,46
PRODUCTIVIDAD	0,80	0,35
RENDIMIENTO	-0,72	0,67

Correlación cofenética=0,937

Los procesos de producción de biomasa destinada a evaluar su calidad tecnológica y enológica en bodegas regionales se realizaron a escala piloto durante los meses de febrero previos a las Vendimias 2019 y 2020. La propagación de la biomasa se realizó a 30 °C y utilizando como medio de propagación EBM 3,6 °Bx suplementado con 1,2 g L⁻¹ de nitrógeno en la forma de (NH₄)₂SO₄. Los parámetros de productividad no fueron significativamente diferentes de los reportados previamente.

3.3.3 EVALUACIÓN DE CALIDAD MICROBIOLÓGICA, BIOQUÍMICA Y SANITARIA DE LA BIOMASA

La viabilidad de las células, evaluada por recuento en cámara de Neubauer y tinción con azul de metileno al 10 % (Figura 3.19 A, B y C) estuvo en el orden de 95±4,5 % (n=20).

La pureza microbiológica de la biomasa se evaluó a través de analizar la homogeneidad en la morfología de las colonias desarrolladas en placas de GPY agar sembradas por agotamiento en superficie (Figura 3.1) o por diseminación en superficie con diluciones adecuadas de la biomasa de cada una de las cepas (Figura 3.19 D), y el posterior análisis molecular de entre 5-10 colonias aisladas y bien desarrolladas utilizando métodos moleculares (Figura 3.20). Los resultados permitieron descartar contaminaciones de los lotes con otras levaduras y contaminaciones cruzadas entre las especies propagadas.

Adicionalmente, el número de coliformes totales fue menor a 3 por 100 mL de muestra (Oteiza, 2016) y el contenido de trehalosa resultó de 143±22 mg g⁻¹ (n=2) para *P. kudriavzevii* y 396±33 mg g⁻¹ (n=2) para *S. cerevisiae* indicando buena calidad sanitaria y bioquímica de la biomasa.

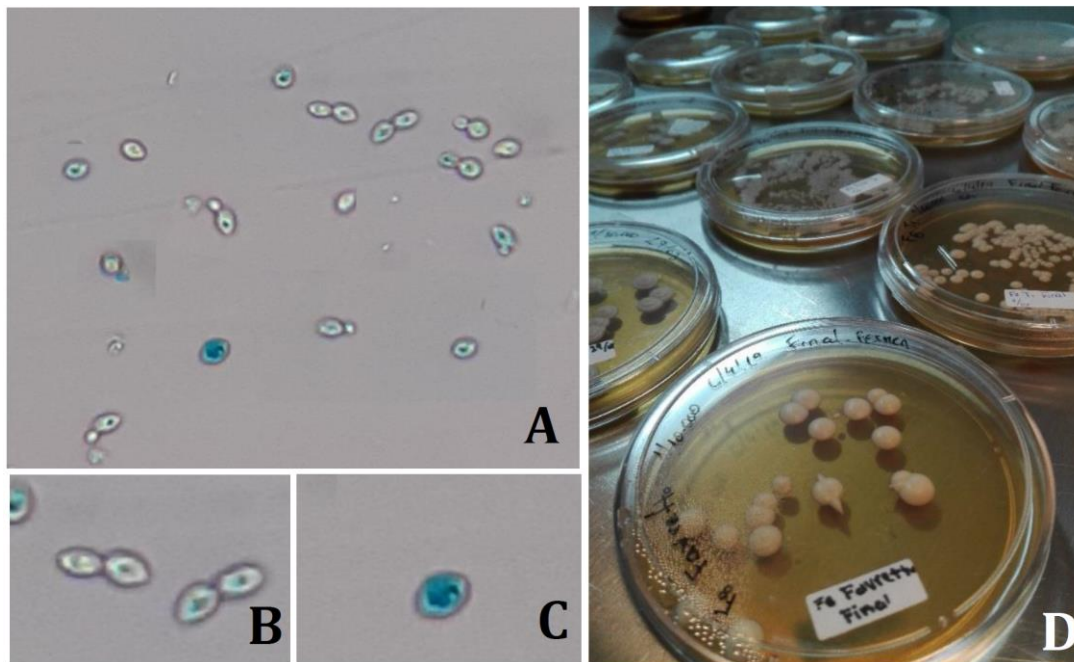


Figura 3.19: Evaluación de la viabilidad celular por recuento en cámara de Neubauer previa tinción con azul de metileno y observación por microscopía de campo claro (400x)(A) y de la pureza de la biomasa mediante siembra por diseminación en superficie en placas de agar GPY y evaluación de la morfología de las colonias (D). B y C: detalle de células vivas y muertas, respectivamente.

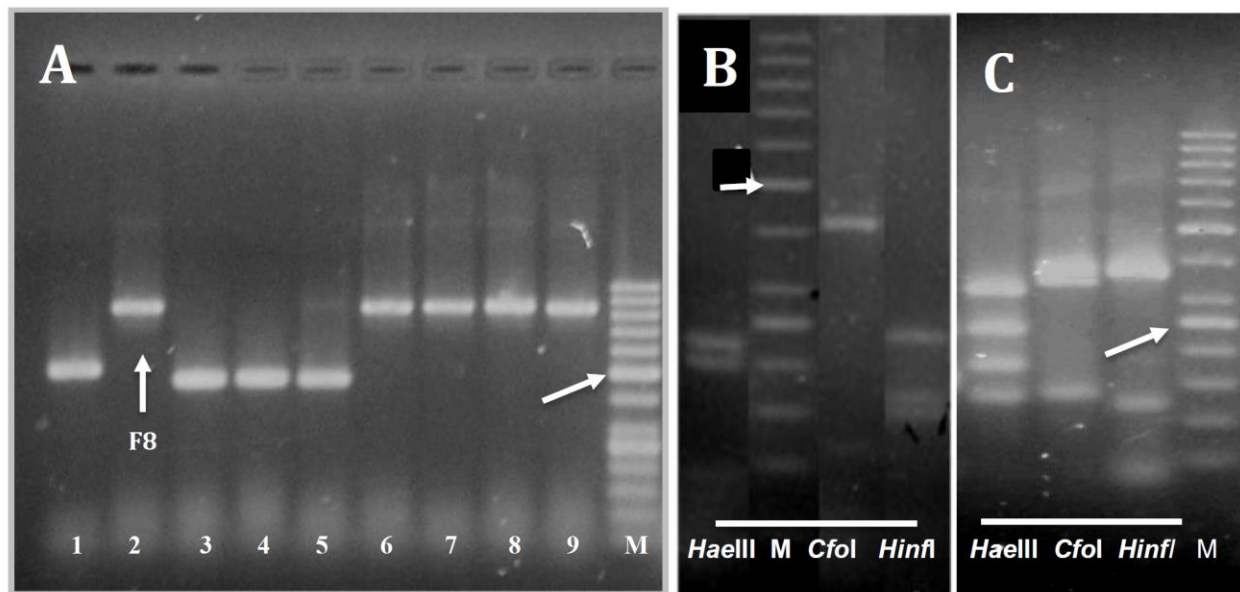


Figura 3.20: Identificación específica de células propagadas a escala de planta piloto en medio EBM 3,6 °Bx a 30 °C de temperatura por amplificación de la región génica ITS1 5.8S ADN_r ITS2 por PCR seguida de restricción con las endonucleasas *HaeIII* *CfoI* y *HinfI*. A: tamaños de los amplificadores; calles 3, 4 y 5 *P. kudriavzevii* (~490 pb) procedente de los lotes de producción 1 y 3; calles 6 al 9 *S. cerevisiae* (~850 pb) procedentes de los lotes de producción 2 y 4 (2 de cada uno). Calle 1 *Pk* 15; Calle 2: *Sc* F8 (Control). perfiles de restricción de B: *P. kudriavzevii* (lote 1). C: *S. cerevisiae* (lote 2). M: marcador de peso molecular. Las flechas señalan las bandas correspondientes a 500 pb.

3.3.4 EVALUACIÓN DE LA CALIDAD TECNOLÓGICA Y ENOLÓGICA DE LA BIOMASA

La calidad tecnológica y enológica de la biomasa propagada se evaluó mediante su capacidad para conducir vinificaciones en tinto (calidad tecnológica) y mejorar la calidad de los vinos obtenidos (calidad enológica) cuando se las utiliza en la forma de cultivos iniciadores.

La evolución de las vinificaciones llevadas a cabo en simultáneo en piletas de 20.000 litros conteniendo 15.000 litros de mostos Malbec sulfitados e inoculados con los cultivos puros comerciales y con los cultivos puro y mixto autóctonos se muestran en la Figura 3.21. Todas las cinéticas corresponden a FA normales, no obstante los cultivos autóctonos presentaron un inicio de fermentación más rápido que los comerciales. Esta mayor capacidad fermentativa se mantuvo durante todo el proceso para el cultivo puro *Sc* F8 quién logró el secado del mosto (azúcares residuales $<2 \text{ g L}^{-1}$) 48 h antes que los otros cultivos iniciadores. El recuento en placas de unidades formadoras de colonias de muestras procedentes de los mostos al finalizar la FA evidenció una densidad de población del orden de 10^6 UFC mL^{-1} en todos ellos (dato no mostrado).

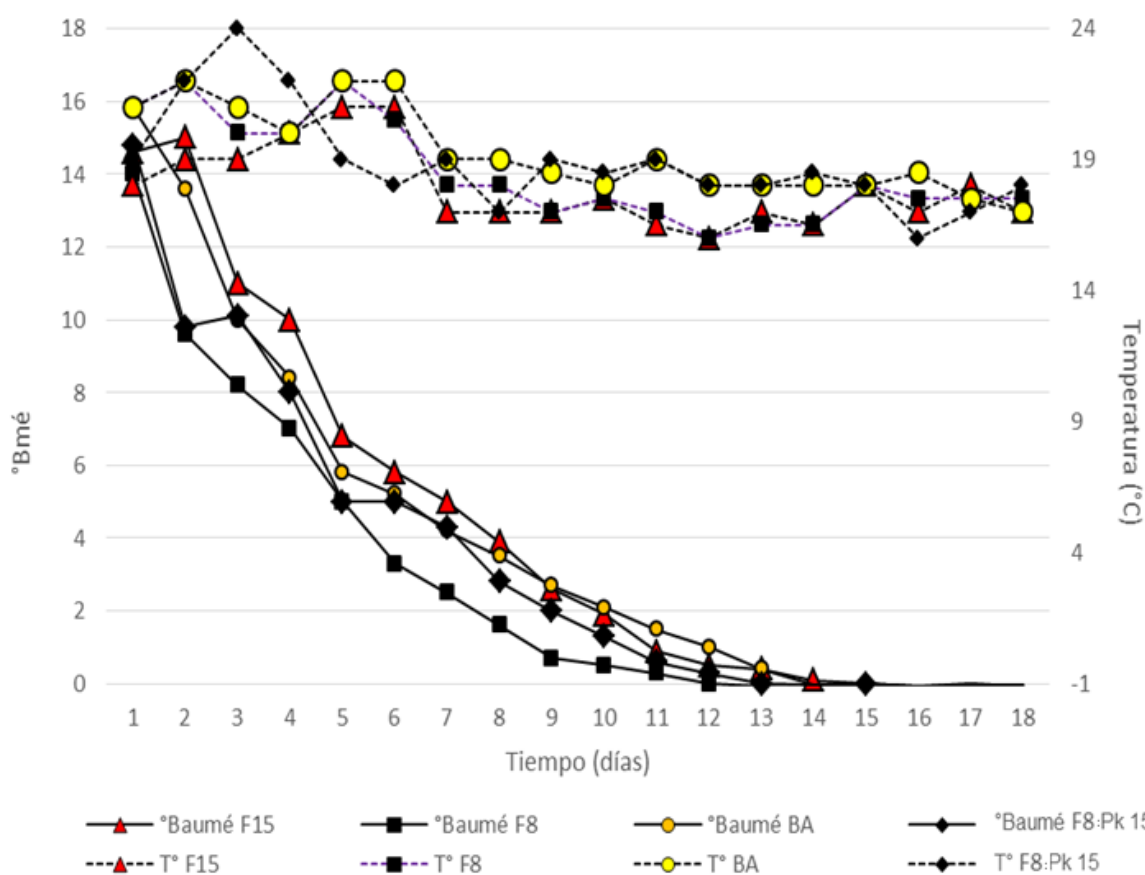


Figura 3.21: Cinética de las fermentaciones alcohólicas de vinificaciones en tinto Patagónicas conducidas por los cultivos iniciadores comerciales puros F15 (*S. cerevisiae*, LSA) y BA (*S. cerevisiae*, líquida) y por los cultivos autóctonos puro F8 (*S. cerevisiae*) y mixto *Sc* F8 + *Pk* 15 (*S. cerevisiae*; *P. kudriavzevii* Co- inoculación, relación de densidades 1:100 UFC mL⁻¹). Variedad vinificada: Malbec. Vendimia 2019. Escala: industrial (15.000 L).

El análisis molecular de las colonias aisladas (Figura 3.22) evidenció buena capacidad de implantación tanto de los cultivos comerciales como de los autóctonos, incluido el mixto.

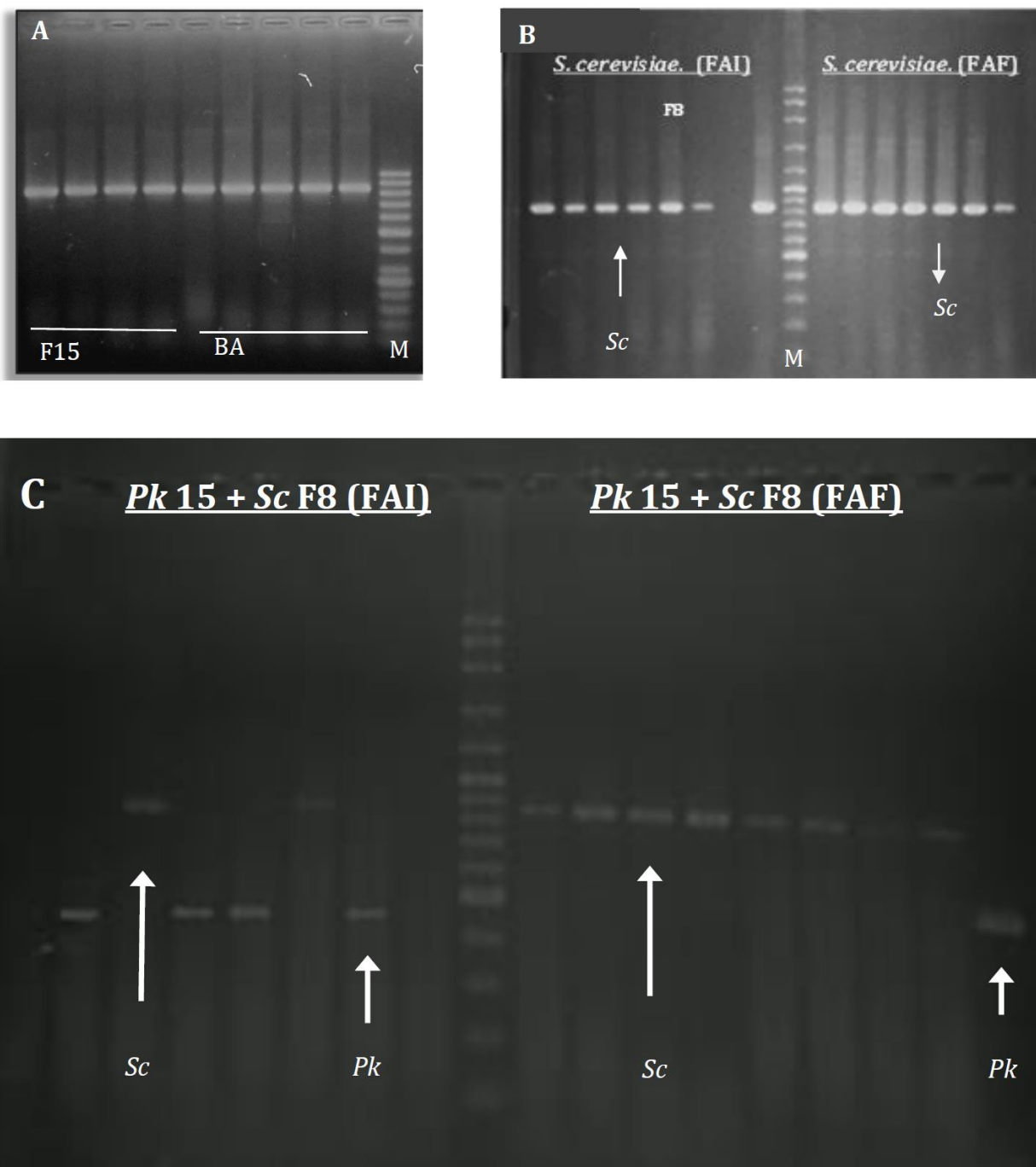


Figura 3.22: Identificación de levaduras procedentes de vinificaciones a escala industrial de uvas Malbec mediante el método ITS1 5.8S ADN ITS2 PCR. Amplificados (en pb) de cepas asociadas a estadios finales de fermentaciones alcohólicas (FA) conducidas por **A:** cultivos iniciadores puros comerciales *S. cerevisiae* F15 y BA y de estadios iniciales (FAI) y finales (FAF) de FA conducidas por cultivos autóctonos **B:** *S. cerevisiae* F8 y **C:** *P. kudriavzevii* 15 + *S. cerevisiae* F8 (co-inoculación, densidades celulares 100:1). M: Marcador Peso Molecular. Amplificados: *S. cerevisiae* ~850pb y *P. kudriavzevii* 490 pb.

En la vinificación conducida por el cultivo mixto el 70 % de las colonias procedentes del mosto inicial correspondieron a *P. kudriavzevii* y un 10 % de esta especie se encontró en la muestra del mosto final de esta vinificación pero no en las otras tres muestras en las cuales todos los individuos identificados correspondieron a *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 3.22).

La discriminación a nivel de individuos mediante el análisis de los perfiles de restricción del ADNmit, evidenció que las tres cepas de *S. cerevisiae* son capaces de implantarse, entendiendo por implantación la capacidad de dominar numéricamente a la biota indígena y conducir la fermentación. En el caso de *Sc* F8 y *Sc* F15 se observó un 100 % de implantación y un 80 % de implantación para BA (Figura 3.23).

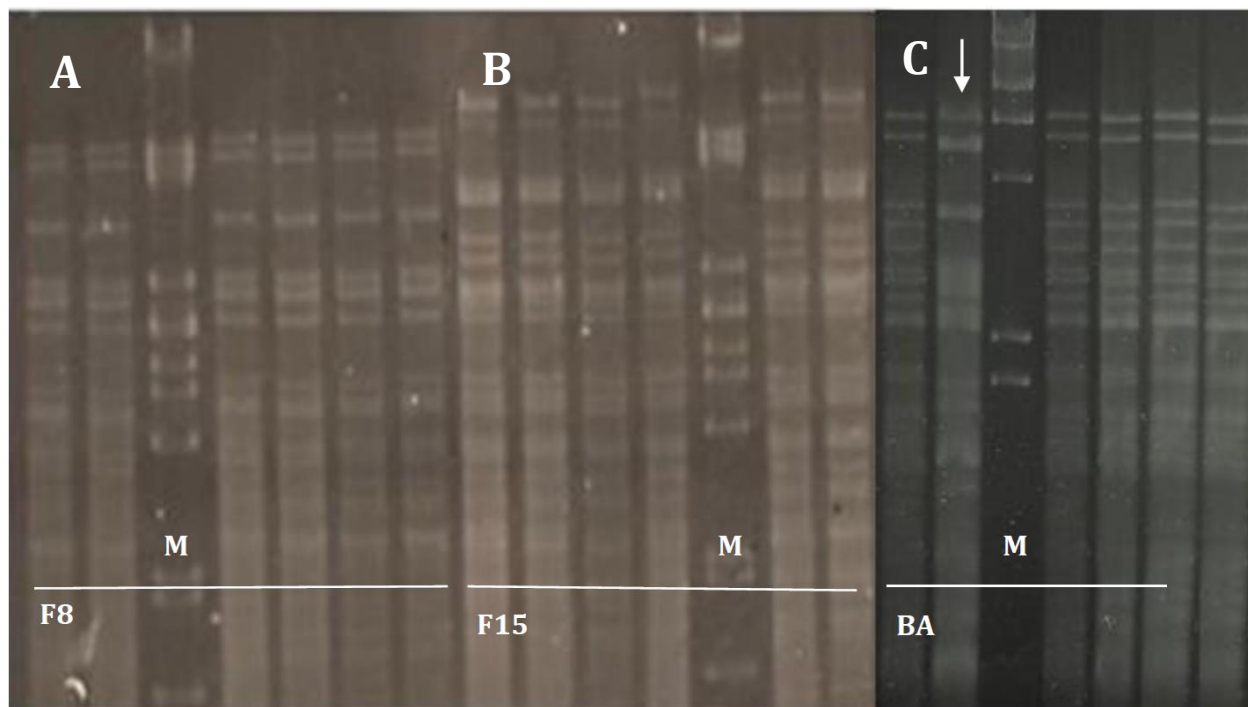


Figura 3.23: Perfiles mitocondriales de cepas de *S. cerevisiae* procedentes de final de fermentación de vinificaciones en tinto conducidas por el cultivo autóctono **A:** *Sc* F8 y los cultivos comerciales **B:** *Sc* F15 y **C:** *Sc* BA, respectivamente. Endonucleasa de restricción: *Hinf* I. M: Marcador de peso molecular. La flecha señala un perfil diferente al del cultivo iniciador *Sc* BA.

Estos resultados evidencian que las células de *Pk* 15 y *Sc* F8 conservaron sus propiedades fermentativas después del proceso de propagación en EBM y que las mismas fueron comparables o superiores a las comerciales utilizadas como controles.

Todos los vinos presentaron características fisicoquímicas de vinos normales (Tabla 3.10) pero BA fue incapaz de secar el mosto ($ART > 2 \text{ g L}^{-1}$) debido a su mayor dificultad de fermentar la fructosa. Los cultivos iniciadores autóctonos presentaron muy buena capacidad para fermentar tanto este monosacárido como la glucosa y el cultivo mixto mostró buena capacidad de producción

de glicerol sin aumento de la acidez volátil (Tabla 3.10). Las concentraciones de ácido málico y ácido láctico en los vinos *Sc F8*, *Sc F8 + Pk 15* y *F15* indicaron que estos cultivos permitieron el desarrollo de la fermentación maloláctica. Este resultado evidenció una buena calidad enológica de los cultivos iniciadores propagados en EBM desde el punto de vista de sus contribuciones a la composición química del vino.

Tabla 3.10: Calidad fisicoquímica de vinos Malbec obtenidos en la Vendimia 2019 mediante fermentaciones alcohólicas conducidas por cultivos iniciadores autóctonos puros (*Sc F8*) y mixtos (*Pk 15+ Sc F8*, relación 100:1 UFC mL⁻¹) y cultivos iniciadores comerciales puros (*BA* y *F15*)

Parámetro	VINOS			
	<i>Sc F8</i>	<i>Pk 15+Sc F8</i>	<i>BA</i>	<i>F15</i>
Etanol % v/v	13,74	13,59	13,90	13,67
ART (g L ⁻¹)	1,90	2,03	2,86	2,21
pH	3,81	3,83	3,80	3,82
Acidez Titulable (g L ⁻¹)*	5,09	5,03	5,77	5,06
Acidez Volátil (g L ⁻¹)#	0,40	0,82	0,30	0,29
Fructosa (g L ⁻¹)	0,74	0,85	2,03	0,91
Glucosa (g L ⁻¹)	0,27	0,20	0,73	0,55
Ácido Málico (g L ⁻¹)	0,41	0,27	1,44	0,81
Ácido Láctico (g L ⁻¹)	0,98	0,63	0,50	0,92
Ácido Cítrico (g L ⁻¹)	0,83	ND	1,13	0,97
Ácido Tartárico (g L ⁻¹)	2,43	2,32	2,46	2,40
Ácido Succínico (g L ⁻¹)	1,35	1,83	1,81	1,23
Glicerol (g L ⁻¹)	7,74	9,02	7,42	6,95

ART: azúcares reductores totales. *Expresado como g L⁻¹ de Ácido Tartárico. # Expresado como g L⁻¹ de Ácido Acético.

Finalmente, se realizó una prueba de preferencia de los consumidores de los vinos elaborados con *F8*, *F15* y *BA* durante un encuentro de bodegueros de la región realizado el 24 de Noviembre del 2019 en Bodega Favretto con motivo del Día del Vino, Bebida Nacional (Figura 3.24). Los consumidores (n=17, enólogos de bodegas regionales) debían degustar tres vinos, rotulados con las letras A, B y C y asignarles a cada uno un valor 1, 2 o 3 según su preferencia. Uno, el preferido en primer lugar, dos en segundo lugar y tres en tercer lugar. En esta degustación a ciegas, para cada vino se obtuvo un promedio que es más cercano a uno cuanto mayor es la preferencia por ese vino. En la Tabla 3.11 se muestran los resultados obtenidos, observándose que el vino elaborado con el cultivo autóctono obtuvo el mejor promedio pero, por el tamaño muestral analizado, la diferencia no fue significativa respecto de la preferencia por el elaborado con el *F15*, pudiendo concluirse que los consumidores mostraron una mayor preferencia por los vinos elaborados con los cultivos iniciadores *F8* y *F15* que por el elaborado con *BA*.



Figura 3.24: Imágenes representativas del evento y la degustación realizados en la Bodega Favretto por el Día del Vino, Bebida Nacional. **Arriba (izquierda):** vinos representativos elaborados por la Bodega; **Abajo (izquierda)** degustación; **Derecha:** mesa de degustación para la prueba de preferencia. Fuente propia.

Tabla 3.11: Prueba de preferencia de los consumidores por los vinos elaborados mediante fermentaciones alcohólicas conducidas por cultivos iniciadores autóctonos (F8) y comerciales (F15 y BA) realizada en noviembre 2019

VINO	PREFERENCIA			
	Promedio	Ranking		
		1	2	3
Sc F8	1,65±0,17 ^a	8	5	4
Sc F15	1,94±0,19 ^a	7	8	2
Sc BA	2,41±0,21 ^b	2	4	11

Medias con superíndices diferentes, son significativamente diferentes, modelo lineal generalizado y prueba de DGC con $p < 0,05$ y $n = 17$.

3.4 DISCUSIÓN

La producción de levaduras destinadas a la elaboración de alimentos fermentados está históricamente relacionada con la producción de la levadura *S. cerevisiae* de panadería, cuyo inicio data de la última parte del Siglo XIX utilizando macerado de granos como sustratos para la propagación de la biomasa (para revisión histórica ver Burrows, 1970). Estos sustratos, ricos en glucosa procedente de la hidrólisis del almidón, se reemplazaron durante el primer tercio del siglo XX por fuentes de carbono y energía menos costosas y ricas en el disacárido sacarosa como son las melazas de caña y remolacha (Reed y Nagodawithana, 1991). Los progresos realizados en el secado de la levadura prensada hacia la forma seca y activa a partir de la cuarta década del siglo pasado permitieron ampliar el mercado de la levadura como insumo industrial hacia otros rubros de alimentos y bebidas fermentadas adicionales a la panificación así como también al desarrollo de probióticos (Reed y Nagodawithana, 1991; Ranadheera *et al.*, 2010; Arévalo Villena *et al.*, 2017). No obstante, en la mayoría de los casos la producción de estos cultivos constituyen sólo un negocio estacional de las empresas dedicadas a la producción de levaduras destinadas a panadería o a la producción industrial de etanol y/o productos farmacéuticos en la que se sigue utilizado melaza para propagar la biomasa y sistemas de cultivo que a través del suministro adecuado de la fuente carbonada (cultivos por lote alimentado, cultivos continuos), minimizan el efecto Crabtree con el fin de mejorar el rendimiento de sustrato en biomasa (Ejiofor *et al.*, 1994; Calado *et al.*, 2003; Garre, 2006; Rodríguez Porrata *et al.*, 2008; Richelle *et al.*, 2014).

En el presente trabajo se propagó la biomasa de la levadura vínica autóctona de la Patagonia *S. cerevisiae* F8 destinada a enología utilizando como sustrato o medio de cultivo, extracto de bagazo de manzana (EBM). Este medio complejo rico en fructosa, generado como subproducto en la industria juguera regional, suplementado con 1,2 g L⁻¹ de nitrógeno fácilmente asimilable permitió obtener en cultivos por lote operados a 30 °C y pH=6 rendimientos de sustrato en biomasa de 0,52 gg⁻¹ en 24 h (Tabla 3.7). Estos valores son superiores a los reportados en la bibliografía de 0,47 gg⁻¹, 0,48 gg⁻¹ y de 0,50 gg⁻¹ obtenidos en sistemas por lote y tiempos de producción mayores a 48 h utilizando hidrolizados de almidón de mandioca, remolacha nigeriana y jugo de anacardo, respectivamente (Aransiola *et al.*, 2006; Solomon *et al.*, 1991; Layokun *et al.*, 1986), también superan al de 0,47 gg⁻¹ obtenido en un sistema por lote alimentado y una mezcla de melazas de caña y remolacha como sustrato con 72 h de producción (Garre, 2008) y es similar al de 0,53 gg⁻¹ obtenido para *S. cerevisiae* propagada en frascos agitados y galactosa luego de 96 h de cultivo (Calado *et al.*, 2003).

El extraordinario rendimiento obtenido en las condiciones ensayadas puede atribuirse a la ausencia de represión por catabolito (efecto Crabtree) o a una mitigación de este efecto originado por el consumo preferencial de la fructosa desde el inicio del proceso y durante una parte significativa de la etapa de multiplicación celular (Figuras 3.14). Glucosa y fructosa son trasladadas al interior celular por los mismos transportadores (Hxt), pero las afinidades de éstos por la glucosa son mayores que por la fructosa (2,1 mM vs. 4,6 mM para Hxt7 y 65 mM vs. 125 mM para Hxt3) (Guillaume *et al.*, 2007). Cuando ambos azúcares están en el medio en cantidades equimolares, como ocurre por ejemplo al inicio de la vinificación, la glucosa por inhibición competitiva disminuye el ingreso de fructosa a la célula, observándose un consumo preferencial de la primera. En el extracto de bagazo de manzana, sin embargo, las relaciones molares fructosa: glucosa al inicio de proceso de propagación son de 4:1 en favor de la fructosa, quien revierte la inhibición por dilución ingresando a la célula. Este supuesto está sostenido por el rápido consumo de fructosa observado en el ensayo de optimización (Figura 3.13) y en el proceso de propagación seleccionado (Figuras 3.14). Por otro lado, también está reportado que la presencia de glucosa dispara en la célula de *S. cerevisiae* otro tipo de respuesta (similar a las gatilladas por hormonas en los eucariotas superiores) que está mediada por un aumento intracelular del AMPc y la activación de la proteína quinasa A (PKA) (Verstrepen *et al.*, 2007; Dawes y Perrone, 2020). Este mecanismo, denominado vía de las Ras/AMPc/PKA controla la expresión de genes involucrados en ciertos aspectos del metabolismo y en la resistencia a estrés, entre otros. Entre los múltiples efectos descritos, la activación de esta vía estimula la glucólisis e inhibe la gluconeogénesis reforzando Crabtree, y reprime la expresión de genes de respuesta al estrés, en particular la síntesis de proteínas de choque térmico y de la trehalosa (Thevelein y DeWinde, 1999). Está documentado que, únicamente la glucosa y la sacarosa pueden activar esta vía de señalización (Rolland, *et al.*, 2000), capacidad ausente en otros carbohidratos entre ellos la fructosa (Verstrepen *et al.*, 2007). La capacidad de las células de *S. cerevisiae* de sintetizar trehalosa frente al estrés generado por la limitación de nitrógeno en el ensayo de optimización (Figura 3.13) es un resultado a favor del supuesto que, en esas condiciones de propagación, la glucosa es incapaz de activar esta vía de señales y, por homología, la represión por catabolito aun cuando sus concentraciones en el EBM superan las concentraciones umbral para disparar dichas vías (10-40 mM) (Verstrepen *et al.*, 2007). Queda por discutir la capacidad de la fructosa de ejercer represión por catabolito como lo hacen la glucosa y la sacarosa. Los resultados publicados en la bibliografía parecen indicar que este monosacárido ejerce represión por catabolito (efecto Crabtree) aunque en menor grado que la glucosa (Dynesen *et al.*, 1998). El mecanismo molecular del efecto Crabtree es todavía un tema de discusión entre los

científicos (Rosas Lemus *et al.*, 2018). Una de las hipótesis planteadas para explicar su aparición propone que la fructosa 1,6 bifosfato (Fru 1,6 P), producto del paso limitante que abre el flujo de C hacia la glucólisis, podría regularlo positivamente a través de modular la permeabilidad de la mitocondria (Díaz-Ruiz *et al.*, 2008; Rosas-Lemus *et al.*, 2014; Hammad *et al.*, 2016). Cuando la fructosa ingresa a la célula es inmediatamente fosforilada a fructosa-6 fosfato (Fru6P). La Fru6P según las condiciones fisiológicas de la célula puede abrir el flujo de carbono hacia la glucólisis, fosforilándose a fructosa 1,6 bifosfato (Fru1,6P), o hacia las vías biosintéticas de di y polisacáridos, la trehalosa entre otros, por isomerizaciones sucesivas a glucosa-6 fosfato (Glu6P) y glucosa 1-fosfato (Glu1P). Por otra parte, está demostrado que el metabolismo biosintético de la trehalosa disminuye el flujo de carbono hacia la glucólisis (Bolat, 2008). En este contexto y en las condiciones de los ensayos, el efecto Crabtree generado por la fructosa sería de baja intensidad y la concentración de etanol producido estaría por debajo de su límite de cuantificación (Figura 3.14) hasta estadios del proceso cuando menores concentraciones relativas de fructosa a glucosa en el medio, favorecen el ingreso de esta última a la célula disparando Crabtree. La aparición de etanol en el medio, concomitante con una disminución intracelular de la trehalosa después del primer agregado de nitrógeno en el ensayo de optimación, es consistente con este supuesto (Figura 3.13). Resumiendo, el proceso conducido a la temperatura que promueve el máximo crecimiento celular (Tablas 3.3 y 3.8) utilizando EBM con contenidos mínimos de nitrógeno asimilable coloca a las células en una condición de estrés casi permanente por restricción nutricional durante su propagación, mejorando el rendimiento por mitigación del efecto Crabtree causado por el desvío de parte del flujo de carbono hacia la síntesis de trehalosa, rindiendo células en mejores condiciones bioquímicas/fisiológicas (alto contenido intracelular de trehalosa) para enfrentar el proceso de deshidratación. Condiciones menos estresantes para las células, como son una menor temperatura de crecimiento (25 °C) o una mayor disponibilidad de nitrógeno (4 g L⁻¹) desvían el metabolismo de la fructosa hacia la glucólisis promoviendo desde el inicio del proceso la fermentación en favor de la respiración (efecto Crabtree) y reflejada en la aparición temprana de etanol en los medios de cultivo (Figuras 3.16 y 3.17), disminuyendo el rendimiento de sustrato en biomasa y la calidad bioquímica de ésta, evaluada por sus contenidos endógenos de trehalosa (Tabla 3.7).

Lo novedoso del proceso de propagación de células de *S. cerevisiae* (levadura Crabtree positiva) desarrollado en este trabajo de Tesis Doctoral fue proponer un cambio sustancial en la calidad del medio de cultivo que permitió la optimización del rendimiento de sustrato en biomasa mediante un manejo adecuado de la temperatura y del suministro de la fuente nitrogenada y no de la fuente carbonada. Esta propuesta tiene al menos dos aspectos ventajosos desde el punto de vista

industrial respecto de los procesos por lote alimentado tradicionales, permite realizar la propagación de la biomasa en cultivos por lotes disminuyendo los tiempos de producción a 24 h y produce una biomasa en mejores condiciones bioquímicas/fisiológicas y que requiere un mínimo tratamiento de preparación para su procesamiento posterior debido a la mínima cantidad de fuente carbonada presente en el caldo que la contiene y que por su naturaleza química generalmente ocasiona problemas en las operaciones de extrusado y deshidratado.

La capacidad demostrada por las células de *S. cerevisiae* F8 propagadas en EBM 30 °C y 1,2 g L⁻¹ de nitrógeno de implantarse exitosamente con rápido inicio del proceso fermentativo (Figuras 3.21) y conducirlo hasta el final (Figuras, 3.22 y 3.23), su extraordinaria capacidad de secado del mosto permitiendo obtener vinos secos (Tabla 3.10) en menores tiempos de producción (Figura 3.21) y la calidad enológica (Tabla 3.10) y sensorial acreditada mediante la prueba de preferencia de consumidores calificados (enólogos)(Tabla 3.11) evidencia que la propagación en EBM conserva intactas las excelentes propiedades tecnológicas y enológicas de esta cepa demostrada en vinificaciones previas realizadas a escala industrial pero propagada en pie de cubas con mostos de uva (del Mónaco *et al.*, 2014; del Mónaco *et al.*, 2016).

Es de destacar que, salvando las diferencias en la disponibilidad de oxígeno y presencia de etanol en el medio, las condiciones de propagación de la biomasa en el proceso propuesto son similares a las que debe enfrentar *S. cerevisiae* al momento de llevar a cabo el secado del mosto en la vinificación, cuando todavía quedan en el medio concentraciones importantes de los azúcares en relaciones molares fructosa: glucosa 4:1 y restricciones nutricionales por limitación de nitrógeno asimilable. La incapacidad de las cepas de levaduras para asimilar la fructosa en estas condiciones es una de las causas propuestas como causantes de paradas de la FA (*stuck fermentation*) (Bisson, 1999), un fenómeno indeseable en el sector productivo por el aumento en los costos de producción que ocasiona.

El consumo de fructosa durante la propagación de la biomasa y las condiciones estresantes mantenidas durante una parte importante del proceso que la obligan a la síntesis de trehalosa podrían contribuir a una mejor preparación de la células de levaduras para enfrentar las condiciones estresantes de la vinificación. La trehalosa es un disacárido no reductor de importancia en la respuesta a distintos tipos de estrés debido a su capacidad de proteger a las membranas celulares de la deshidratación y de prevenir la desnaturalización de proteínas (Wiemken, 1999; Bolat, 2008; Zhang *et al.*, 2020), riesgos que deben enfrentar las levaduras enológicas a medida que la vinificación avanza por sus exposiciones las crecientes concentraciones de etanol. Las concentraciones de trehalosa endógenas reportadas en este trabajo para *S. cerevisiae* así como para

P. kudriavzevii (Tabla 3.7) son del mismo orden de magnitud que las reportadas en bibliografía para levaduras *Saccharomyces* y non-*Saccharomyces* de las especies *Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* y *Lachancea thermotolerans* en respuesta a estrés nutricional (Anchieta Câmara Júnior *et al.*, 2018 y 2019) y oxidativo (Gamero Sandemetrio, 2016) y es el primer resultado reportado en bibliografía sobre la capacidad de sintetizar trehalosa en respuesta a estrés por parte de levaduras de *Pichia kudriavzevii* así como también la propagación de sus células en cultivos por lote a escala piloto.

La propagación de la biomasa de la cepa Patagónica de esta especie *Pk 15* en cultivos por lotes operados a 30 °C y utilizando como medio de cultivo EBM suplementado con 4 g L⁻¹ de nitrógeno fácilmente asimilable y pH=7 mostró a las 24 h de cultivo un rendimiento de sustrato en biomasa de 0,64 gg⁻¹, significativamente superior al obtenido para *Sc F8* (Tabla 3.7). Este resultado es consistente con el carácter Crabtree negativo de la especie *P. kudriavzevii*. La evolución del contenido de azúcares en el caldo durante el proceso de propagación evidenció que la cepa mantuvo la incapacidad de asimilar sacarosa propia de la especie y el marcado carácter glucofílico ya evidenciado en los ensayos iniciales (Tabla 3.5 y Figura 13.17B) mostrando, en las condiciones ensayadas, imposibilidad de consumir totalmente la fructosa, cuya concentración residual en el caldo fue el 36 % de la inicial (Figura 3.17). Por otra parte, a las 12 h y 24 h de cultivo las células muestran concentraciones altas y crecientes de trehalosa intracelular indicativas de la exposición de la cepa a algún tipo de estrés, que de ser nutricional en este caso no estaría relacionado con la disponibilidad de nitrógeno ya que los valores de FAN al final del ensayo se mantuvieron por encima del gramo por litro (Tabla 3.7). A pesar de los buenos resultados obtenidos en el rendimiento de sustrato en producto y en las calidades bioquímica y tecnológica de la biomasa propagada evidenciadas en los procesos de vinificación realizados a escala industrial (Figura 3.21 y 3.22 y Tabla 3.10) resulta necesario realizar nuevos ensayos tendientes a optimizar el proceso en función de disminuir el nivel de residuos carbonados en el caldo final los que, como ya se señalara, representan un problema en los tratamientos posteriores de la biomasa requeridos para su secado.

La potencial aplicación de *P. kudriavzevii* en procesos adicionales a la vinificación y elaboración de otras bebidas fermentadas, como son la producción de compuestos químicos de valor industrial (Elahi, 2018; Martinez-Avila *et al.*, 2020; Ojha y Das, 2020), el control de fitopatógenos postcosecha (Liu *et al.*, 2019) así como sus efectos beneficiosos en salud humana mediante su capacidad probiótica (Saadat *et al.*, 2020) alientan su producción industrial en la forma de LSA constituyendo una posibilidad cierta para la diversificación productiva en el mediano plazo de la empresa que se pretende desarrollar.

3.5 BIBLIOGRAFÍA

- Aransiola, E.F., Betiku, E., Adetunji, O.A. and Solomon, B.O. (2006). Production of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) from row cassava starch hydrolizates in a biorreactos under *batch* process. *Biotechnology*. 5(1): 98-103.
- Arevalo-Villena, M., Briones-Perez, A., Corbo, M.R., Sinigaglia, M. and Bevilacqua, A. (2017). Biotechnological application of yeasts in food science: Starter cultures, probiotics and enzyme production. *Journal of Applied Microbiology*. 123:1360-1372. doi:10.1111/jam.13548.
- Bauer, S.A.W., Schneider, S., Behr, J., Kulozik, U. and Foerst, P. (2012). Combined influence of fermentation and drying conditions on survival and metabolic activity of starter and probiotic cultures after low-temperature vacuum drying. *Biotechnology for Enhancing Plant Production and Food Quality*. 159(4): 351-357.
- Bayrock, D. and Ingledew, W.M. (1997). Mechanism of viability loss during fluidized bed drying of baker's yeast. *Food Research International*. 30(6): 417-425. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(97\)00072-0](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(97)00072-0).
- Bertini, E. (2018). Importancia de los mecanismos de Quorum Sensing en las interacciones entre microorganismos endofíticos. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Tucumán Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia.
- Bisson, L. (1999). Stuck and Sluggish Fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*. 50: 107-119.
- Bolat, I. (2008). The importance of trehalose in brewing yeast survival Innovative. *Romanian Food Biotechnology*. 2 (30): 1-10.
- Brewster, J.L., de Valoir, T., Dwyer, N.D., Winter, E. and Gustin, M.C. (1993). An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science*. 259:1760-1763. doi:10.1126/science.7681220.
- Burrows, S. (1970). Baker's yeast. In *The Yeasts*. volume 3, A. H. Rose and]. S. Harrison (eds.). Academic Press, New York.
- Calado, C.R.C. Almeida, C., Cabral, J.M.S. and Fonseca, L. P. (2003). Development of a *fed-batch* cultivation strategy for the enhanced production and secretion of cutinase by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* SU50 strain. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 96: 141-148.
- Chen, S.L. and Chiger, M. (1985). Production of baker's yeast. In *Comprehensive biotechnology*. Blanch, H.W., Drew, S. and Wang, D.I.C. (eds). New York: Pergamon Press. 429-462.
- Comisión Nacional del Medio Ambiente - Región Metropolitana. (1998). Guía para el control y prevención de la contaminación industrial, fábrica de levaduras.
- Dawes, I. W. and Perrone, G.G. (2020). Stress and Ageing in Yeast. *FEMS Yeast Research*. 20 (1) February 2020. doi: <https://doi.org/10.1093/femsyr/foz085>.
- de Anchieta Câmara Júniora A., Nguyena T. D. Jossiera A., Endrizzib A., Saurela R. Simonina H. and Hussona F. (2018). Improving total glutathione and trehalose contents in *Saccharomyces cerevisiae* cells to enhance their resistance to fluidized bed drying. *Process Biochemistry*. 69: 45-51.
- de Anchieta Câmara Júnior, A., Maréchal, P.A., Tourdot-Maréchal R. and Husson, F. (2019). Dehydration stress responses of yeasts *Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima*

- and *Lachancea thermotolerans*: Effects of glutathione and trehalose biosynthesis. *Food Microbiology*. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.12.008>.
- De Virgilio, C., Hottiger, T., Domínguez, J., Boller, T. and Wiemken, A. (1994). The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. I. Genetic evidence that trehalose is a thermoprotectant. *European Journal of Biochemistry*. 219: 179-186.
- del Mónaco, S.M., Curilén, Y., Maturano, R.C., Bravo, S.M.E., Simes, A.B. and Caballero, A.C. (2014). The use of indigenous yeasts to develop high-quality Patagonian Wines. En: *Morata A and Loira I Eds. Grape and Wine Biotechnology*. 325-344.
- del Mónaco, S.M., Rodríguez, M.E. and López, C.A. (2015). *Pichia kudriavzevii* as a representative yeast of North Patagonian winemaking terroir. *International Journal of Food Microbiology*. 230:31-9.
- del Mónaco, S.M., Curilén, Y.L., Bravo, S.M.E., Simes, A.B., Carreño, V.A., Maturano, R.C., Caballero, A.C. (2016). Wild yeasts selection for high quality Patagonian wines” *. In: *Biology and Biotechnology of Patagonian Microorganisms*. Series Microbiology. Eds. Olivera N., Libkind D. and Donatti E. Ed Springer, Nueva York Part III *Yeast Biotechnology*. Chapter 16. 30pp. ISBN: Print book: 978-3-319-42799-7. Ebook 978-3-319-42801-7.
- Di Rienzo, J.A., Guzmán, A.W. and Casanoves, F. (2002). A Multiple Comparisons Method based on the Distribution of the Root Node Distance of a Binary Tree. *Journal of Agricultural Biological Environmental Statistics*. 7(2): 129-142.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M. and Robledo, C.W. (2020). InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Díaz-Ruiz, R., Avéret, N., Araiza, D., Pinson, B., Uribe-Carvajal, S., Devin, A. and Rigoulet, M. (2008). Mitochondrial oxidative phosphorylation is regulated by fructose 1,6- biphosphate. A possible role in Crabtree effect induction?. *Journal of Biological Chemistry*. 283: 26948-26955.
- Divate, N.R., Chen, G.H., Divate, R.D., Ou, B.R. and Chung, Y.C. (2017). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improvement in stresses tolerance. *Bioengineered*. 8:524-535.
- Dynesen, J., Smits, H. P., Olsson, L. and Nielsen, J. (1998). Carbon catabolite repression of invertase during *batch* cultivations of *Saccharomyces cerevisiae*: the role of glucose, fructose and mannose. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 50: 579-582.
- Ejiofor, A.O., Posten, C.H., Solomon, B.O. and Deckwer, W.D. (1994). A robust *fed-batch* feeding strategy for optimal parameter estimation for baker's yeast production. *Bioprocess Engineering*. 11: 135-144.
- Elahi, A. R. (2018). Bioconversion of hemicellulosic materials into ethanol by yeast, *Pichia kudriavzevii* 2-KLP1, isolated from industrial waste. *Revista Argentina de Microbiología*. 50(4):417-425.
- Ertola, R., Yantorno, O y Mignone, C. (1994). Microbiología Industrial. http://www.science.oas.org/Simbio/mbio_ind/mbio_ind.htm. Ben Gurion University, Israel.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. and Quero, A. (1999). Identification of yeast by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49:329-337.

- Fernández-Espinar, M., Esteve-Zarzoso, B., Querol, A. and Barrio, E. (2000). RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 78:87-97.
- Foerst, P. and Santivarangkna, C. (2015). Advances in starter culture technology: focus on drying processes. En: *Advances in Fermented Foods and Beverages Holzapfel W.* (Ed.) Woodhead Publishing, Elsevier Ltd. Chapter 11. 249-270. ISBN: 978-1-78242-015-6. doi <https://doi.org/10.1016/C2013-0-16431-8>.
- François, J. and Parrou, J.L. (2002). Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*. 25(1):125–145. doi: 10.1111/j.1574-6976.2001.tb00574.x.
- Gamero Sandemetrico, E. (2016). Caracterización molecular de la resistencia a estrés oxidativo de levaduras vínicas de los géneros *Saccharomyces* y non-*Saccharomyces* para la mejora de su producción como levadura seca mediante el uso de aceite de argán como antioxidante natural. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.
- Garre, E. (2008). Caracterización y mejora de la resistencia de las levaduras vínicas a la deshidratación en la producción de levadura seca activa. Tesis Doctoral. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Valencia y en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. 122-142.
- Garre, E., Raginel, F., Palacios, A., Julien, A. and Matallana, E. (2010). Oxidative stress responses and lipid peroxidation damage are induced during dehydration in the production of dry active wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology*. 136(3):295-303. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.10.018.
- Gervais, P., Marechal, P.A. and Molin P. (1992). Effects of the kinetics of osmotic pressure variation on yeast viability. *Biotechnology and Bioengineering*. 40(11):1435-1439.
- Gómez-Pastor, R., Pérez-Torrado, R., Garre, E. and Matallana, E. (2011). Recent Advances in Yeast Biomass Production. En: *Biomass- Detection, Production and Usage*. Matovic D (Ed) InTech Europa Rijeka, Croacia. Capítulo 11. 201-222. ISBN 978-953-307-492-4. doi: 10.5772/19458.
- Guardado, F. (2007). Estudio de interacciones bacterias ácido lácticas- levaduras en una fermentación para la elaboración de una bebida alcohólica. Tesis Maestría. Centro de investigación y asistencia en tecnología y diseño del estado de Jalisco.
- Guillaume, C., Delobel, P., Sablayrolles, J.M. and Blondin, B. (2007). Molecular basis of fructose utilization by the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a mutated HXT3 allele enhances fructose fermentation. *Applied Environmental Microbiology*. 73:2432–2439.
- Guyot, S., Ferret, E. and Gervais P. (2006). Yeast survival during thermal and osmotic shocks is related to membrane phase change. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(22):8450-8455.
- Hammad, N., Rosas-Lemus, M., Uribe-Carvajal, S., Rigoulet, M., Devin, A. (2016). The Crabtree and Warburg effects: do metabolite-induced regulations participate in their induction?. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*. doi: 10.1016/j.bbabi.2016.03.03.

- Hansch, M., Ruckerbauer, D., Chauhan, N., Hofbauer H., Krahulec, S., Nidetzky, B., Kohlwein, S., Zanghellini, J. and Natter, K. (2012). Nutritional requirements of the BY series of *Saccharomyces cerevisiae* strains for optimum growth. *FEMS Yeast Research*. 12:796–808.
- Higashiyama, T. (2002). Novel functions and applications of trehalose. *Pure and Applied Chemistry*. 74(7): 1263–1269.
- Hohmann, S. and Mager, W. H. (1997). Introduction: Stress response: Mechanism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In S. Hohmann, and W. H. Mager (Eds.). *Yeast stress responses. Molecular Biology Intelligence Units*. 1-6.
- Hohmann, S. (2002). Osmotic stress signalling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 66:300-372.
- Hounsa, C.G., Brandt, E.V., Thevelein, J., Hohmann, S. and Prior, B.A. (1998). Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiology*. 144(3):671-680.
- Kim, J., Alizadeh, P., Harding, T., Hefner-Gravnik, A. and Klionsky, D.J. (1996). Disruption of the yeast ATH1 gene confers better survival after dehydration, freezing and ethanol shock: potential commercial application. *Applied Environmental Microbiology*. 62(5):1563-1569.
- Layokun, S.K., Obawole, A.B., Fatile, I.A. and Solomon, B.O. (1986). Investigation of cashew apple juice as a substrate for single cell protein production. *Journal of Food Science*. 51:237-238.
- Lewis, J.G., Learmonth, R.P., Attfield, P.V. and Watson, K. (1997). Stress co-tolerance and trehalose content in baking strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 18:30-36.
- Lillie, S.H. and Pringle J.R. (1980). Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: response to nutrient limitation. *Journal of Bacteriology*. 143:1384-1394.
- Liu, X., Gao, Y., Yang, H., Li, L., Jiang, Y., Li, Y., Zheng, J. (2019). *Pichia kudriavzevii* retards fungal decay by influencing the fungal community succession during cherry tomato fruit storage. *Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103404>.
- Lopes, C.A., Rodríguez, M.E., Sangorrín, M., Querol, A. and Caballero, A.C. (2007). Patagonian wines: the selection of an indigenous yeast starter. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 34(8):539-546.
- Magalhaes, R.S.S., Popova, B., Braus, G.H., Outeiro, T.F. and Eleutherio, E.C.A. (2018). The trehalose protective mechanism during thermal stress in *Saccharomyces cerevisiae*: the roles of Ath1 and Agt1. *FEMS Yeast Res.* doi: 10.1093/femsyr/foy066.
- Martínez, R., Morales, P., González, R., Mas, A. and Beltran, G. (2012). Biomass production and alcoholic fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* as a function of nitrogen source. *FEMS Yeast Research*. 12: 477-485.
- Martínez-Avila, O., Sanchez, A., Font, X. and Barrena, R. (2020). 2-phenylethanol (rose aroma) production potential of an isolated *Pichia kudriavzevii* through solid-state fermentation. *Process Biochemistry*. 93:94–103.
- McKinlay A., Gerard W. and Fields S. (2012). Global analysis of RNA oxidation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechniques*. 52:109-111.
- Morano, K.A., Grant C.M. and Moye-Rowley W.S. (2012). The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 190:1157-1195.

- Morris, G.J., Winters, L., Coulson, G.E. and Clarke, K.J. (1986). Effect of osmotic stress on the ultrastructure and viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. 132(7): 2023–2034.
- Ojha, N., Das, N. (2020). Process optimization and characterization of polyhydroxyalkanoate copolymers produced by marine *Pichia kudriavzevii* VIT-NN02 using banana peels and chicken feather hydrolysate. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, en prensa. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101616>.
- Oteiza, J.M. (2016). Prácticas de Laboratorio en Microbiología de los Alimentos. Curso de posgrado de Microbiología de los Alimentos. UNCo-FACTA.
- Parrou, J.L., Teste, M.A. and François, J. (1997). Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalosa. *Microbiology*. 143(6):1891-1900.
- Peña, C. and Arango, R. (2008). Evaluation of ethanol production using recombinant strains of *Saccharomyces cerevisiae* from sugar cane molasses. *DYNA*. 76(159):153-161. ISSN: 0012-7353.
- Pérez-Torrado, R., Bruno-Bárcena, J.M. and Matallana, E. (2005). Monitoring Stress-Related Genes during the Process of Biomass Propagation of *Saccharomyces cerevisiae* Strains Used for Wine Making. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(11):6831–6837. doi:10.1128/AEM.71.11.6831–6837.2005.
- Pérez-Torrado, R., Gómez-pastor R., Larsson C. and Matallana E. (2009). Fermentation capacity of dry active wine yeast requires a specific oxidative stress response during industrial biomass growth. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 81:951-960.
- Postma, E., Verduyn, C, Scheffers, W.A. and van Dijken, J.P. (1989). Enzymic analysis of the Crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied of Environmental Microbiology*. 55:468–477.
- Potts, M. (2001). Desiccation tolerance: a simple process. *Trends in Microbiology*. 9:553–559. doi: 10.1016/s0966-842x(01)02231-4.
- Pretorius, I.S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*. 16:675–729.
- Querol, A., Barrio, E., Huerta, T. and Ramón, D. (1992). Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 58:2948–2953.
- Reed, G. and Nagodawithana, T.W. (1991). Baker's yeast production En: *Yeast Technology*. 2ª Edición Springer, Dordrecht Capítulo 6, pagina 261-314. ISBN 978-94-011-9773-1-7. doi: doi.org/10.1007/978-94-011-9771-7_7.
- Richelle, A., Fickers, P. and Bogaerts, P. (2014). Macroscopic modelling of baker's yeast production in *fed-batch* cultures and its link with trehalose production. *Computers and Chemical Engineering*. 61:220-233.
- Rodríguez-Porrata, B., Novo, M., Guillamón, J., Rozès, N., Mas, A. and Cordero-Otero, R. (2008). Vitality enhancement of the rehydrated active dry wine yeast. *International Journal of Food Microbiology*. 126:116–122.

- Rohlf, F.J. (2000). NTSYS-PC: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.1. Exeter Software: Setauket, New York.
- Rolland, F., De Winde, J.H., Lemaire, K., Boles, E., Thevelein, J.M. and Winderickx, J. (2000). Glucose-induced cAMP signalling in yeast requires both a G-protein coupled receptor system for extracellular glucose detection and a separable hexose kinase-dependent sensing process. *Molecular Microbiology*. 38: 348–358.
- Rosas Lemus, M., Elodie Roussarie, X., Hammad, N., Mougeolle, A., Ransac, S., Issa, R., Mazat, J. P., Uribe-Carvajal, S., Rigoulet, M. and Devin, A. (2018). The role of glycolysis-derived hexose phosphates in the induction of the Crabtree effect. *Journal of Biological Chemistry*. 293(33): 12843–12854. doi: 10.1074/jbc.RA118.003672.
- Saadat, Y.R., Khosroushahi, A.Y., Movassaghpour, A.A., Talebi, M., Gargari, B.P. (2020). Modulatory role of exopolysaccharides of *Kluyveromyces marxianus* and *Pichia kudriavzevii* as probiotic yeasts from dairy products in human colon cancer cells. *Journal of Functional Foods*. 64:103675.
- Solomon, B.O., Erickson, L.E., Hess, J.E. and Yang, S.S. (1982). Maximum likelihood estimation of growth yields. *Biotechnology and Bioengineering*. 24:663-649.
- Solomon, B.O., Layokun S.K. and Omobuwajo, T.O. (1991). Nigerian blackstrap molasses as substrate for the production of single cell protein with particular reference to baker's yeast. *Ife Journal Technology*. 3:25-29.
- Suárez-Lepe, J.A. and Morata, A. (2011). Medidas para paliar los efectos del cambio climático. *La Semana vitivinícola*. 342-347. ISSN 0037-184X.
- Taskila S. (2017). Industrial production of starter cultures En: Starter Cultures by Food Production. Speranza B., Bevilacqua A. Corbo M. R., Sinigaglia M. (Eds.) Primera Edición, John Wiley and Sons, Ltd. Capítulo 5. 79-100. <https://doi.org/10.1002/9781118933794.ch5>.
- Thevelein, J.M. and DeWinde, J.H. (1999). Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*. 33: 904-918.
- Valentinotti, S., Srinivasana, B., Holmberg, U. D., Bonvina, Cannizzaro, C., Rhielb, M. and Von Stockar, U. (2003). Optimal operation of *fed-batch* fermentations via adaptive control of overflow metabolite. *Control Engineering Practice*. 11: 665–674.
- Van Hoek P., de Hulster, E., Van Dijken J.P. and Pronk J.T. (2000). Capacidad fermentativa en cultivos alimentados por lotes de alta densidad celular de levadura de panadería. *Biotechnología y Bioingeniería*. 68(5):517-23. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290.
- Verstrepen, K.J., Iserentant, D., Malcorps, P., Derdelinckx, G., Van Dijk, P., Winderickx, J., Pretorius, I. S., Thevelein, J.M. and Delvaux, F.R. (2004). Glucose and sucrose: hazardous fast-food for industrial yeast?. *TRENDS in Biotechnology*. 22(10):531-537. doi:10.1016/j.tibtech.2004.08.001.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990). PCR protocols. A guide to methods and applications. In *Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics* ed. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. pp. 315–322. San Diego, CA: Academic Press.

- Wiemken, A. (1990). Trehalose in yeast: stress protectant rather than reserve carbohydrate. *International. Journal of Genetic Molecular Microbiology*. 58:209-217.
- Zhang, X., Zhang, Y., Li, H., (2020). Regulation of trehalose, a typical stress protectant, on central metabolisms, cell growth and division of *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D. *Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103459>.
- Zwietering, M., Jongenburger, I., Rombouts, F. and Van't Riet, K. (1990). Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Applied and Environmental Microbiology*. 1875-1881.

CAPÍTULO 4

Producción de Levadura Seca Activa Propagada en Extracto de Bagazo de Manzana

Evaluación de la factibilidad técnico-económica

4.1 IMPORTANCIA DEL PROYECTO

En el presente capítulo se desarrollara la factibilidad técnica y económica para la creación de una empresa de base tecnológica de producción de levaduras de uso enológico utilizando extracto de bagazo de manzana como sustrato para la propagación de la biomasa, de forma de llevar a la práctica los resultados obtenidos en la tesis mediante su transferencia al sector de la agroindustria. Se espera que la aplicación de este proyecto genere un fuerte y positivo impacto tanto en lo social como en lo económico.

En la actualidad, Argentina es el quinto país productor de vino con una demanda de aproximadamente 276 toneladas de LSA que debe importarse (dato obtenido a partir de estadísticas realizadas por el INV 2019), ya que no existe una empresa productora nacional, y cuya disponibilidad está sujeta a logística de importaciones y cambios en el precio del dólar (INV 2019).

De las regiones vitivinícolas argentinas la región sur, constituida por zonas específicas de las provincias de Neuquén, Río Negro, La Pampa y Chubut (Figura 4.1), cuenta actualmente con un total de 45 bodegas (INV 2020) y una producción de vino tinto de 72.687, 33.778, 4.770 y 325 hectolitros, respectivamente (INV 2019). Adicionalmente se registran en la región 46 productores de vinos artesanales y 44 de vino casero (INV 2020).

El rendimiento en vino es de 750 mL por kg de mosto. Siendo el consumo teórico 20 a 40 g de LSA (dependiendo de las condiciones sanitarias de la materia prima) por quintal de mosto de uva (100 kg), la demanda de levadura seca activa (LSA) de la región es de 2.974 a 5.948 kg anuales. Este producto se comercializa en paquetes de 0,5 kg y el precio de una de las marcas más reconocidas, Laffort®, es de U\$S 40, (precio actualizado a febrero 2020). Se espera que las bodegas regionales sustituyan estos insumos importados por levaduras autóctonas y el potencial de la demanda a nivel nacional es de 276.163 a 552.326 kg LSA.

4.1.1 MISIÓN

1. Situarse como una Empresa de Base Tecnológica, orientada a ofrecer levaduras para la elaboración de vinos de calidad controlada y diferencial, que se identifiquen con la región productora y en el futuro con el *terroir* o bodega elaboradora.
2. Producir otras levaduras para aplicaciones en panificados, probióticos, balanceados para peces, mamíferos y aves, control de plagas, descontaminación ambiental, entre otros, usando como materia prima para la propagación de la biomasa, extracto de bagazo de manzana.
3. Reducir importaciones y crear empleos de alto valor económico y conocimiento.
4. Crear una compañía rentable.

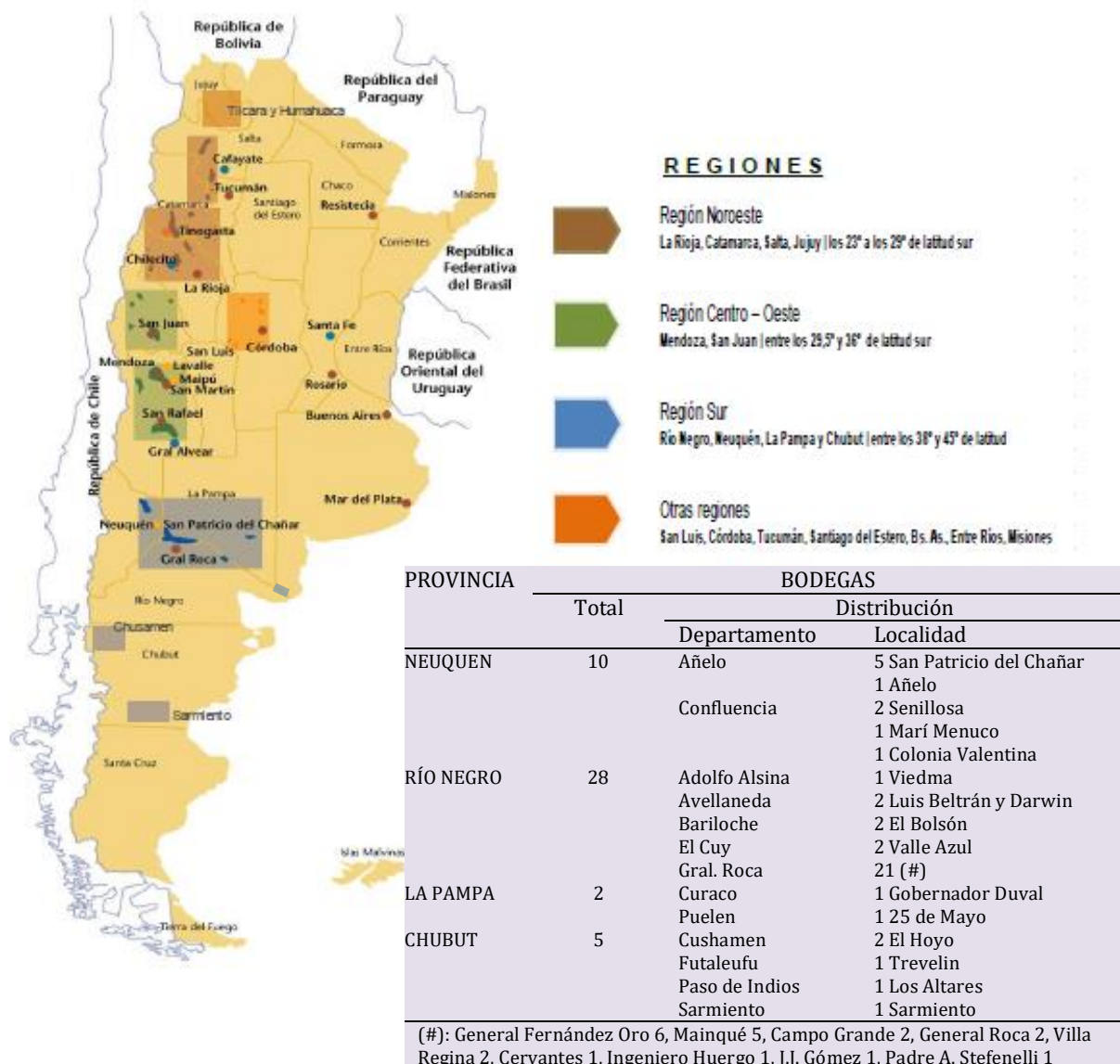


Figura 4.1: Mapa vitivinícola de la Argentina (extraído de INV 2018). Inserto: Bodegas Región Sur, datos INV 2020 (Elaboración propia).

4.1.2 VISIÓN

1. Proveer una variedad de levaduras en función de los mercados a cubrir, ofreciendo siempre un producto de calidad certificada, que cubra las necesidades de productores a nivel regional, nacional y compita con los importados. Situar como marca referente en cuanto a la producción de levadura seca activa a nivel nacional, y como empresa emprendedora de excelencia.

4.1.3 MERCADO

El mercado consumidor de la levadura seca activa está ligado al mercado de elaboración de vinos. El mercado objetivo en primera instancia apunta a abastecer a los productores vitivinícolas de la región sur, consolidando la marca. Si bien la producción regional de vinos ha sufrido una contracción en los últimos años, sigue siendo un mercado pujante y con grandes horizontes de crecimiento (Figura 4.2). En una segunda instancia se buscará alcanzar el mercado más maduro del país, concentrado en la región cuyana. Esta región, que comprende las provincias de Mendoza y San Juan, con 1.039 bodegas en funcionamiento concentra el 93 % de la producción de vino del país (INV 2019).

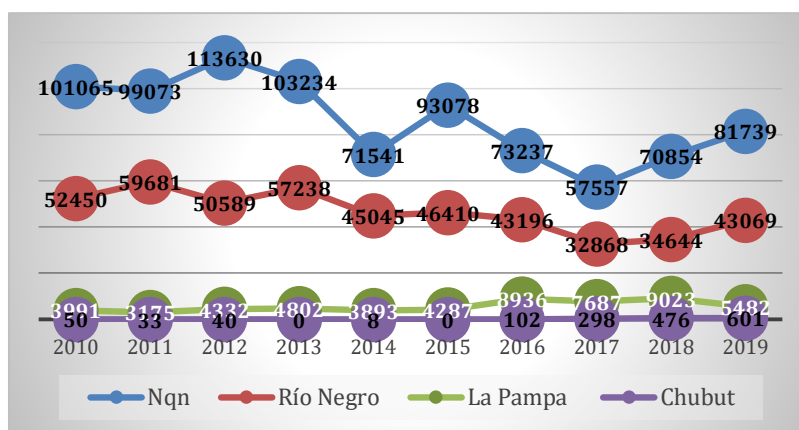


Figura 4.2: Producción regional de vinos (en hL). Evolución en los últimos 10 años (datos obtenidos de INV 2019).

4.1.4 MARCA

La Marca permitirá asociar al producto con su uso industrial y su procedencia. Se buscará posicionar la marca como referente en el segmento de producción de levaduras enológicas ofreciendo calidad y asistencia profesional, velocidad de respuesta y un prestigioso equipo de investigación y desarrollo local con reconocimiento a nivel nacional (Fundación ArgenINTA 2014) e internacional (OIV, 2014).

Este trabajo tiene como meta inicial producir levadura seca activa para la vitivinicultura, a partir de levaduras autóctonas seleccionadas por sus excelentes propiedades enológicas. Se buscará insertar en el mercado local y nacional un producto de gran valor agregado, capaz de diferenciar la calidad de los vinos tintos locales.

En la región es posible acceder a distintos tipos de levaduras comerciales, a través de páginas de internet (Mercado libre entre otras) y de dos proveedores locales, pero todas son importadas y la mayoría proviene de Europa.

4.1.5 ANÁLISIS FODA

Se realizó un análisis de FODA para estudiar la situación del proyecto, analizando las características internas (Debilidades y Fortalezas) y la situación externa (Amenazas y Oportunidades). Este análisis es una herramienta que permite conocer la situación real en la que se encuentra el proyecto y planear una estrategia a futuro. El objetivo es determinar las ventajas competitivas del proyecto bajo estudio y la estrategia genérica que más se adecue en función de las características propias y de las del mercado en que se mueve.

4.1.5.1 Identificación de factores internos positivos y negativos

Fortalezas, o factores internos positivos que permiten generar una ventaja competitiva sobre el resto de los competidores:

1. F1: Equipo técnico altamente calificado.
2. F2: Ubicación cercana al mercado proveedor de materia prima.
3. F3: Ubicación cercana al mercado de consumidores.
4. F4: Dirección estratégica clara.
5. F5: Bajo costo de la materia prima usada y producción diaria. Sin costos de logística.
6. F6: Ambientalmente sustentable (cepas autóctonas regionales, reconversión de desechos).

Debilidades, o problemas internos que, una vez identificados y desarrollando una adecuada estrategia, pueden y deben eliminarse/superarse:

1. D1: Falta de experiencia en la comercialización de insumos enológicos.
2. D2: Reducción de la producción por menor conversión de azúcar a LSA al cambio de escala.

4.1.5.2 Identificación de factores externos positivos y negativos

Oportunidades, o factores positivos que se generan en el entorno para ser aprovechados:

1. O1: Mercado regional y nacional sin competencia directa, solamente productos importados.
2. O2: Posibilidad de contar con materia prima todo el año que es desecho de otra cadena productiva local. Las otras fuentes de azúcar de precios razonables (melazas de caña o remolacha, hidrolizados de maíz/sorgo) son estacionales, algunos requieren costosos tratamientos previos y tienen costos elevados de logística (deben ser transportados desde grandes distancias, se deben almacenar en depósito y requieren un manejo especial del mismo).
3. O3: Posibilidad de diversificación de productos. LSA para otras bodegas que deseen usar sus propias levaduras y para otros fines (panificados, prebióticos, balanceados para peces, mamíferos y aves, control de plagas, descontaminación ambiental, entre otros).

4. O4: Posibilidad de obtener distintas líneas de financiación para PyMEs y empresas de base tecnológica.
5. O5: Mercado local y regional interesados en diferenciar sus productos y posibilidad de insertar el producto en otras regiones del país.
6. O6: Posibilidad de ofrecer el servicio de producción a otros centros de investigación y desarrollo del país relacionados con la microbiología enológica e interesados en la producción de desarrollos propios (INTA, Institutos/Centros/Grupos de Investigación de Universidades Nacionales y/o CONICET).

Amenazas, o factores externos negativos para el proyecto y que pueden atentar contra este:

1. A1: Aparición de nuevos competidores.
2. A2: Dependencia de materia prima.
3. A3: Ventajosa situación financiera de los actuales competidores (empresas multinacionales) para disputar comercialmente el nicho de mercado.

En la Tabla 4.1 se presenta la matriz FODA para el proyecto.

Tabla 4.1: Análisis FODA para el proceso productivo proyectado

		Amenazas			Oportunidades					
		A1	A2	A3	O1	O2	O3	O4	O5	O6
Debilidades	D1	⊙						⊙		
	D2	⊙			⊙		⊙		⊙	
Fortalezas	F1						⊙			
	F2		⊙			⊙				
	F3				⊙				⊙	
	F4			⊙						⊙
	F5								⊙	
	F6							⊙		

4.1.5.3 Estrategias

De tipo FO

F1-O3: Este proyecto cuenta con un grupo de profesionales expertos en Microbiología Industrial y Tecnología de los Alimentos capaces de desarrollar nuevos cultivos iniciadores y nuevos productos/insumos basados en levaduras.

F2-O2: El bagazo de manzana, es un sustrato muy ventajoso para *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia kudriavzevii*, su disponibilidad es diaria y no requiere de logística para transporte. La fuente tradicional de carbono y energía en la producción de levaduras es la melaza cuyo costo es 2,0 U\$S por kg de azúcar sin considerar transporte y costo de almacenamiento, comparado con el

bagazo de U\$S 0,47 por kg de azúcar o el jugo de manzana que sería U\$S 1,5 por kg de azúcar. Rendimientos de azúcar a LSA son similares en ambas fuentes de carbohidratos pero con menores tiempos de producción para el EBM.

F3-01: La planta se ubicará en una zona de gran interés en desarrollo vitivinícola. De esta manera, los costos logísticos se minimizarán y el precio de venta será competitivo frente a las alternativas importadas.

F3-05: Existe interés de los estados provinciales de la región por promover y desarrollar una vitivinicultura de calidad. Esta actividad productiva ha sido priorizada en los planes de desarrollo propuestos por los gobiernos de las provincias de Neuquén (Plan Quinquenal 2019-2013) y Río Negro (presentación de Agencia Río Negro Innova, febrero 2020, Bariloche) y considerada estratégica para la diversificación productiva de sus respectivas provincias.

F4-06: Existen Institutos/grupos de investigación del estado Nacional (INTA Luján de Cuyo, Universidad Nacional del Comahue, Universidad de Cuyo, Universidad de Tucumán etc.) que acreditan experiencia en la selección de levaduras enológicas pero carecen de la posibilidad de producirlas como LSA. La asociación de estos Institutos con empresas extranjeras para la producción de sus desarrollos fracasó porque los productos se discontinuaron. La asociación de estos centros a esta empresa nacional será beneficioso para ambos, permitiendo a los Institutos transferir sus tecnologías al sector productivo y obtener un retorno financiero para sus Instituciones y a la empresa afianzarse en el mercado nacional de insumos enológicos.

F6-04: Al ser una empresa tecnológica, que promueve el agregado de valor a productos regionales (vinos) a través de la diferenciación de la calidad, que ofrece un producto respetuoso del ecosistema microbiano del *terroir* habilitando a certificaciones de calidad y con un proceso productivo rentable y que utiliza subproductos de otra empresa regional, disminuyendo los pasivos ambientales, obtiene el interés de distintos entes/organismos estatales y/o privados para la financiación del proyecto, como de hecho ya lo han hecho el estado Nacional (Convenio UNComahue-MINAGRO N°69/2017 ANR de \$1.292.403) y los Provinciales de Neuquén (PFIP ESPRO 2016 Convenio 2018-29265198-APN-DDYGD#MCT Presupuesto Total: \$4.197.120, porcentaje subsidiado 65%, \$ 2.707.200) y Río Negro (ANR Provincia Río Negro. Decreto 149/10 del Poder Ejecutivo, \$2.000.000).

De tipo FA

F2-A2: La desventaja de depender de un único proveedor es revertida por la posibilidad de la empresa de proporcionarse su propia materia prima en el mediano plazo.

F4-A3: Se promoverán alianzas estratégicas con los institutos de investigación involucrados de manera de incorporar profesionales calificados para cargos de dirección mediante programas de co-financiación ofrecidos por organismos del estado (CONICET -Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, programas +Valor.Doc-FONTAR RRHH AC). Esta estrategia permitirá reducir sustantivamente los costos de personal, en particular durante los dos-tres primeros años de producción, mejorando la rentabilidad de la empresa y facilitando su afianzamiento en el mercado.

De tipo D0

D1-03: La empresa no posee trayectoria en la producción de LSA pero buscará posicionar la marca ofreciendo calidad diferencial en el insumo y asistencia profesional personalizada, para ello cuenta con profesionales expertos en Microbiología Industrial, Tecnología de los Alimentos y Fermentaciones Industriales.

D1-05: El mercado regional es el principal objetivo a corto plazo para afianzar la marca y luego apuntar a bodegas de la región Central. Mientras la competencia actual consiste en productos importados, la empresa ofrecerá un producto sustituto de igual o mejor calidad, habilitante para certificaciones de calidad, y como ya se señaló, con asesoramiento personalizado.

De tipo DA

D1-A1: Se trabajará para una inserción en mercado local a través de la asistencia personalizada a los productores regionales. Así, se fortalecerá la marca entre los productores vitivinícolas de la zona de manera de posicionar la empresa frente a competidores externos.

D2-A1: La experiencia obtenida a escala piloto (Capítulo 3) aporta información y experiencia para revertir eventuales desajuste provocados por el Scale up.

D1-A3: En primera instancia, se proyecta que las bodegas regionales tengan un descuento si anticipan compra de LSA que incluirá asesoramiento.

4.2 FACTIBILIDAD TÉCNICA

4.2.1 PRODUCTO A ELABORAR

4.2.1.1 Levadura enológica en la forma de LSA

Inicialmente las cepas de levaduras propuestas para producir LSA son *S. cerevisiae* F8 (*Sc* F8) y *P. kudriavzevii* 15 (*Pk* 15). Ambas cepas, aisladas de vinificaciones en tinto Patagónicas y caracterizadas como indígenas de la región (del Mónaco *et al.*, 2014 a y b, 2015 y 2016).

4.2.2 EL PROCESO PRODUCTIVO

4.2.2.1 Sustratos potenciales: bagazo de manzana, jugo de manzana y mosto

El EBM es el sustrato propuesto para la propagación de las células destinadas a la producción industrial de LSA. Este sustrato posee adecuadas características de calidad para ser utilizado en la producción de insumos destinados a la cadena alimentaria. Sin embargo, ensayos de laboratorio a menor escala mostraron que otras fuentes de carbono y energía como jugo de manzana de otras variedades, mosto e inclusive manzana licuada, resultan también buenos sustratos. En estos casos los ajustes en la concentración azúcar, macro y micronutrientes y condiciones operativas del cultivo para obtener una buena conversión de materia prima a LSA difieren ligeramente de las descritas en esta Tesis.

4.2.2.2 Recepción y pre-tratamiento del bagazo

Desde el área de recepción se transporta mecánicamente el bagazo a un tanque de 1.600 litros. Se suspenden 700 kg de bagazo en 1.000 L de agua filtrada para extraer los nutrientes, manteniendo la temperatura de extracción en 30 °C durante 20 min, los sólidos se retienen en un filtro prensa y la solución resultante de 4,3 °Bx, se bombea al fermentador. Se suplementa nutricionalmente, se agita durante 5 minutos y se esteriliza con vapor directo, presión 4 kg por cm² (250 kg de vapor por hora, temperatura 150 °C). El volumen final es de 1.250 litros y 3,6 °Bx por el agregado de condensado.

4.2.2.3 Fermentación

Las condiciones operativas del proceso más importantes a controlar son calidad del inóculo, temperatura, oxígeno disuelto (OD), pH, agitación, control de espuma (a escala piloto no se requiere pues no se genera espuma durante el proceso) y crecimiento. La cepa de levaduras procedentes de un cultivo de trabajo se propaga en un Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 120 mL de extracto de bagazo estéril por 12 horas. Este cultivo es transferido al biorreactor (BIOFLO) y propagado nuevamente hasta lograr una densidad adecuada (entre 8 a 12 horas). En este punto, 4 L de este cultivo se transfieren de manera estéril al fermentador que contiene el EBM estéril a la temperatura de producción.

El fermentador tiene un volumen de 1.585 L, siendo el volumen de trabajo 1.250 L, relación altura/diámetro de 1,8/1, caudal de aire 240 L min⁻¹ a 800 L min⁻¹. A su vez, cuenta con: Filtro de 4 micrones para esterilizar el aire; velocidad de agitación de 50 a 120 rpm; control de temperatura, e indicador de pH y oxígeno disuelto; equipado con sellos de vapor y sistemas de inoculación, recargas y antiespumante que aseguran transferencia estéril. Producirá por lote 20 kg de LSA cada

24 h. Se realizarán 4 lotes semanales obteniéndose una producción de 80 kg de LSA por semana o 4.000 kg por año.

4.2.2.4 Sistemas de separación, purificación, deshidratación y almacenamiento de la LSA

El cultivo pasa, directamente del fermentador a un filtro prensa, capacidad de filtración 40 kg húmedo cada dos horas, se lava, se descarga. Se agregan emulsionantes y anti *caking*, se amasa, (capacidad 20 kg húmedo cada 15 minutos) y se extruda (capacidad 20 kg húmedo cada 15 minutos). La amasadora y la extrusora constituyen un mismo equipo. El material extrusado se transfiere a la sala de secado, para ser procesado en un secadero de lecho fluidizado, con capacidad de deshidratar 20 kg de material húmedo cada 30 minutos con una humedad final menor al 8 %. Finalmente se envasa al vacío en paquetes conteniendo entre 0,5-1 kg. Basado en el tamaño de los equipos de recuperación de células, la capacidad de producción se puede aumentar en 10.000 kg por año mediante el agregado de un tanque de fermentación de 5.500 litros, con el cual se obtendría una producción total anual de 14.000 kg de LSA.

4.2.2.5 Disposición de los residuos

Desecho sólido. El remanente de bagazo obtenido por prensado en la etapa de producción del extracto de bagazo se revalorizará en la producción de bloques combustibles destinados a cocinas/calefacción familiar elaborados por una PyME local y/o elaboración de sustrato para la producción de hongos comestibles, desarrollo de una Cooperativa regional.

Efluente líquido. Los volúmenes producidos permiten su descarga al desagüe industrial.

En la Figura 4.3 se muestra el diagrama de producción de biomasa de levadura como quedaría instalado en la planta de producción, desde el bagazo hasta la obtención de la levadura seca activa.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la capacidad de producción industrial de levadura alcanzaría los 20 kg LSA por lote. En el cálculo de la planta de levadura se consideró un crecimiento conservador de las ventas. Se proyecta trabajar con un fermentador de 1.585 litros de capacidad, durante 5 días por semana y 24 h por día, obteniéndose anualmente 4.000 kg de LSA. La capacidad de los equipos de filtrado, amasado-extrusado, secado y envasado tienen capacidad de cuadruplicar la producción a 14.000 kg de LSA por año, solo se deberá agregar un fermentador de 5.500 litros y dos operarios.

El rendimiento y la calidad de la levadura seca activa dependen significativamente de las condiciones de propagación. Durante esta etapa y según las condiciones operativas del proceso las células enfrentan diferentes tipos de estrés acumulando metabolitos de reserva (glucógeno) y protección (trehalosa) que mejoran su capacidad de sobrevivir a la deshidratación (Garre, 2008).

La levadura seca activa, deshidratada en lecho fluidizado a bajas temperaturas con un porcentaje de humedad menor del 8 %, tiene una vida media de 2 años. Este producto tiene un costo de producción mayor en comparación a la levadura líquida y prensada pero debido a su elevada estabilidad en el tiempo lo hace imprescindible para abastecer a las industrias vitivinícolas en época de vendimia disminuyendo adicionalmente los riesgos de contaminación. Es importante resaltar que la producción de vino es estacional y la levadura se utiliza solamente en la etapa de fermentación alcohólica, por lo tanto, para abastecer la demanda regional y nacional de levaduras en época de vendimia, es necesario producirla anualmente y almacenarla. Mientras la pérdida de viabilidad es de aproximadamente entre un 10 % y 25 % por año a 20 °C, la LSA se debe almacenar a 4 °C en una atmósfera inerte o vacío.

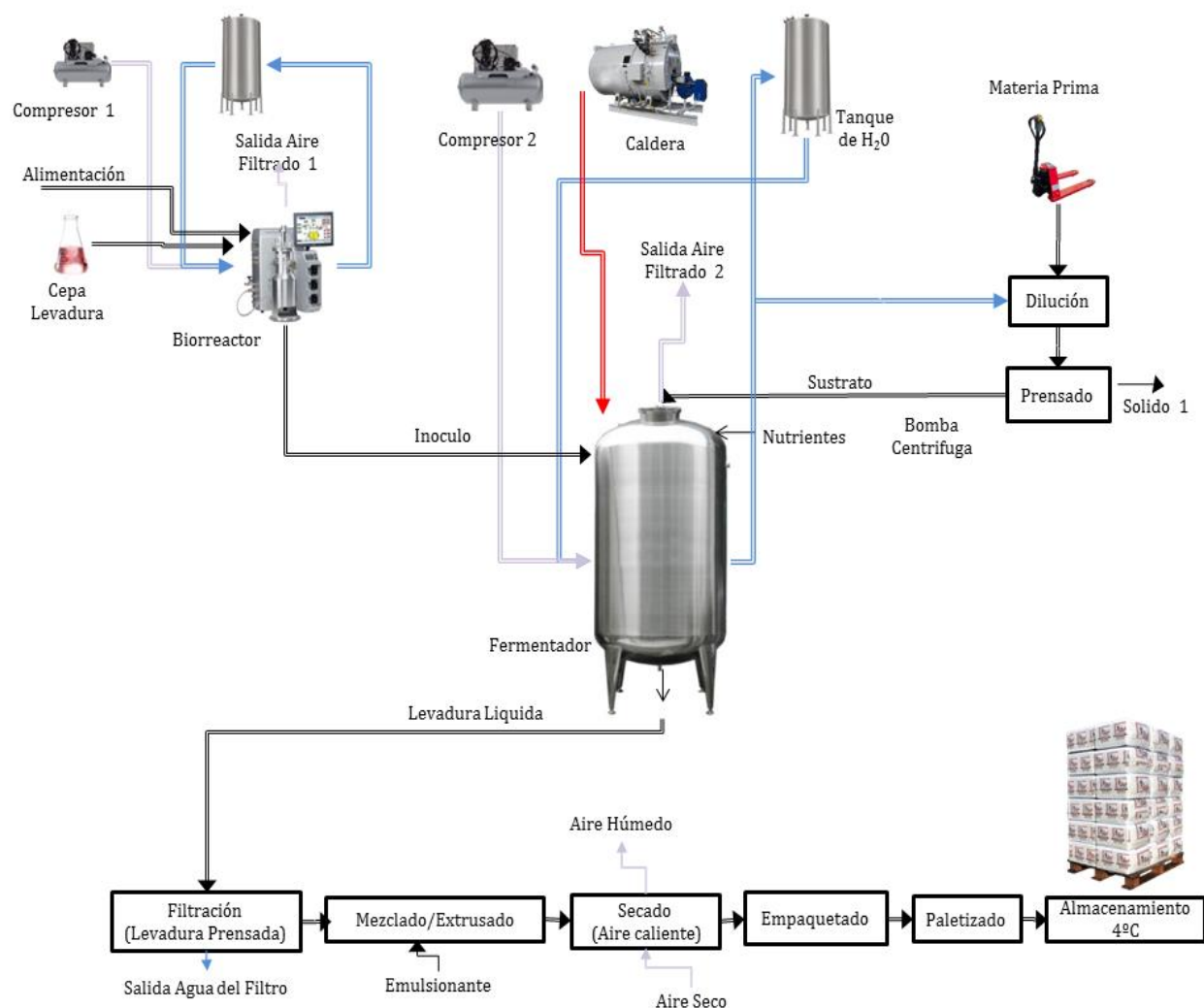


Figura 4.3: Esquema del proceso industrial de obtención de levadura seca activa. Fuente propia.

4.3 FACTIBILIDAD ECONÓMICA

4.3.1 ANÁLISIS DE COSTOS

4.3.1.1 Costos operativos del proyecto

En el análisis de costos operativos, se han evaluado todos los egresos producidos por el proyecto teniendo en cuenta la cantidad de producto elaborado (Tabla 4.2).

Tabla 4.2: Clasificación de costos en la producción de levadura seca activa

Tipo	Fijo	Variable
Mano de obra	●	
Materia prima		●
Insumos		●
Amortizaciones	●	
Otros costos	●	
Energía eléctrica		●
Gas		●

4.3.1.1.1 COSTOS FIJOS

Los costos fijos son aquellos que no sufren variaciones si hay cambios en los niveles de producción, es decir, que permanecen invariables ante cambios en la cantidad a producir.

4.3.1.1.1.1 Costos de mano de obra

En la Tabla 4.3, se consideran los salarios como un costo fijo ya que la totalidad del personal será permanente, y por más que varíe el nivel de producción se deberá incurrir en el mismo gasto. (Amoros y Noguerol, 2014). El rubro otros costos descrito en la Tabla 4.2, correspondientes a los erogados para la dirección, administración y logística de la empresa y considerados fijos porque no dependen de la cantidad a producir, se incluyen en la Tabla 4.7.

Tabla 4.3: Costos Personal

Personal		Costo mensual en U\$S	Costo anual en U\$S
Operario	+ cargas sociales	1.069	13.900
Técnico de laboratorio	+ cargas sociales	1.200	15.600
Supervisor	+ cargas sociales	1.600	20.800

Para anualizar el sueldo se toma, 13 meses por 1.6 (cargas sociales e impuestos). Dólar a \$ 68.

4.3.1.1.1.2 Costos por amortizaciones

En la Tabla 4.4, se pueden apreciar las amortizaciones vinculadas con el proyecto en estudio.

Las amortizaciones o costos capitales han sido calculadas teniendo en cuenta los costos de inversión. Para el costo capital anual de los equipos se supone que representa el 10 % de su valor de adquisición y 3,33 % para edificios.

Tabla 4.4: Costo de equipos implicados en la producción de LSA en U\$S

	Cantidad	Costo (U\$S)	Amortización 10 % Anual	Estado
Recipiente Trasferencia	1	500	50	Adquirido
Zorra eléctrica	1	5.000	500	Comprar
Bomba centrífuga	1	1.000	100	Comprar
Filtro prensa	1	10.000	1.000	Adquirido
Fermentador 1.585 L	1	16.000	1.600	Adquirido
Electrodo pH	1	1.400	140	Adquirido
Electrodo O ₂	1	2.400	240	Adquirido
Mangueras y acoples	1	4.000	400	Comprar
Tanque filtrado	1	5.000	500	Comprar
Compresor	1	6.000	600	Comprar
Caldera	1	20.000	2.000	Comprar
Amasadora -Extrusora	1	8.000	800	Adquirido
Lecho fluidizado	1	30.000	3.000	Adquirido
Envasadora LSA	1	6.000	600	Comprar
Cámara frío	1	9.000	900	Comprar
Tableros eléctricos	2	5.000	500	Comprar
Edificio 10x8 m ² , se amortiza a 30 años	1	14.700	490	A construir
Total costo equipos e infraestructura		144.000	13.420	
Total adquirido		68.300		
Capital faltante		75.700		

*Crédito para Capital de trabajo U\$S 75.000,00 tomado en pesos argentinos. Se supone una tasa del 20 % anual por lo tanto el interés del primer año es de U\$S 15.000. Dólar a \$ 68.

4.3.1.1.2 COSTOS VARIABLES

Un costo variable es aquel que se modifica de acuerdo con variaciones en el volumen de producción, se trata tanto de bienes como de servicios (Tabla 4.5 y 4.6). Para el presente proyecto la estructura de costos variables contemplará insumos, materia prima, servicios, entre otros. La cantidad necesaria de cada uno de ellos se ha calculado de acuerdo con el volumen de producción propuesto en el proyecto. Los costos correspondientes al rubro Insumos, descrito como costo variable en la Tabla 4.2, se muestran en la Tabla 4.7 e incluyen mayoritariamente envases, insumos (Químicos y Microbiológicos) y materiales de limpieza.

4.3.1.1.2.1 Materia prima, insumos y servicios

La materia prima utilizada para la elaboración de LSA es bagazo de manzana, actualmente tiene costo mínimo. También se debe tener en cuenta los macros, micronutrientes y los estabilizantes requeridos para la obtención del bien.

Tabla 4.5: Costos en materias primas

Materia prima	Costo en U\$S	Cantidad de lotes por semana	Cantidad de semanas por año	Costo anual en U\$S
Bagazo	0,03 U\$S kg	1	50	1.050
Nutrientes		1	50	500

Tabla 4.6: Costos en energía

Energía consumida por lote	Costo*	Costo por lote de producción	Cantidad de lotes por semana	Cantidad de semanas por año	Costo anual
BTU más Kwh	0,1 U\$S	85 U\$S	1	50	4.250 U\$S

Fuentes. EDERSA y Camuzzi: Distribuidores de Energía Eléctrica y gas en todo el territorio de la Provincia de Río Negro.

4.3.2 PRECIO DE VENTA

Para la determinación del precio de venta, se realizó un estudio de mercado teniendo en cuenta los precios de los competidores, es decir, el precio de la LSA comercial importada, el cual varía entre 62 y 80 dólares el kilo (www.MercadoLibre.com.ar, Pérez hermanos S.A, General Roca, etc.). Para el proyecto se tomó como precio de venta U\$S 80 kg y se establece como política de venta, ventas anticipadas un precio de U\$S 62 kg (se prevé un 30 % de ventas anticipadas) y durante la añada de U\$S 80 kg. Para el cálculo financiero se utiliza un valor de U\$S 75 el kg de LSA, suponiendo una buena venta anticipada.

El costo anual por kg de LSA varía en función de la cantidad producida. Basado en los equipos adquiridos y el desarrollo de ventas de un producto novedoso que proporciona características organolépticas diferenciales a la producción vitivinícola, las bodegas deberán desarrollar y promover el consumo de estos vinos. El uso de las levaduras autóctonas estará unido al éxito de los vinos con estos cultivos iniciadores.

En la Tabla 4.7 se muestran los costos estimados para la planta de levadura seca activa en 10 años de producción. En el primer año, se proyecta realizar dos lotes por semana y contratar dos operarios, un técnico y un supervisor. El consumo de bagazo se estima en 700 kg por lote, o sea para el primer año 70.000 kg de bagazo. El segundo año, se proyecta realizar tres lotes por semana y

contratar un operario más, resultando en total tres operarios, un técnico y un supervisor. El bagazo utilizado será de 105.000 kg. El tercer año, se proyecta realizar cuatro lotes de 1.250 litros por semana, se utilizarán 140.000 kg de bagazo anuales, el personal estará compuesto por cuatro operarios, un técnico y un supervisor. Así los próximos 7 años. Se aumentará la capacidad de producción cuando la demanda supere la capacidad instalada.

Tabla 4.7: Costos estimados de la planta de levadura seca activa en 10 años de producción

		Años			
		1	2	3	4 en adelante
1	Facturación U\$S	150.000	225.000	300.000	300.000
2	S. Operarios U\$S	-27.800	-41.700	-55.600	-55.600
3	S. Técnico U\$S	-15.600	-15.600	-15.600	-15.600
4	S. Supervisor U\$S	-20.800	-20.800	-20.800	-20.800
	Personal directo	4	5	6	6
5	Bagazo U\$S	-2.100	-3.150	-4.200	-4.200
6	Otras M.P. U\$S	-1.000	-1.500	-2.000	-2.000
7	Insumos U\$S	-5.000	-7.500	-10.000	-10.000
8	Energía U\$S	-8.500	-12.750	-17.000	-17.000
9	Otros costos U\$S	-35.000	-35.000	-35.000	-35.000
10	Amortización U\$S	-13.420	-13.420	-13.420	-13.420
11	Interés U\$S	-15.000	-7.500	0	0
12	Patente U\$S	-50	0	0	0
13	Lotes por semana	2	3	4	4
14	Kg LSA por año	2.000	3.000	4.000	4.000
15	G.N.B año/Imp U\$S	5.730	66.080	126.380	126.380

1. Facturación (Ingresos anuales); 2. Sueldo anual operarios; 3. Sueldo anual técnico; 4. Sueldo anual supervisor; 5. Costo anual bagazo de manzana; 6. Otras materias primas (nutrientes); 7. Insumos (envases, insumos químicos y microbiológicos para el control de calidad, materiales para la limpieza) 8. Costo anual energía; 9. Otros costos fijos (administración, ventas, control de calidad, producción de inóculos, asesoramiento técnico), 10. Amortización de equipos a 10 años; 11. Intereses (para financiar sueldos y materias primas hasta cobro de primeras ventas); 12. Costo patente; 13. Lotes por semana; 14. Producción anual de LSA; 15. Ganancia Neta con Bagazo.

4.4 ANÁLISIS FINANCIERO

4.4.1 CRITERIOS DE EVALUACIÓN VALOR ACTUAL NETO (VAN) Y TASA INTERNA DE RETORNO (TIR)

Con los flujos obtenidos y con la **Tasa Mínima de Rendimiento Aceptable (TMRA)**, se puede calcular el **Valor Actual Neto (VAN)** y **Tasa Interna de Retorno (TIR)**, ecuación (4.1), donde P es igual a la inversión inicial del proyecto; i es la TMRA o costo del capital; n , el horizonte del proyecto, y f_{NE} los flujos netos de efectivo.

$$VAN = -P + \frac{f_{NE1}}{(1+i)} + \frac{f_{NE2}}{(1+i)^2} + \frac{f_{NE3}}{(1+i)^3} + \frac{f_{NE4}}{(1+i)^4} \dots + \frac{f_{NE n}}{(1+i)^n} \quad \text{Ec (4.1)}$$

Utilizando este criterio de evaluación puede verse que cuando el VAN es igual a cero, el proyecto tiene la misma rentabilidad que si se colocara ese dinero en el banco durante el mismo periodo de tiempo a la tasa de descuento utilizada. Si el resultado fuese positivo, indica que el proyecto proporciona una cantidad de remanente sobre lo exigido, y si el resultado es negativo, esto se interpreta como la cantidad que falta para que el proyecto sea rentable. La TIR, ecuación (4.2) donde i representa la TIR, es la tasa de descuento a la cual el VAN del proyecto se hace cero. El método de la evaluación de la TIR, es utilizado para evaluar proyectos así como también la evaluación del VAN.

$$P = \frac{f_{NE1}}{(1+i)} + \frac{f_{NE2}}{(1+i)^2} + \frac{f_{NE3}}{(1+i)^3} + \frac{f_{NE4}}{(1+i)^4} \dots + \frac{f_{NE n}}{(1+i)^n} \quad \text{Ec (4.2)}$$

En la determinación del VAN del proyecto (Tabla 4.8), los flujos netos de efectivo son por anualidades, los egresos están representados por las estimaciones de los costos totales por año (U\$S 144.270), éstos aumentan cada año dependiendo de la producción. El estimado de la producción de levadura en el mismo lapso (2.000 kg LSA por año) constituye los ingresos de la planta, precio comercial U\$S 75 kg de LSA. El horizonte del proyecto es de 10 años. Si la TMRA es del 20 %, el VAN es igual a U\$S 243.427,96 utilizando bagazo como sustrato. Como se desprende de la Tabla 4.8 también se estimó el VAN utilizando jugo de manzana como sustrato alternativo al bagazo para la propagación de la biomasa, el que resultó de U\$S 209.927,55 considerando un valor de 0,15 U\$S por kilo de jugo y un consumo de 45.000 kg, 67.500 kg y 90.000 kg para el primero, segundo y tercer año de producción, respectivamente. En ambos casos, el VAN es positivo, y se traduce en que la inversión se recuperaría a la TMRA correspondiente, por lo tanto, el proyecto se califica como económicamente viable. El jugo de manzana se presenta como una opción en caso de no disponer de bagazo por decisión de la empresa generadora de darle otra disposición o uso.

La TIR es igual a 50 % para bagazo y 46 % para jugo, valores que también suponen que el proyecto es viable, dado que es una cifra superior a las TMRA. El cálculo de la relación costo-beneficio (RCB), ecuación (4.3) se realizó con una TMRA del 20 %. La RCB correspondiente para bagazo es mayor a uno (2,7) (Tabla 4.8), lo cual significa que el proyecto resulta factible desde el punto de vista económico.

$$RCB = \frac{\frac{f_{NE1}}{(1+i)} + \frac{f_{NE2}}{(1+i)^2} + \frac{f_{NE3}}{(1+i)^3} + \frac{f_{NE4}}{(1+i)^4} + \dots + \frac{f_{NE_n}}{(1+i)^n}}{P} \quad \text{Ec (4.3)}$$

Tabla 4.8: Análisis financiero para la producción de levadura seca activa a escala industrial

	Bagazo	Jugo
Materia prima		
Inversión inicial (U\$S)	144.000,00	144.000,00
Precio comercial por kg de levadura (U\$S)	75	75
Ingreso primer año (U\$S)	150.000	150.000
Egreso primer año (U\$S)	-144.270	-148.920
Horizonte (Años)	10	10
Valor Actual Neto (VAN, U\$S)	243.427,96	209.927,55
Tasa Mínima de Rendimiento Aceptable (TMRA, %)	20	20
Tasa Interna de Retorno (TIR, %)	50	46
Relación Costo-Beneficio	2,7	2,5
Años para recuperar la inversión	1	1

4.5 ANÁLISIS DE RIESGOS

4.5.1 IDENTIFICACIÓN DE RIESGOS Y PLANES DE CONTINGENCIA

El riesgo de un proyecto se define como la variabilidad de los flujos reales respecto de los estimados. Mientras más grande sea esta variabilidad, mayor es el riesgo del proyecto. Los riesgos identificados como más significativos de este proyecto son la aceptación del producto, la disminución del rendimiento esperado, el tipo de cambio y la disminución de la demanda.

La aceptación del producto por parte de los elaboradores de vinos es de gran importancia por su alto impacto en la variabilidad de los flujos reales en los primeros años de la empresa, y que son los que resultan decisivos para el afianzamiento de ésta (Tabla 4.7). Las causas más importantes de este riesgo son la naturaleza conservadora del sector productivo y las características de la competencia, empresas multinacionales con experiencia en el mercado. Mientras los productos ofrecidos por estas empresas están desarrollados con cepas de levaduras de otras regiones vitivinícolas del mundo y la demanda actual del mercado es por levaduras autóctonas capaces de otorgar a los vinos características diferenciales de su *terroir*, el plan de contingencia que minimice este riesgo radicarán en elaborar un producto de calidad certificada (estrictos controles de calidad), en implementar una política de ventas ya descrita que prevé algunos beneficios y en una agresiva estrategia de *marketing* facilitada por la cercanía de la empresa con los clientes. Para ello se realizará un asesoramiento profesional personalizado a los bodegueros regionales resaltando las

bondades del producto y una activa difusión de las ventajas comparativas de su uso en foros, congresos y otro tipo de eventos (Ruta del Vino, Fiestas Regionales de la Vendimia, Manzana, Pera, entre otras, Neuquén Innova, Bariloche a la Carta, etc.) convocantes del sector productivo, solicitando el acompañamiento de organismos estatales y privados relacionados con el sector vitivinícola y productivo en general (INTA, INV, Ministerios de Producción nacional y provinciales, Cámaras de Productores, Cámara de Exportadores de Vinos de la Patagonia, CREAM, Centro PyME ADENEU, entre otros) en la promoción del producto y de los vinos elaborados con él y consecuentemente promocionar/promover la compra de productos nacionales y la sustitución de insumos importados.

El análisis de factibilidad económica financiera de este proyecto se realizó sobre la base de los rendimientos obtenidos en los cultivos *batch* a escala piloto que forman parte del Capítulo 3 de esta Tesis. Existe evidencia que el escalado (cambios de escala de un proceso) es un paso crítico en los desarrollos productivos motivo por el cual el riesgo de una disminución del rendimiento por el cambio de escala debe ser tenido en cuenta con una probabilidad de ocurrencia media a baja, pero de importancia alta ya que de ocurrir afecta el corazón de la empresa que es la producción y en consecuencia su rentabilidad. El plan de contingencia ante esta eventualidad consistirá en una reducción del tiempo de duración del cultivo por lote, mediada o no por una redefinición de las condiciones de operación que garanticen un contenido celular de trehalosa óptimo para enfrentar el estrés a la deshidratación y asegurar la viabilidad y vitalidad de las células.

Otro riesgo de importancia en el contexto histórico de la República Argentina es el tipo de cambio. La moneda nacional presenta dos tipos de cambio en relación con el dólar y el euro, uno de referencia establecido para las importaciones, y otro establecido para exportar, que tiene en cuenta el de referencia y las retenciones. Si el tipo de cambio se ajusta por inflación, se mantendrá el equilibrio relativo de precios entre importaciones y exportaciones no existiendo riesgo. Por el contrario, la devaluación de la moneda impulsa una serie de ventajas en la económica nacional, es decir, coloca al país en un lugar económicamente más competitivo favoreciendo el consumo de los productos nacionales y la exportación de éstos. El riesgo existirá cuando se mantenga un tipo de cambio fijo. En el contexto de pensar un país productivo y exportador la probabilidad de este tipo de riesgo sería bajo, pero como existen antecedentes en Argentina de gestiones de gobierno que han establecido este tipo de políticas cambiarias, le otorgamos al mismo una probabilidad de ocurrencia media.

El plan de contingencia para el mismo debido a su alto impacto negativo para la industria nacional, es la reducción de costos de producción generalmente asociada a la reducción de personal.

Como plan de contingencia se buscará cofinanciar los sueldos del personal calificado mediante la participación en programas del estado nacional destinados a insertar personal del sistema científico a las empresas, reduciéndose de manera significativa los costos de personal. Otro plan de contingencia alternativo dado por la diversidad de aplicaciones de las levaduras es diversificar la producción.

Finalmente, la probabilidad de una disminución de la demanda puede originarse por cambios en las tendencias del mercado, *dumping* de la competencia y contingencias climáticas (heladas tardías, granizo, otras inclemencias que afecten la viticultura y en consecuencia la producción vitivinícola, actividad de los clientes de la empresa). En los casos de *dumping* de la competencia el plan de contingencia inmediato es la disminución del precio del producto para poder competir en el mercado. El plan de contingencia para las otras causas, y para poder enfrentar el *dumping* también, radica en promover políticas de investigación y desarrollo vanguardistas que permitan la diversificación y el crecimiento sustantivo de la empresa, factible de llevarse a cabo por el perfil innovador que se propone para la empresa.

4.5.2 ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD

En esta etapa se realiza un análisis de sensibilidad con la finalidad de apreciar las variaciones de la rentabilidad del proyecto, como consecuencia de la modificación de las variables de mayor riesgo detectadas. Los cambios que se producen en el comportamiento de las variables del entorno harán que sea la rentabilidad calculada la que efectivamente tenga el proyecto implementado, o al menos conocer un rango de probabilidades de su ocurrencia. Por ello, la decisión sobre la aceptación o rechazo de un proyecto debe basarse más, en la comprensión del origen de la rentabilidad de la inversión y del impacto de la no ocurrencia de algún parámetro considerado en el cálculo del resultado, que en el VAN positivo o negativo. Teniendo en cuenta los riesgos analizados anteriormente se realiza un análisis de sensibilidad para variación en el precio de venta (Tabla 4.9) y rendimiento (Tabla 4.10), esto es hasta qué precio se puede vender el producto, para que el proyecto no arroje saldo negativo, lo mismo con el rendimiento. Como surge de la tabla 4.9, el precio de venta puede disminuir hasta un 20 %. Este es el plan de contingencia frente al riesgo de que disminuya la demanda o para utilizar precios de ventas más bajos y ser más competitivos. Con respecto al rendimiento se puede bajar hasta 16 kg por lote, valor a partir del cual el VAN es negativo.

Tabla 4.9: Análisis de variación del precio de venta de la levadura seca activa

%	Precio	VAN Bagazo	VAN Jugo
0 %	75	243.427,96	209.927,55
10 %	67,5	135.362,13	101.861,72
20 %	60	27.296,297	- 6.204,11
25 %	56,25	- 26.736,62	- 60.237,02
30 %	52,5	- 80.769,53	- 114.269,9

Tabla 4.10: Análisis de variación del rendimiento en la producción de levadura seca activa

Rendimiento	VAN Bagazo	VAN Jugo
20	243.427,96	209.927,55
18	135.362,13	101.861,72
16	27.296,30	-6.204,11
15	-26.736,62	-60.237,02
14	-80.769,53	-114.269,94

4.6 BIBLIOGRAFÍA

- Amoros, G.A. y Noguerol, M.E. (2014). Producción de yogur helado. Estudio de Pre-Factibilidad. Tesis Ingeniería en industrias de la alimentación. Universidad Nacional de Cuyo. Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria.
- del Mónaco, S.M., Barda, N.B., Rubio, N.C. and Caballero, A.C. (2014a). Selection and characterization of a Patagonian *Pichia kudriavzevii* for wine deacidificación. *Journal of Applied Microbiology*. 117:451-464.
- del Mónaco, S.M., Bravo, S.M.E., Curilén, Y.L., Carreño, V.A. and Caballero, A.C. (2014b). A regional starter for high quality wines: an Argentinean Patagonia experience. *Bulletin de l'OIV*. 87 (998-999-1000): 217-224. ISSN 0029-7127.
- del Mónaco, S.M., Rodríguez, M.E. and López, C.A. (2015). *Pichia kudriavzevii* as a representative yeast of North Patagonian winemaking terroir. *International Journal of Food Microbiology*. 230:31-39.
- del Mónaco, S.M., Curilén, Y., Maturano, R.C., Bravo, S.M.E., Simes, A.B. and Caballero, A.C. (2016). The use of indigenous yeasts to develop high-quality Patagonian wines. En: *Morata A and Loira I Eds. Grape and Wine Biotechnology*. 325-344.
- Garre, E. (2008). Caracterización y mejora de la resistencia de las levaduras vínicas a la deshidratación en la producción de levadura seca activa. Tesis Doctoral. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Valencia y en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. 122-142.
- Fundación ArgenINTA. (2014). Premio Fundación ArgenINTA a la Calidad Agroalimentaria XI Edición 2014. Primer Premio Categoría 1: Investigación y Desarrollo en el Área de Tecnología de Alimentos. Proyecto: "Levaduras y Bacterias del Ácido Láctico para la Diferenciación de Vinos Patagónicos". Autores: Adriana Catalina Caballero*, Liliana Carmen Semorile, Silvana

María del Mónaco*, Emma Elizabeth Tymczyszyn, Lucrecia Del federico, Yolanda Leticia Curilén*, Danay Valdés La Hens, Bárbara Mercedes Bravo-Ferrada y Adriana Beatriz Simes*.

*FACTA-PROBIEN Universidad Nacional del Comahue-CONICET.

INV. (2018). Informe Vitivinícola de la Región Sur de la Argentina (Provincias Río Negro, Neuquén, La Pampa y Chubut) Departamento de Estadística y Estudios de Mercado Subgerencia de Estadística y Asuntos Técnicos Internacionales. Mendoza, Argentina. Junio 2018.

INV. (2019). Informe Anual de Cosecha y Elaboración 2019 (base de datos congelada al 1/9/19). Subgerencia de Estadísticas y Asuntos Técnicos Internacionales. Mendoza, Argentina. Noviembre 2019.

INV. (2020). <https://www.argentina.gob.ar/inv/vinos> Registro de Inscriptos.

OIV. (2014). A regional starter for high quality wines: an Argentinean Patagonia experience. Del Mónaco S.M., Bravo S., Curilén Y., Carreño V., Adriana Caballero. Publicado en el Número especial de *Le Bulletin de l'OIV* editado en el marco del 37º Congreso Mundial de la Viña y el Vino, Mendoza, Argentina Noviembre de 2014, conteniendo los catorce trabajos más representativos de los avances científico-tecnológicos realizados en Argentina en la última década en el área de Viticultura y Enología.

Conclusiones

La Patagonia norte es la región vitivinícola más austral de la Argentina y su producción está orientada a la elaboración de vinos tintos jóvenes y secos. La calidad sensorial de este tipo de vinos, está significativamente influenciada por la calidad de la biota de levaduras asociada a la fermentación alcohólica. Con el fin de asegurar el éxito de ésta, los productores inoculan los mostos con cultivos iniciadores comerciales constituidos por cepas/individuos de levaduras, *S. cerevisiae* en particular, procedentes de otras regiones vitivinícolas. El problema asociado a esta práctica que enfrentan los productores locales es la pérdida de la tipicidad regional de los vinos ocasionada por el reemplazo de la biota autóctona de levaduras por la foránea. Con el fin de brindar una solución a este problema y ante la inexistencia en el mercado de cultivos iniciadores regionales, en esta Tesis se propuso como objetivo general desarrollar cultivos iniciadores de la fermentación alcohólica a partir de cepas de levaduras autóctonas de la región del Comahue utilizando en la propagación de sus biomásas celulares otro subproducto de la industria regional como es el bagazo de manzana.

Actualmente, la producción de levaduras vnicas se realiza de manera similar a la de panadería. El proceso utiliza melazas de caña de azúcar o de remolacha azucarera enriquecidas o mezcla de ambas como sustrato para la propagación de las células y cultivos por lote alimentado. Este sistema de cultivo tiene como objetivo evitar mediante un suministro controlado de la fuente carbonada, el efecto Crabtree, que en concentraciones elevadas de glucosa genera en *S. cerevisiae* una significativa disminución del rendimiento de sustrato en biomasa.

El trabajo experimental realizado en el marco de esta Tesis Doctoral permitió alcanzar sobradamente los objetivos específicos inicialmente planteados, quedando demostrada la excelente capacidad del extracto de bagazo de manzana 3,6 °Bx suplementado con 1,2 g L⁻¹ de nitrógeno asimilable en la forma de (NH₄)₂SO₄ para propagar la biomasa de levaduras en procesos por lote operados a 30 °C, en particular para la levadura vnica *S. cerevisiae*. En este sentido, se concluye que el cambio de melaza de caña o remolacha por extracto de bagazo de manzana permite optimizar el rendimiento de sustrato en biomasa mediante un manejo adecuado de la temperatura y del suministro de la fuente nitrogenada, independizándose del manejo de la fuente carbonada y permitiendo procesos de producción en cultivo por lote. Este cambio innovador en el proceso de propagación, que permite obtener rendimientos similares o superiores a los obtenidos con el proceso tradicional, tiene al menos dos aspectos ventajosos adicionales desde el punto de vista industrial: permite acortar significativamente los tiempos de producción y rinde una biomasa con mejores condiciones para su procesado posterior, mínima cantidad de fuente carbonada presente en el caldo que la contiene que minimiza el número de lavados previos al extrusado y alto contenido endógeno de trehalosa que mejora su capacidad para enfrentar el estrés del proceso de

deshidratado. Para la especie *P. kudriavzevii* este es el primer reporte bibliográfico sobre la capacidad de sintetizar este disacárido como respuesta a situaciones de estrés.

Por otra parte, la capacidad demostrada por la biomasa de las levaduras propagadas de iniciar rápidamente la fermentación y de implantándose satisfactoriamente conduciendo el proceso hasta el completo secado del mosto tanto cuando se inoculan en la forma de cultivos puro como mixto y la calidad del vino obtenido en el primer caso, permiten concluir que el proceso de propagación propuesto conserva en las cepas autóctonas *S. cerevisiae* F8 y *P. kudriavzevii* 15 las propiedades tecnológicas y enológicas por las que fueron seleccionadas.

Adicionalmente en este Trabajo de Tesis también queda demostrado que:

- La aceptable calidad microbiológica del bagazo de manzana Red Delicious generado en la producción de jugos exprimidos y la baja variabilidad en su composición química observada entre los lotes, permiten obtener un grado aceptable de homogeneidad en el contenido de macro y micro nutrientes de los extractos asegurando repetibilidad en los resultados del proceso de propagación sin compromiso de los aspectos sanitarios.
- El uso de diseños experimentales factoriales para la identificación (Plackett-Burman) y cuantificación (Compuesto Central) de los constituyentes del medio de cultivo que afectan el crecimiento microbiano permite formular, con una mínima inversión de recursos y tiempo, un medio complejo ajustado a las necesidades de las levaduras, particularmente en lo referente a la fuente carbonada y micronutrientes.

Finalmente, el valor positivo del VAN y la TIR del 50 % obtenidos en el análisis económico financiero del proyecto de la planta productora de LSA que se propone indican la factibilidad de desarrollar una empresa rentable.

El desarrollo de esta biotecnología local y su implementación por el sector productivo regional permite el agregado de valor a los vinos Patagónicos, asegurando una calidad controlada y diferencial, en línea con los estándares establecidos para las certificaciones de calidad y con las exigencias del mercado actual de los alimentos. Por su bajo costo de implementación esta tecnología puede ser rápidamente adoptada tanto por grandes como medianos y pequeños productores, como los que mayoritariamente se encuentran en la región, esperándose en consecuencia, un significativo incremento en la rentabilidad de todo el sector productivo regional, aportando a la diversificación productiva de la Patagonia norte con sustentabilidad ambiental y promoviendo la sustitución de insumos importados.

Perspectivas

En función de lo realizado en el marco de esta Tesis en un futuro cercano se espera:

1. Escalar y optimizar el proceso de producción de células de levaduras de *Saccharomyces*.
2. Optimizar y escalar el proceso de producción de células de levaduras de non-*Saccharomyces*.
3. Producir a escala industrial y transferir al sector productivo regional levaduras autóctonas de la Patagonia destinadas a la elaboración de vinos de calidad controlada y diferencial.
4. Optimizar a escala de laboratorio las condiciones para el extrusado y secado de las biomasas de las levaduras autóctonas propagadas en bagazo de manzana y realizar el escalado industrial.
5. Caracterizar comparativamente a escala real el comportamiento de la biomasa deshidratada respecto de la biomasa húmeda con el objetivo de validar en el cultivo iniciador sus calidades tecnológicas y enológicas.