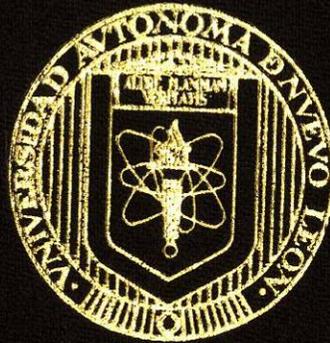


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE AGRONOMIA



AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE *Saccharomyces* sp.
DE JUGO DE FRUTAS Y SU UTILIZACION EN LA
ELABORACION DE VINO DE FRESA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTICIAS

PRESENTA
RAUL BAUTISTA SOBREVILLA

MARIN, N. L.

FEBRERO DE 1997

2310

T
QR151
B38
C



1080087078

14653
02/21

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA



AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE *Saccharomyces sp.*
DE JUGO DE FRUTAS Y SU UTILIZACION EN LA
ELABORACION DE VINO DE FRESA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

PRESENTA

RAUL BAUTISTA SOBREVILLA

MARIN, N. L.

FEBRERO DE 1997

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE Saccharomyces sp
DE JUGO DE FRUTAS Y SU UTILIZACION EN LA
ELABORACION DE VINO DE FRESA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTICIAS

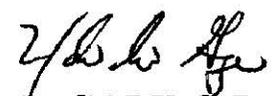
PRESENTA

RAUL BAUTISTA SOBREVILLA

COMISION REVISORA

~~Ph.D. RIGOBERTO GONZALEZ GONZALEZ~~

~~ING. CARLOS C. RODRIGEZ A.~~


ING. MARGARITO DE LA GARZA



DEDICATORIA

Con todo cariño dedico esta tesis a mi mamá y a mi hermano:

Sra. Leonor Sobrevilla de Bautista Sr. Rafael Bautista Sobrevilla

Que con esfuerzo y sacrificio hicieron posible la culminación de mi carrera profesional que es la más valiosa herencia, hoy como una humilde muestra de gratitud y del gran amor que les tengo dedico este trabajo de investigación.

A MIS HERMANOS

Minerva

Victor

Angelo

Rafael

Héctor

A MIS TIOS

Bartolo

Ruth

Nectali

Manuel

Nino

Francisco

Gil

Eufracia

Paloma, Saul, Leobardo

A MIS SOBRINOS

Dany Leopoldo

Anibal Jovanni

Denis Gadalupe

Imelda Leonor

Mirna Leonor

Oswaldo

Marisol

Alejandra

A todas las personas que de alguna manera colaboraron a la realización de esta investigación, a mis compañeros de generación: Antonio, Heriberto, Valentin, Raúl, Juan, Matilde, Roberto.

AGRADECIMIENTO

A MIS ASESORES

p.h.D. Rigoberto Gonzalez G.

Quién participo como asesor principal, por sus valiosas sugerencias y aportaciones en la revisión y corrección del presente trabajo, así como la amistad reflejada y entusiasmo para su realización.

ING. Carlos Cesar Rodriguez A.

Por su colaboración en la realización de este trabajo.

ING. Margarito de la Garza D.

Por su colaboración en la realización de este trabajo.

Al departamento del Laboratorio de Ciencias Biológicas, por el apoyo practico en la elaboración de este trabajo en especial para:

p.h.D. Luis Galan Wong

M.C. Magdalena Iracheta Cardenas

M.C. Jesus Jaime Hernández E.

A todos mis maestros, al personal de Informatica por las facilidades prestadas especialmente para la Sra. Lidia Verónica Belmares.

INDICE

I. INTRODUCCION	1
II. REVISION DE LITERATURA	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Métodos de conservación de las levaduras	7
a.- Cultivos en agar inclinado	7
b.- Deseccación	7
c.- Nitrógeno líquido o congelación	7
d.- Liofilización	7
2.3. Características de una levadura en un proceso de fermentación	8
2.3.1. Ventajas de las levaduras seleccionadas En forma líquida	9
2.3.2. Ventaja de las levaduras secas sobre las líquidas	9
2.3.3. Enturbiamiento debido a las levaduras .	10
2.3.4. Esporulación	10
2.4. Sulfitado	11
2.5. Fermentación	11
2.5.1. Formación de productos derivados durante la fermentación	12
2.6. Recomendaciones y cuidados para la microvinificación	13
2.7. Obtención del vino	14
2.7.1. El vino en la alimentación	15
2.8. Tipos de vinos mas comunes	15
a.- Vino de mesa	15
b.- Vinos generosos	16
c.- Vinos espumosos	16

2.9. Degustación o cata del vino	16
a.- Nitidez	17
b.- Color	17
c.- Olor	17
d.- Sabor	17
III. MATERIAL Y MÉTODOS	18
3.1. Objetivos principales	18
3.1.1. Material	18
3.1.2. Equipo	18
3.1.3. Reactivos	19
3.1.4. Material biológico	19
3.2. Aislamiento	19
3.3. Medios de cultivos utilizados para la Esporulación	22
1.- Agar jugo de tomate (V8)	22
2.- Acetato de Sodio	22
3.- Gorodkowa	22
4.- Mc. Clary's	22
5.- Corn Meal Agar	22
3.4. Reactivos para la tinción de ziehl neelsen	23
3.4.1. Fuccina básica	23
3.4.2. Alcohol acidulado	24
3.4.3. Desarrollo de la tinción de ziehl neelsen	24
3.5. Identificación de las levaduras aisladas	24
I.- Características morfológicas	25
a.- Crecimiento de reproducción vegetativa	25
b.- Características de las células vegetativas	25
II.- Características de cultivo	25
a.- Formación de película en medio líquido	25
b.- Formación de sedimento en medio líquido	25
c.- Formación de anillo	25
d.- Crecimiento en medio sólido	25
e.- Crecimiento a 37°C	25

III.- Características sexuales	26
a.- Características de ascas y ascosporas	26
b.- Formación de Pseudomicelio	26
IV.- Características fisiológicas	26
a.- Fermentación de azúcares	26
b.- Asimilación de compuestos de carbono	27
1.- Medio basal para la fermentación de compuestos de carbono	28
2.- Medio basal para la asimilación de compuestos de carbono	28
3.6. Métodos de conservación de las levaduras	28
1.- Cultivo stock	28
2.- Inmersión en aceite mineral	29
3.- Deseccación o secado	29
a.- Suelo o arena	29
b.- Papel filtro	29
3.7. Determinación de las condiciones óptimas	30
3.8. Elaboración del vino	32
3.8.1. Preparación del inóculo	32
3.8.2. Proceso de elaboración	32
3.9. Determinación del ph	35
3.10. Determinación de la acidez total	35
3.11. Determinación de la densidad	36
3.12. Determinación del porcentaje de alcohol	38
3.13. Determinación de los grados brix	38
 IV. RESULTADOS	 40
4.1. Aislamiento	40
4.2. Medios de cultivos utilizados para la esporulación	40
4.3. Identificación de las levaduras aisladas	41
4.4. Condiciones óptimas de crecimiento	45
4.4.1. ph óptimo de crecimiento	46
4.4.2. Temperatura óptima de crecimiento	46
4.5. Elaboración del vino	54

V. CONCLUSIONES	57
VI. RESUMEN	59
VII. BIBLIOGRAFIA	61

INDICE DE TABLAS

TABLA

1. Corrección de la densidad del vino	37
2. Corrección de los grados <u>brix</u>	39
3. Pruebas morfológicas de <u>Saccharomyces cerevisiae</u> ; levaduras aisladas a partir de frutas fermentadas. . .	42
4. Pruebas fisiológicas de <u>Saccharomyces cerevisiae</u> ; levaduras aisladas a partir de frutas fermentadas . .	44
5. Condiciones óptimas de crecimiento y tiempos de duplicación por minuto de las levaduras <u>Saccharomyces cerevisiae</u>	54
6. Resultados obtenidos del análisis del vino tratados bajo diferentes cepas de levadura <u>Saccharomyces cerevisiae</u>	56

INDICE DE DIAGRAMAS

DIAGRAMA

1	Clasificación taxonómica de las levaduras	
	<u>Saccharomyces sp.</u>	6
2	Diagrama de aislamiento de las cepas	
	<u>Saccharomyces sp.</u>	21
3	Diagrama de flujo del proceso del vino de fresa . .	34

INDICE DE FIGURAS

FIGURAS

12	Curvas de crecimiento de <u>S. cerevisiae</u> aislada del jugo fermentado de piña a temperatura ambiente y pH variable	47
13	Curvas de crecimiento de <u>S. cerevisiae</u> aislada del jugo fermentado de manzana a temperatura ambiente y pH variable	48
14	Curvas de crecimiento de <u>S. cerevisiae</u> a temperatura ambiente y pH variable	49
15	Curvas de crecimiento de <u>S. cerevisiae</u> aisladas del jugo fermentado de piña a pH de 4.5 y a temp. variable	51
16	Curvas de crecimiento de <u>S. cerevisiae</u> aisladas del jugo fermentado de manzana y a pH de 4.5 y a temp. variable	52
17	Curvas de crecimiento de <u>S. cerevisiae</u> a pH de 4.5 y a temperatura variable	53

I. INTRODUCCION

En México existe una gran variedad de frutas con un alto contenido de azúcar y aceite, estas frutas contienen sobre su superficie una variada flora de bacterias y levaduras silvestres que pueden ser aisladas y seleccionadas para un proceso de fermentación, éstas tienen la habilidad de crecer a diferentes condiciones ambientales y utilizar diferentes sustratos.

Las levaduras han sido utilizadas por el hombre desde hace miles de años para fines industriales ya sea para la fabricación de alimentos fermentados, bebidas alcohólicas, producción de pan, fabricación de solventes químicos, producción de enzimas, vitaminas, producción de etanol y biomasa. Este proceso fue descubierto de una manera empírica en Egipto hace aproximadamente 4000 años (Demain y Solomons, 1981). Otro producto elaborado por las levaduras y que se descubrió en la Mesopotamia hace aproximadamente 6000 años fue la cerveza (Canales, 1983 y Rose, 1981). Los Arabes y los Romanos empleaban el alcohol producido en los zumos de fermentación de frutas para la elaboración de perfumes, usos medicinales y en cosméticos (Miller 1975).

Actualmente el vino ha llegado a ser un arte relativamente bien conocido. Los procesos químicos se conocen lo suficiente

como para que la obtención de un buen vino ya no sea un accidente, sino un proceso bien controlado.

El objetivo principal de este trabajo fue aislar cepas de levaduras productoras de alcohol etílico a partir de jugos fermentados de frutas.

II. REVISION DE LITERATURA

2.1. Antecedentes

El primer hombre que observó las levaduras al microscopio fue Antonio Van Lewenhook en (1680), citado por Garza (1985), quien observó gran variedad de diminutas cosas vivientes en gotas de diversos materiales, entre ellos gotas de cerveza fermentada. Las numerosas cantidades de organismos en estas gotas las descubrió como cuerpos globulares, ovales o esféricas, estas primeras observaciones fueron dibujadas por Van Leewenhock y enviadas a la Real Sociedad de Londres.

Después de las aportaciones realizadas por Van Leewenhock hubo muy poca información adicional hasta que en (1835), Cagniard de la Tour, Kutzing y Schah citado por Garza (1985), en sus estudios sobre levaduras de cerveza y vino demostraron que estos organismos son células que se reproducen por gemación; Schwan observó endosporas que se liberan por ruptura de la pared celular.

Bary (1866), citado por Garza (1985) comparo el cuerpo esporal de las levaduras con el saco esporal de las ascosporas formadas por hongos ascomicetos por otra parte Reess (1868), citado por Garza (1985) da una descripción más detallada de las endosporas en varias especies de levaduras de su forma de reproducción por gemación y llamó al saco esporal "asca" y a la

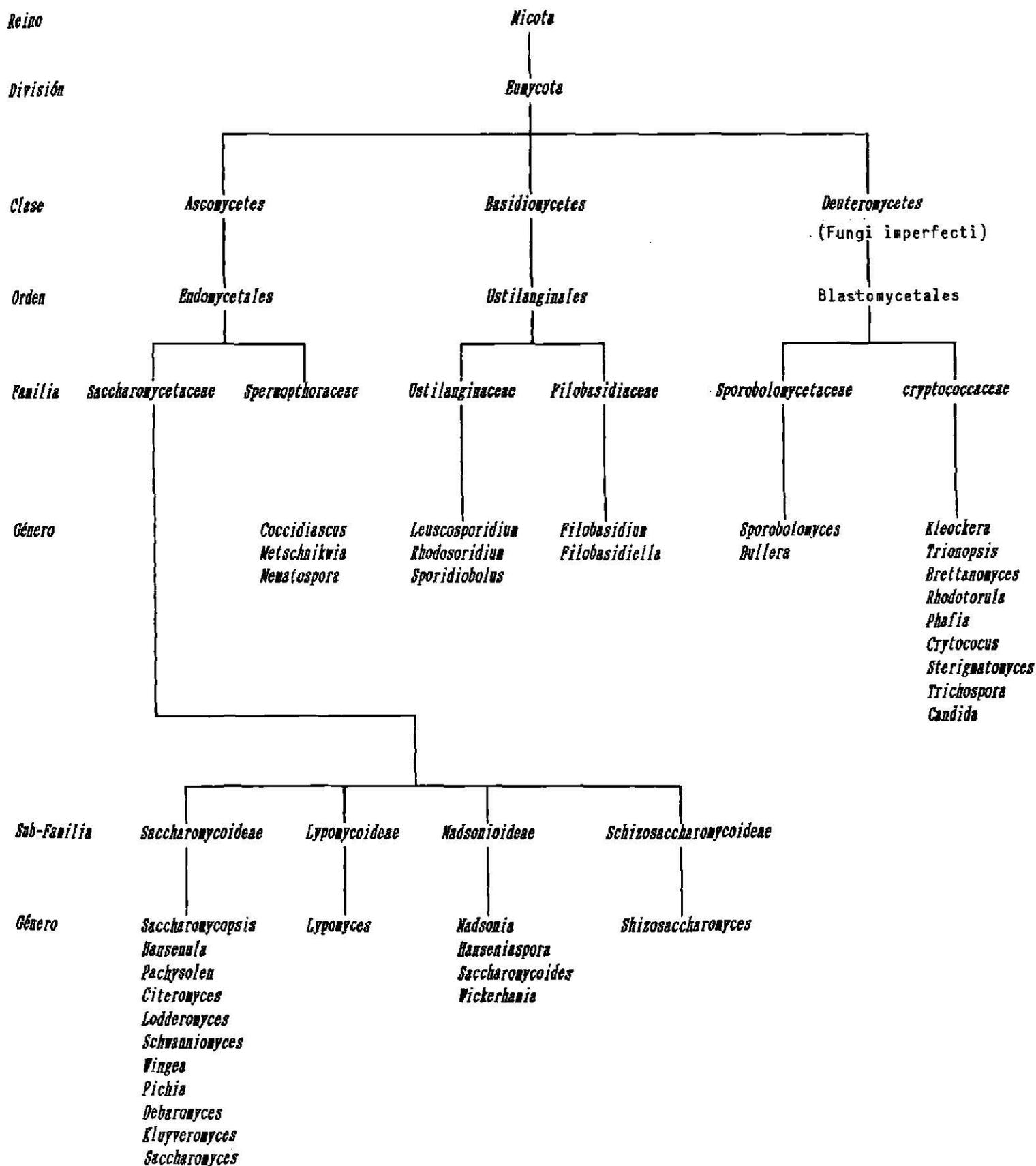
endospora "ascospora"; posteriormente estableció el primer enfoque al problema de la identificación y clasificación de las levaduras, en base a la forma celular y métodos de reproducción, acentuando así el uso de las características morfológicas en la taxonomía de las levaduras.

Pasteur (1876), citado por Garza (1985) introdujo métodos para establecer cultivos puros de levaduras, los que fueron perfeccionados por Emil Christian Hansen en 1883 quien a lo largo de 30 años realizó estudios morfológicos, los cuales trajeron a la luz el hecho que las diversas formas de levaduras difieren en su habilidad para fermentar carbohidratos, diferenció y caracterizó gran número de especies, muchas de las cuales son reconocidas actualmente, con lo que elaboró un segundo enfoque al problema de la clasificación de las levaduras.

El primer sistema completo de identificación por esporulación fue realizado por Stelling-Dekker (1931), citados por Magallón (1985), Subsecuentemente J. Lodder en 1941 publicó un volumen sobre las levaduras no formadoras de esporas. La publicación de éstos tres estudios contribuyó al ordenamiento taxonómico de las levaduras, facilitando así su clasificación en el mundo microbiológico.

Existe un método de conservación para las levaduras, el cual consiste en una solución de sacarosa al 10%, éste método de conservación continúa empleándose hoy en día con un buen éxito. Para ello los cultivos de levadura en sacarosa se conservan en la oscuridad a 10-15°C en matraces que se cierran con algodón y se cubren con parafina, esto fue establecido por Emil Christian Hansen (1896), citado por Magallón (1985).

Wohl y Scherdel (1915), citados por Magallón (1985), pusieron en práctica el sistema de adicionar sustancias nutritivas en forma de compuestos amoniacaes y fosfatos, en esta época también tuvo lugar el desarrollo del método de alimentación diferencial.

Clasificación Taxonómica de las levaduras *Saccharomyces* sp.

2.2. Métodos de conservación de las levaduras

El propósito de la conservación de los cultivos es mantener a las levaduras puras, vivas, sin variedad o mutación, y con sus características originales como se aislaron según (Gherna et. al 1981).

a.- Cultivos en agar inclinado: Estos pueden ser almacenados a temperaturas de 3°C a 5°C y resembrados a intervalos de 3-6 meses, pero si además se cubre el medio de cultivo con aceite mineral puede aumentarse el tiempo entre cada transferencia de 1 a 2 años.

b.- Desecación: En éste método se utiliza como soporte suelo, papel filtro y gelatina, todos éstos en condiciones estériles, a los cuales se les inocula una suspensión de la cepa a desecar y se colocan en un desecador o en una incubadora para su secado, después de esto los frascos se cierran herméticamente con un tapón de hule y se almacenan a temperaturas de 3°C a 5°C, mediante ésta técnica se conservan las levaduras por años.

c.- Nitrógeno líquido o congelación: El cultivo se suspende en un agente crioprotector (glicerol, dimetil sulfóxido), almacenándose desde -70°C a -196°C en nitrógeno, éste proceso de preservación es a largo plazo y además es caro.

d.- Liofilización: Este método consiste en la eliminación de agua del cultivo celular por sublimación, congelado bajo condiciones de presión, se suspende el cultivo celular en un agente crioprotector como leche descremada, suero o glutamato

de sodio, se congela y se lleva a secado con ayuda de un liofilizador.

2.3. Características de una levadura en un proceso de fermentación

Hasseltine y Haynes (1973) establecieron que una levadura que se usa en un proceso de fermentación debe reunir ciertos atributos o características para que ésta se utilice.

- 1.- La cepa debe de ser genéticamente estable.
- 2.- La cepa debe de producir rápidamente una gran cantidad de células vegetativas y esporas.
- 3.- La cepa debe de crecer vigorosamente y rápidamente después de inocularse en los matraces.
- 4.- El cultivo de levadura usado debe de ser un cultivo puro.
- 5.- La cepa debe de producir el producto deseado en un periodo corto de tiempo.
- 6.- La levadura debe de producir el producto deseado libre de sustancias tóxicas.
- 7.- La cepa usada debe de ser capaz de autopropagarse de la contaminación, esto puede ser bajando o subiendo el pH o adicionando un inhibidor microbial deseado.
- 8.- La levadura usada tendrá periodos de viabilidad razonablemente largos.
- 9.- La cepa debe de dar cantidades predecibles de producto en un tiempo corto de fermentación, una vez

inoculado el galón de fermentación se detectan pequeñas cantidades del producto deseado, con la finalidad de conocer el funcionamiento del proceso de fermentación.

2.3.1. Ventajas de las levaduras seleccionadas en forma líquida

- 1.- Rápida iniciación de la fermentación con menor oxidación y menor acidez volátil.
- 2.- Reducción en la dosis de SO₂ necesaria para las levaduras seleccionadas que producen una menor cantidad de acetaldehído.
- 3.- Posterior clarificación más efectiva y rápida.
- 4.- Fermentación con levaduras que resisten en mayor grado el aumento progresivo del alcohol.
- 5.- Existencia de levaduras seleccionadas especiales para cada tipo de vino (Madrid, 1987).

2.3.2. Ventaja de las levaduras secas sobre las líquidas

- 1.- Tiene un tiempo prolongado de conservación de más de 1 año, debido a su baja humedad.
- 2.- No es necesaria una multiplicación previa de dichas levaduras, por lo cual pueden añadirse a cualquier cantidad de mosto.
- 3.- Rápido comienzo de la fermentación (3-6 hr).

4.- Existen levaduras especiales para cada tipo de vino para que actúen eficazmente las levaduras seleccionadas, lo ideal es adicionar metabisulfito de potasio y dejarse reposar de 6 a 12 horas antes de adicionar las levaduras que llevarán a cabo el proceso de fermentación (Madrid, 1987).

2.3.3. Enturbiamiento debido a las levaduras

El enturbiamiento de las levaduras se manifiesta en aquellos vinos que por cualquier causa han quedado dulces para tal efecto debe de cuidarse que la fermentación llegue hasta el final para que el vino adquiera su límpidez y se aclare por completo (Madrid, 1987).

2.3.4. Esporulación

La esporulación se inicia por falta de alimentación o por acumulación de productos tóxicos. Las células de levaduras deben de ser jóvenes y fuertes, tener aereación, el pH del medio deberá de ser de 4.5, y la temperatura de incubación debe de ser a 30°C. La presencia de sustancias estimulantes como sulfato de calcio favorecen la esporulación, pero las sales de amonio ejercen un efecto contrario. Este método fue publicado por Tremaine, Miller (1956), citados por Prescott y Gordon (1949).

2.4. Sulfitado

Este método consiste en adicionarle al mosto anhídrido sulfuroso en forma de metabisulfito de potasio como agente antiséptico que inhibe a las bacterias y levaduras apiculadas no productoras de alcohol, dejando el campo libre a las levaduras elípticas que son las productoras de alcohol, facilitan la disolución de las materias colorantes con lo que se obtienen vinos más intensamente coloreados, activa las reacciones de transformación del azúcar en alcohol y anhídrido carbónico.

El metabisulfito se agrega en cantidades de 50 a 100 mg/lt (Desrosier, et. al 1987), y no es nocivo al organismo humano, la práctica del sulfitado se debe de hacer inmediatamente después de la molienda, si no se usa el metabisulfito de potasio la fermentación puede desviarse y entonces el vino resulta de mala calidad y difícil para su conservación.

2.5. Fermentación

Los factores que deben de considerarse para la fermentación son: Selección de la levadura, sustancias nutritivas del mosto, la concentración de azúcar, la acidez, suministro de oxígeno y la temperatura.

Las enzimas de las levaduras Saccharomyces cerevisiae, son las responsables de la fermentación de los azúcares presentes en el mosto, por medio de un proceso anaerobio; produciendo alcohol etílico y anhídrido carbónico, además la formación de

numerosos productos secundarios que determinan en parte el aroma y otras propiedades del vino.

La temperatura adecuada para la fermentación del vino de mesa es de 25°C que nos permite obtener vinos de muy buena calidad y conforme aumenta la graduación de alcohol la concentración de azúcar disminuye y la fermentación va haciéndose más lenta debido a la inhibición del crecimiento de las levaduras por el porcentaje cada vez mayor de alcohol, hay levaduras que pueden continuar la transformación de azúcar hasta llegar a los 18 grados de alcohol Prescott (1962), Frazier (1978).

2.5.1. Formación de productos derivados durante la fermentación

Madrid y berry (1987) publicó que en el proceso de fermentación se producen diversos productos como:

Alcohol: producto obtenido por la transformación biológica anaeróbica de los azúcares fermentables presentes en el mosto.

Anihídrido carbónico: gas desprendido por las levaduras.

Acido acético: Se produce en cantidades pequeñas a partir del acetaldehído, también puede producirse a partir de bacterias acéticas que oxidan el alcohol. glicerina: Ingrediente importante de los vinos que les presta características especiales.

Alcoholes: isoamílico, isobutírico ect. que se forman a partir de los aminoácidos de las proteínas. Acidos volátiles: se forman en cantidades pequeñas (0.3 -1 gr/lt),

producidos por un desarrollo excesivo de bacterias acéticas dando como resultado un avinagramiento. Esteres diversos, ácido succínico y aromas.

2.6. Recomendaciones y cuidados para la microvinificación

La siguiente técnica que se presenta a continuación se apega a las recomendaciones internacionales y a los resultados obtenidos en el Laboratorio de microvinificación del Campo Agrícola Experimental La Laguna, del Centro de Investigaciones Agrícolas del Norte (CIAN), del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) citado por Reyes y González (1977).

- 1.- El mosto y el vino debe trabajarse y manejarse en las mejores condiciones de limpieza e higiene.
- 2.- Debe de evitarse el contacto del mosto y del vino con utensilios, recipientes de fierro u otro metal que se oxide.
- 3.- La conservación del vino debe de ser a temperatura fresca, al abrigo del aire y el polvo.
- 4.- El uso del metabisulfito de potasio son prácticas antisépticas que debe de efectuarse para preservar los vinos, pero no se debe de abusar de este antiséptico.
- 5.- El aire y los microbios descomponen y avinagran el vino, por lo cual los recipientes que lo contengan

no deben de dejarse abiertos o en contacto con el aire.

- 6.- En algunos vinos puede presentarse la formación de una película de levaduras o bacterias acéticas sobre la superficie del vino, en este caso debe de efectuarse de inmediato un trasiego, el cual consiste en la separación del vino de las heces o sedimentos, esto se hace con ayuda de un sifón o una manguera y se hace un sulfitado, ya que de no hacerlo el vino puede transformarse en vinagre en su totalidad.

2.7. Obtención del vino

Flores (1992), menciona que el vino proviene de la fermentación biológica anaeróbica de los azúcares fermentables que se encuentran en todos los frutos, este proceso se origina por la acción directa de las levaduras Saccharomyces cerevisiae. Para que la fermentación alcohólica se produzca de manera favorable son necesarias varias condiciones que se resumen en el control de los siguientes parámetros.

- 1.- Condiciones biológicas: (levadura: selección de cepas, desarrollo de cepas y acción de cepas).

- 2.- Condiciones físicas: (temperatura, operaciones mecánicas, agitación).
- 3.- Condiciones químicas: (pH, oxígeno, sustancias nutritivas y procesos químicos).

2.7.1. El vino en la alimentación

El vino se consume durante las comidas como una bebida acompañante, por su composición no embriaga ni es nocivo para la salud.

En México se perdió el hábito del vino cuando los españoles prohibieron el cultivo de la vid y la elaboración del vino durante la época colonial, para evitar la competencia a sus productos, en la actualidad solamente una minoría de la población tiene la costumbre de acompañar los alimentos con vino, sin embargo esto se ve limitado por los altos precios y porque se ha rodeado al vino de una falsa imagen de lujo y sofisticación Reyes y González (1977).

2.8. Tipos de vinos mas comunes

Los tipos de vinos más comunes pueden clasificarse en tres tipos según Reyes y González (1977) y Prescott (1962).

a.- Vino de mesa

Es aquel que es adecuado para acompañar a los alimentos, y es el tipo de vino más conocido y más fabricado, se produce por una simple fermentación del jugo de uva y su posterior maduración. Los vinos de mesa pueden ser tintos, rosados o

blancos según la uva usada y el proceso de elaboración; a su vez estos tipos de vinos pueden ser secos, que contienen de 0 a 2.5% de azúcar, semisecos con 2.5 a 4% de azúcar y los dulces con 4 a 6% de azúcar.

b.- Vinos generosos

Son aquellos que se procesan para su uso como aperitivos o digestivos, y son generalmente dulces. Estos vinos poseen mucho cuerpo y un grado alcohólico alto, un ejemplo de aperitivo es el Vermut y de digestivo es el Oporto.

c.- Vinos espumosos

Son aquellos que desprenden burbujas gaseosas al ser consumidos. Se acostumbra beberlo en ocasiones memorables de celebración y en fiestas. Un ejemplo es el Champaña.

2.9. Degustación o cata del vino

Mareca (1969) estableció que el vino es una bebida que se aprecia por sus características organolépticas, o por las características de algunos de sus componentes, que nuestros sentidos pueden percibir. Llámese cata o degustación el concepto que formamos del vino. Por la vista, olfato y el paladar. Se dispone también de otros medios para juzgar un vino, tales son el análisis químico y la observación microscópica; pero éstos no equivalen o no pueden substituir a la degustación.

Los caracteres que se toman en consideración en la cata son: Nitidez, Color, Olor, Sabor.

a.- Nitidez: La nitidez se comprueba observando a contra luz el vino en una pequeña copa limpia de cristal incoloro, de forma cilíndrica o cónica.

b.- Color: El vino puede ser blanco, tinto y rosado o cereza

c.- Olor: Los olores del vino se perciben bien al agitar el vino en la copa no completamente llena y después de haberla calentado con la mano. Muchos catadores tapan la copa con la palma de la mano y sacuden el vino rápidamente antes de aspirar los olores con la nariz. En el vino se distingue el olor vinoso, el perfume o bouquet y el aroma.

d.- Sabor: El sabor se percibe bebiendo el vino lentamente a pequeños sorbos.

III. MATERIAL Y METODOS

La presente investigación se llevo a cabo en las Facultades de Agronomía y Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. La duración aproximada fue de diez meses iniciándose en Septiembre de 1991 para concluir en Junio de 1992.

3.1. Objetivos principales

- 1.- Aislar e identificar las levaduras silvestres a partir de frutas naturales.
- 2.- Encontrar las condiciones óptimas para el desarrollo de las levaduras silvestres en diferentes frutas o adicionadas al proceso de fermentación.
- 3.- Industrializar las diferentes frutas de la región.
- 4.- Fomentar la industria Vitivinícola en la región y en México.

3.1.1. Material

Pipetas, matraces erlenmeyer, vasos de precipitado, tubos de ensaye, asa bacteriológica, espátula, mechero, tamiz para colar, tubo de vidrio hueco, manguera y tapones de hule, tubos durham, cajas de petri, matraces de kitasato.

3.1.2. Equipo

Espectrofotómetro, Sequoia ajustado a 600 nm, refractómetro

manual, peachímetro o potenciómetro, incubadora bluem, autoclave, cámara estéril, microscopio, extractor de jugo, galones de vidrio opaco, densímetro, alcoholímetro.

3.1.3. Reactivos

Metabisulfito de potasio, medios de cultivos selectivos, enzima péctica, aceite de inmersión, ácidos y bases, papel filtro, leche en polvo, azúcar, solución buffer.

3.1.4. Material biológico

Fresa, piña, manzana, levadura comercial para vino (Montrachet).

3.2. Aislamiento

Las muestras se obtuvieron de frutas (Manzana Malus pumila, Piña Ananas comosus), de las cuales se extrajo su jugo con ayuda de un extractor. Estos jugos se depositaron en matraces Kitasato a tres cuartas partes de su volumen, adicionando un 20% de azúcar como fuente de energía para el crecimiento de las levaduras silvestres. Posteriormente se colocó un candado, el cual consiste en colocar un tapón de hule perforado a cada matraz e introduciendo sobre éste una varilla de vidrio hueco, al cual se le conecta una manguera, que se introduce a un vaso de precipitado con agua, esto se hace para desalojar el CO_2 y evitar la entrada de O_2 , provocando de ésta manera la fermentación Berry, (1987) y Flores (1992).

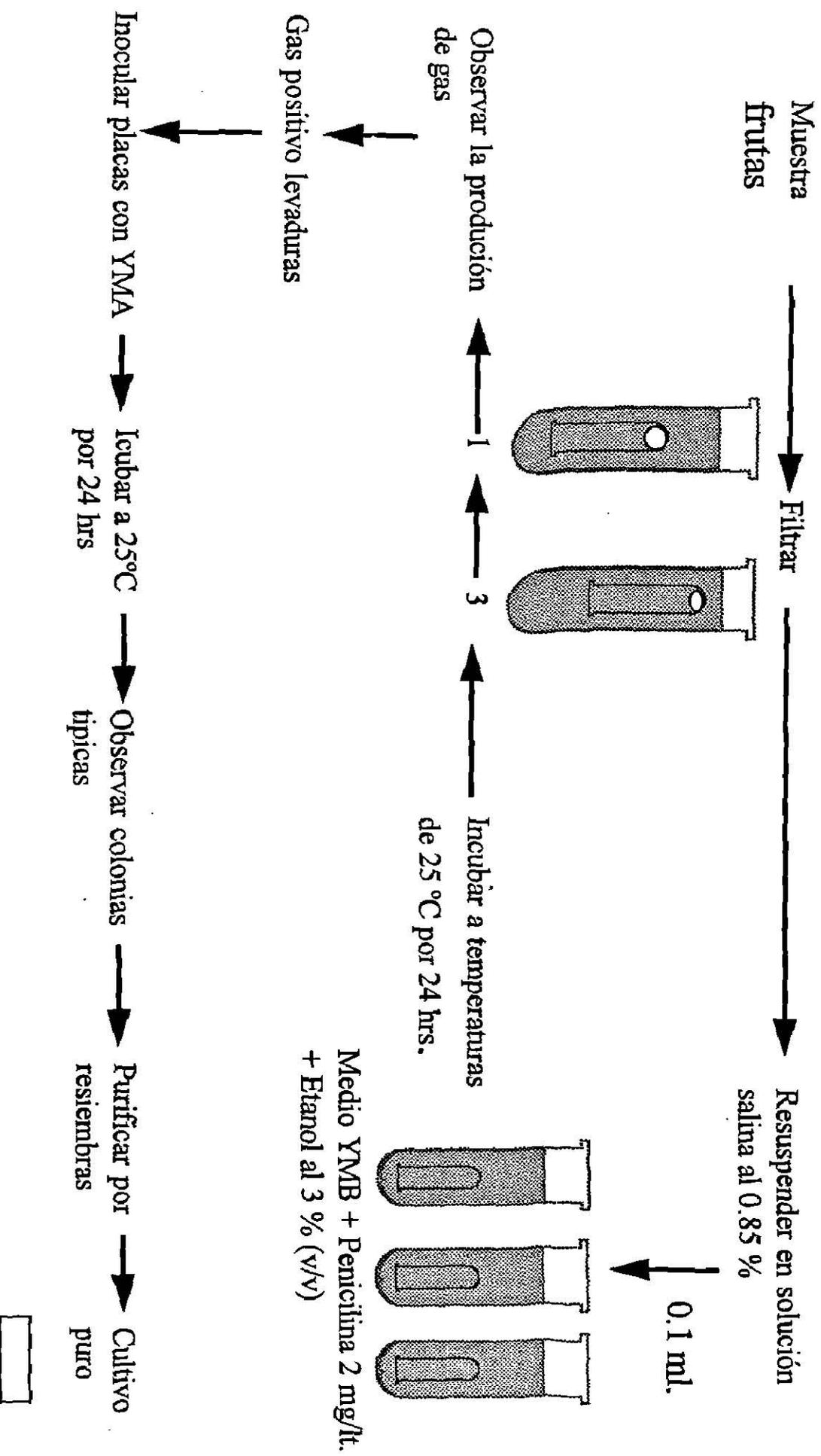
Después de dos semanas filtramos las muestras y se resuspenden en una solución salina al .85%, se toma 0.1 ml. de cada una para ser inoculadas en tubos de ensayo, los cuales contienen tubos durham invertidos, dichos tubos contienen un caldo nutritivo YMB. (Extracto de Malta 3 gr, Extracto de levadura 3 gr, Peptona 5 gr, glucosa 10 gr , agua destilada 1000 ml), mas 2 mg / lt. de penicilina, 3 % (v/v) de Etanol a pH de 4.5, Incubándose a 25 °C por 24 hrs, los tubos que presentaron mayor producción de gas se hicieron resiembras en cajas petri con un medio sólido YMA. (Extracto de Malta 3 gr, Extracto de Levadura 3 gr, Peptona 5 gr, Glucosa 10 gr, agar agar 23 gr, agua destilada 1000 ml. a pH de 4.5, Incubándose a 25 °C por 24 hrs. Posteriormente se escogieron las colonias típicas de levaduras y se efectuaron resiembres por estría en tres planos, hasta obtener colonias puras, ver diagrama de aislamiento 2. 3. establecido por Lodder (1989), citado por Garza (1985).

Para el cultivo comercial liofilizado se procedió a diluirlos en agua estéril para posteriormente tomar una asada de éstos y sembrarlos en un medio sólido YMA e incubarlos a 25 °C por 24 hrs.

Diagrama 2.3

Diagrama de aislamiento de las *Saccharomyces* sp. aisladas a partir de frutas fermentadas

21



3.3. Medios de cultivos utilizados para la esporulación

Una vez que se aislaron las cepas se procedió a sembrarlas en medios de cultivos adecuados para la formación de esporas. Estos medios se incubaron a 30°C - 35°C por 21 días, al término de este tiempo se hicieron tinciones de Ziehl-Neelsen para observar al microscopio la formación de esporas.

1.- Agar jugo de tomate (V8) recomendado por Lodder et. al en 1970. Que contiene por cada 1000 ml de agua destilada 250 ml de jugo campbell's, 3.75 gr de carbonato de calcio, 23 gr de agar agar.

2.- Acetato de Sodio recomendado por Salle 1942 que contiene 5 gr de acetato de sodio, 10 gr de cloruro de calcio, 23 gr de agar agar, agua destilada 1000 ml.

3.- Gorodkova recomendado por Lodder 1970. Extracto de carne 10 gr, cloruro de sodio 5 gr, glucosa 2.5 gr, agar agar 23 gr, agua destilada 1000 ml.

4.- Mc. Clary's recomendado por Salle 1943 que contiene por cada 1000 ml de agua destilada 0.25 gr de extracto de levadura, 1.8 gr de cloruro de potasio, 8.2 gr de acetato de sodio, 1 gr de glucosa, 23 gr de agar agar.

5.- Corn Meal Agar tomado de Lodder 1989 que por cada 1000 ml de agua destilada contiene 17 gr de Bacto-Corn-Meal Agar.

3.4. Reactivos para la tinción de ziehl neelsen

Azul de metileno

Solución A:

Azul de metileno al 9% -----	1.0 gr.
Etanol -----	300.0 gr.

Solución B:

Hidróxido de potasio 0.1 N. -----	10.0 ml.
Agua destilada -----	1000.0 ml.

Mezclar la solución A Y B

3.4.1. Fuccina básica

Fuccina básica -----	3.2	gr.
Alcohol al 95% -----	106.0	ml.
Cristal de fenol -----	53.0	gr.
Agua destilada-----	1000.0	ml.

3.4.2. Alcohol acidulado

Alcohol etílico -----	850.0 ml.
Acido láctico -----	150.0 ml.

3.4.3. Desarrollo de la tinción de ziehl neelsen

- 1.- Tomar con el asa de platino una gota de agua y se extiende en un porta objetos.
 - 2.- Con la misma asa bacteriológica pero estéril se tomó una asada de la muestra y se extiende en forma de película sobre el porta objetos.
 - 3.- Secar la muestra con el mechero.
 - 4.- Se colocó el porta objetos sobre un tripié con tela de asbesto y se pone a la flama del mechero.
 - 5.- Adicionar fuccina básica gota a gota durante 5 minutos a ebullición.
 - 6.- Lavar con agua corriente y alcohol acidulado.
 - 7.- Adicionar azul de metileno durante un minuto.
 - 8.- Lavar con agua corriente y alcohol acidulado.
 - 9.- Observar al microscopio con el objetivo 100X.
- Las tinciones son opcionales, esta nos permite visibilidad de las ascosporas.

3.5. Identificación de las levaduras aisladas

Para la identificación de cada una de estas cepas aisladas se procedió a seguir los criterios de Reess (1970), Phaff,

Miller (1978) citados por Lodder et. al (1989), además usamos como patrón de comparación una cepa Saccharomyces cerevisiae de la colección del Laboratorio de Microbiología Industrial de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L.

I.- Características morfológicas

a.- Crecimiento de reproducción vegetativa: Se hizo una tinción simple y se observó al microscopio con el objetivo 100 X.

b.- Características de las células vegetativas:

Se observaron a simple vista cada una de éstas colonias de levaduras en sus respectivas cajas de petri.

II.- Características de cultivo

a.- Formación de película en medio líquido: Para esta prueba se procedió a sembrar las cepas de interés en un tubo con rosca de 15 X 150 por duplicado, los cuales contenían un medio de cultivo líquido YMB, incubándose a 25°C por 24 horas y por último se checo cada uno de estos tubos.

b.- Formación de sedimento en medio líquido: En esta prueba se hizo lo mismo que en el inciso anterior.

c.- Formación de anillo: Aquí también se hizo lo mismo que en el inciso a.

d.- Crecimiento en medio sólido: Se tomó una asada de la levadura que se hizo crecer en un medio líquido YMB, para sembrarse por estría en un medio sólido YMA.

e.- Crecimiento a 37°C: Para realizar esta prueba se

procedió a sembrar las cepas de interés en un medio sólido YMA, incubándose a 37 °C por 24 horas.

III.- Características sexuales

a.- Características de ascas y ascosporas: Una vez aislada cada una de éstas cepas se procedió a sembrarlas en diferentes medios de cultivo especiales para la formación de ascosporas. Estos medios se incubaron de 30°C a 35°C por 21 días, al término de éste período se procedió a realizar la tinción de Ziehl Neelsen para observar al microscopio con el objetivo 100X.

b.- Formación de Pseudomicelio: Se prepararon dos medios de cultivo (V8, YMA). para tal efecto se tomó una asada de las cepas de interés y se sembraron en placas de delmateus. El cuál consiste en tomar una muestra con una asa bacteriológica estéril y sembrarla por ralladura en cuatro planos colocándose sobre ésta un cubre objetos estéril con una pinza y por último se incubó por 5 días.

IV.- Características fisiológicas

a.- Fermentación de azúcares: Para realizar esta prueba se eligió un medio de cultivo basal libre de azúcares al cual se le añadió suficiente azul de bromotimol para que cambie a un color verde tenue a un pH de 7, Porciones de 5 ml de este medio se adicionan a cada serie de tubos de 12 X 150 mm que contienen tubos durham invertidos de 6 X 50 mm, los tubos y su contenido se esterilizan a 115°C por 15 minutos y cada tubo se le añadió asépticamente por filtración 1 ml. de una solución al

5% del azúcar a probar (sacarosa, glucosa, galactosa, lactosa, D-manitol, almidón soluble). Posteriormente se inoculó con un cultivo joven de la cepa de interés, el cual se hizo crecer en un medio líquido YMB, incubándose a 25°C por 10 -12 días y por último se agitan y se checa la producción de gas. Los tubos deben de agitarse antes de leer los resultados. Este método fue publicado por (Wickerham, et al 1943)

b.- Asimilación de compuestos de carbono: Para probar si las cepas de interés pueden utilizar un determinado azúcar, se procedió a sembrarlas en un medio basal el cual se esterilizó a 115°C por 15 minutos y a cada tubo se le adicionó asépticamente por filtración 1 ml. de los siguientes azúcares (sacarosa, glucosa, galactosa, lactosa D-Manitol, almidón soluble, maltosa, melobiosa, inulina, D-Xilosa, celobiosa, L-Ramnosa, rafinosa, L-Arabinosa) con una concentración al 5%. Posteriormente se inoculó con una asa bacteriológica. La cepa joven de interés y se incubó a 25°C -30°C por 5-10 días para ver el crecimiento de dichas cepas, esta metodología fue publicada por Beijerinck en (1889).

1.- Medio basal para la fermentación de compuestos de carbono

Fosfato monopotásico -----	0.1 gr.
Sulfato de magnesio -----	0.5 gr.
Sulfato de amonio -----	0.5 gr.
Agua destilada -----	1000.0 ml.

2.- Medio basal para la asimilación de compuestos de carbono

Fosfato monopotásico -----	0.1 gr.
Sulfato de magnesio -----	0.5 gr.
Sulfato de amonio -----	0.5 gr.
Acido aspártico -----	5.0 mg.
Asparagina -----	5.0 mg.
Riboflavina -----	5.0 mg.
Agua destilada -----	1000.0 ml.

3.6. Métodos de conservación de las levaduras

Gherna (1984), menciona que en la preservación de cepas de levaduras se deben de utilizar diversas técnicas de mantenimiento e información adicional de crecimiento y viabilidad, morfología, aislamiento, patrón bioquímico. Los cultivos de éstas cepas deben de mantenerse íntegramente puros durante el transcurso de la investigación mínimamente, es por eso que se emplearon diferentes sistemas de mantenimiento para estas cepas de levaduras.

1.- Cultivo stock

Este cultivo consiste en sembrar la cepa en tubos con rosca

los cuales contienen un medio de cultivo YMA inclinado, los cuales se almacenan a temperaturas de 3°C a 5°C para su conservación.

2.- Inmersión en aceite mineral

Hacer crecer la cepa en un medio YMA inclinado, después de ocurrir el crecimiento se añadió aceite mineral estéril asépticamente hasta cubrir el cultivo por completo y tener una altura superior a 2 cm, esto se hace con la finalidad de prevenir la deshidratación y reducir la actividad metabólica. El aceite debe de ser esterilizado en un horno a 170°C por espacio de 2 horas.

3.- Desecación o secado

Se utiliza como soporte suelo o arena, papel filtro; se mezclan con el cultivo y se deseca por medio de un desecador o una estufa.

a.- Suelo o arena: Las cepas formadoras de esporas se conservaron en arena estéril. Esta se deposita en frascos o tubos de rosca, para ser esterilizados por espacio de 3 a 4 hr a 115°C, después de ello se inoculó una suspensión de la cepa.

b.- Papel filtro: Este método consiste en recortar tiras o discos de papel filtro para ser depositados en frascos o tubos con tapón de rosca, para ser esterilizados por espacio de 3 a 4 hr a 115°C. Estos discos pueden ser removidos asépticamente con una pinza o aguja estéril.

La suspensión que se adicionó a la arena y al papel filtro se hizo de la siguiente forma:

Se preparó un medio de cultivo líquido YMB a pH de 4.5 al cual se le inoculó la cepa de interés, para ser incubada a 30°C por 24 a 48 hr. Este medio se mezcló en un 50% con una suspensión de leche descremada y diluida al 20%, la cual se esterilizó a 76°C por 20 minutos, en seguida se tomó la suspensión en la cual está contenida la cepa con una pipeta estéril y se adiciona gota a gota al frasco que contiene la arena y al frasco que contiene el papel filtro, hasta humedecer completamente, después se colocan éstos frascos en un desecador por 5 a 10 días y por último se cierran herméticamente éstos frascos con un tapón de hule para ser almacenados a temperatura de 4°C a 6°C.

3.7. Determinación de las condiciones óptimas

Una vez que se identificaron estas cepas se procedió a determinar sus condiciones óptimas de crecimiento (pH y temperatura) y de ésta manera determinar su tiempo de generación. Para esto se utilizaron matraces de 50 ml modificados con un tubo de 18 X 150 adaptados al matraz que nos permite leer directamente en el espectrofotómetro, éstos matraces fueron esterilizados con 8 ml del medio YMB. Posteriormente se le adicionó 2 ml de inóculo el cual contiene la cepa de interés.

Los inóculos se prepararon un día antes en tubos de rosca con el mismo medio YMB a pH de 4.5, incubados a 25°C-30°C por 24 hr.

El primer parámetro que se determinó fue el pH óptimo de cada cepa, utilizando para ello 14 matraces modificados de 50 ml., cada uno con 8 ml del medio líquido YMB a 7 pH's diferentes (3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5), y a una temperatura de incubación a medio ambiente, utilizando un sistema buffer de ácido cítrico 0.1 M y ajustado con HCL 0.1 N O NaOH 0.1 N.

Se calibró el espectrofotómetro a 600 nm con el medio de cultivo líquido YMB como blanco, efectuándose mediciones cada 30 minutos durante 6.5 horas.

Posteriormente se determinó su temperatura óptima de crecimiento, utilizando 14 matraces modificados con el medio de cultivo líquido ajustado al pH óptimo de 4.5. Las temperaturas a probar fueron 15°C, 20°C, 25°C, 35°C, 40°C, Y 45°C enumeradas del 1 al 7 por duplicado. (30°C)

Con los datos obtenidos en estos parámetros se determinó el tiempo de generación o duplicación por minuto de cada cepa utilizando la siguiente formula (Brock et. al 1989).

$$K = \frac{1}{tg.} = \frac{\text{Log } A_f - \text{log } A_o}{(t_f - t_o) - (.301)}$$

Donde:

k = Constante de crecimiento (número de duplicaciones por minuto)

tg = Constante de velocidad de crecimiento instantánea (tiempo de generación o duplicación)

Af = Lectura de absorvencia final del intervalo

Ao = Lectura de absorvencia inicial de intervalo

tf-to = Diferencia de tiempo entre las dos lecturas

3.8. Elaboración del vino

3.8.1. Preparación del inocular

Las levaduras aisladas se activaron en un medio de cultivo líquido YMB, incubándose a 30°C por 24 horas. Posteriormente se tomaron 20 ml de éstos tubos para transferirlos a matraces de 500 ml los cuales contienen 300 ml del medio líquido YMB, incubándose a 25°C por 24 hr. Posteriormente se inoculan los galones que contienen el mosto de fresa.

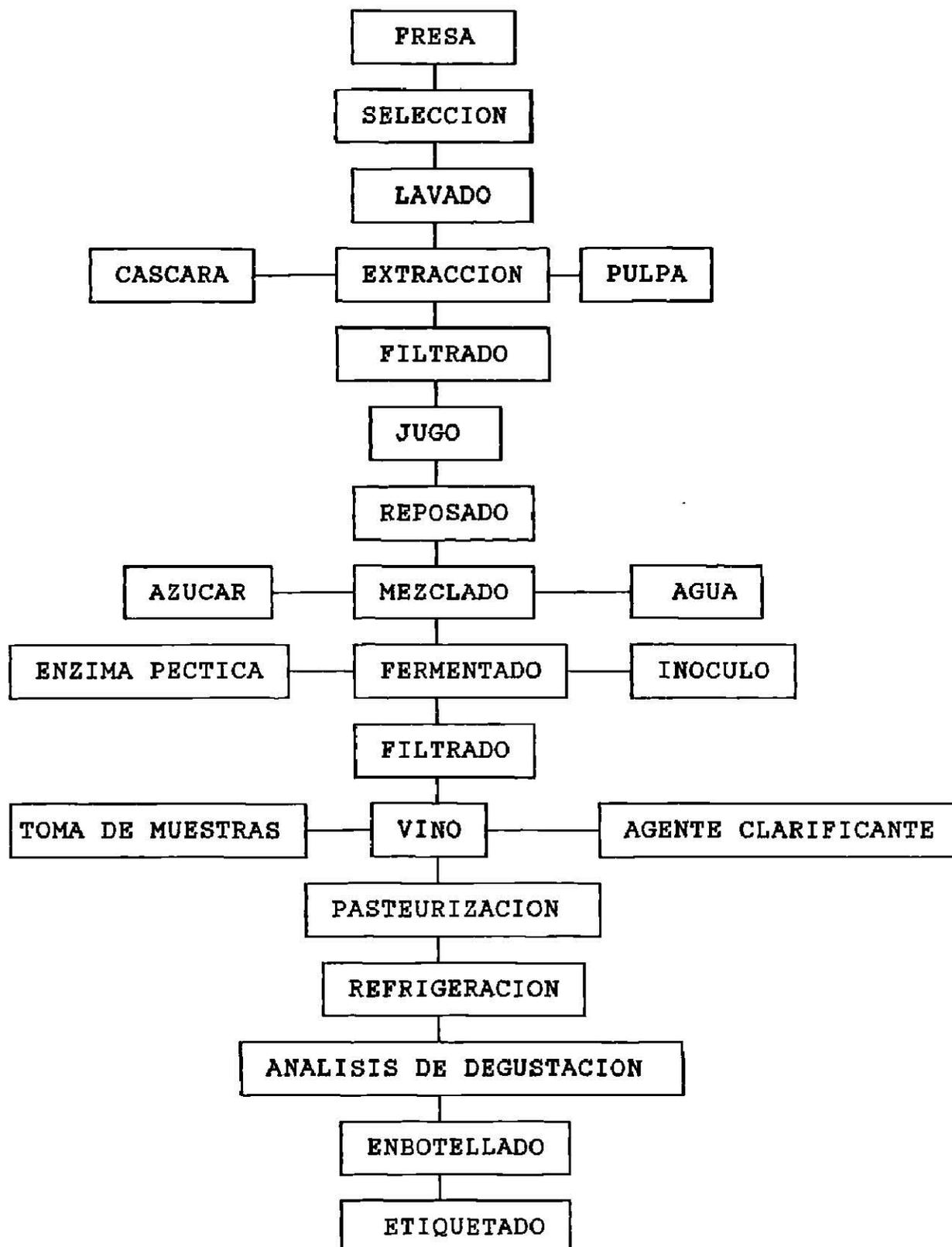
3.8.2. Proceso de elaboración

Primeramente se seleccionó la fruta (fresa Fragaria mexicana), y se libera de residuos indeseables para extraer su jugo por prensado o con un extractor. A este mosto se le adicionó de 50 a 100 mg de metabisulfito de potasio por cada litro de mosto y se deja reposar de 6 a 10 horas. Posteriormente éste se diluye con agua estéril en una proporción de 1:2.5, además se adiciona azúcar hasta obtener 20 grados Brix. Este parámetro fue publicado por Flores (1992), y se regula su pH a 4.5 según Prescott (1992), con ayuda de ácido

sulfúrico o hidróxido de sodio según sea el caso, y en seguida se llena a 3/4 partes de su capacidad el galón para evitar derramar el mosto al iniciarse la fermentación y se le adicionó 100 ml del inóculo y 4 gramos de enzima pectica.

Posteriormente se colocó a cada galón un candado, el cual consiste en colocar un tapón perforado de hule al galón e introduciendo sobre éste una varilla de vidrio hueco, al cual se le conecta una manguera que se introduce a un vaso de precipitado con agua; esto se hace para desalojar el CO₂ del galón producido por las levaduras que están llevando a cabo la fermentación y evitar la entrada de O₂. Posteriormente los galones se colocaron a una temperatura de 25°C a 30°C durante 21 días. Fore (1945) y Berry (1987), después de la fermentación se filtró y se colocó a 4°C para que precipiten los residuos y las levaduras. Posteriormente se decanta y se toman muestras para checar los siguientes parámetros: Grados Brix, porcentaje de alcohol, acidez total, pH. También Berry (1987), menciona que se deben de adicionar agentes clarificantes (enzima pectica o bentonita) que precipitan lo turbio del mosto, se filtra y se pasteuriza a 75°C por 20 minutos y por último se embotella y se etiqueta.

Diagrama de flujo del proceso del vino de fresa



3.9. Determinación del pH

Meyer et. al (1982) estableció que el potenciómetro debe de calibrarse con frecuencia para esto se utilizan dos soluciones amortiguadoras, una con pH de 4 y la otra con pH de 7, calibrándose el potenciómetro de la siguiente manera:

- 1.- Se lava el electrodo con agua destilada.
- 2.- Introducir la parte sensible en la solución amortiguadora a pH de 4 y se oprime el botón de estándar.
- 3.- Lavar el electrodo con agua destilada y se seca con papel secante.
- 4.- Repetir la misma operación para pH de 7.
- 5.- Introducir el electrodo ya calibrado en la muestra problema y se oprime el botón de pH, se toma la lectura.
- 6.- Sacar el electrodo de la muestra, se lava y se colocó el electrodo en agua estéril.

3.10. Determinación de la acidez total

- 1.- En un matraz erlennmeyer se vierten 10 ml del vino con una pipeta, 50 ml de agua destilada y 5 gotas de fenoftaleina.
- 2.- Se toma una bureta dividida en décimas de cm cúbico, se lava con agua destilada y con una solución de hidróxido de sodio.

- 3.- Llenar la bureta con una solución de 0.3 N de hidróxido de sodio hasta algo más arriba del cero con objeto de desalojar el aire del tubo de salida y una vez conseguido esto se enrasa con el cero.
- 4.- Colocar un matraz que contiene vino debajo de la bureta y se añade gota a gota el hidróxido de sodio y agitando hasta que el vino tome un color amarillo pálido.
- 5.- Se lee el número de ml gastados de hidróxido de sodio y se multiplica por 100 y luego por 0.0049, lo cual nos dará la acidez total por litro de vino en ácido sulfúrico y para expresar la acidez total en ácido tartárico se multiplica por 0.0075.

3.11. Determinación de la densidad

- 1.- En una probeta de 250 ml, limpia y seca se vierten 200 ml de vino.
- 2.- Tomar la temperatura del líquido con un termómetro efectuando la lectura sin sacar del vino el depósito o bola del termómetro.
- 3.- Introducir solamente el densímetro en el vino, cogiéndolo por su extremo y dejándolo cuando ha alcanzado su estabilidad.
- 4.- Se lee la división que enrasa con la parte superior del menisco que forma el vino al mojar el vástago del densímetro.

- 5.- En caso de no haberse efectuado la operación a 15°C se hace una corrección de temperatura mediante la tabla No.1

Tabla No. 1 Corrección de la densidad del vino

Temperatura	Corrección
10	0.6
11	0.5
12	0.4
13	0.3
14	0.1
15	0.0
16	0.2
17	0.3
18	0.5
19	0.7
20	0.9
21	1.1
22	1.3
23	1.5
24	1.7
25	2.0

* 0.6-0.1 se resta

* 0.2-2.0 se suma

3.12. Determinación del porcentaje de alcohol

Para determinar la concentración de alcohol se sigue la misma metodología que se llevó a cabo en la determinación de la densidad, pero con un alcoholímetro de graduación de 0 a 100% de alcohol.

3.13. Determinación de los grados brix

- 1.- Calibrar el refractómetro, colocando una gota de agua destilada sobre el prisma medidor.
- 2.- Se abre la entrada de la luz.
- 3.- En el campo visual se verá una escala del cero al cincuenta.
- 4.- Con el tornillo calibrador se calibra a cero.
- 5.- Poner una gota de la solución problema en el prisma medidor.
- 6.- leer los grados brix.
- 7.- Después de su uso se limpia el prisma con un algodón con agua o alcohol y posteriormente con papel secante. Si la solución problema no esta a 20°C, se hacen las siguientes corrección que se muestra en la tabla No. 2.

Tabla No. 2 Corrección de los grados brix

BRIX	10	15	20	25	30	40	50	60	70
------	----	----	----	----	----	----	----	----	----

Para restar a la lectura

15°C	.31	.33	.34	.34	.35	.37	.38	.39	.40
16°C	.25	.26	.27	.28	.28	.30	.30	.31	.32
17°C	.19	.20	.21	.21	.22	.22	.23	.24	.24
18°C	.13	.14	.14	.14	.14	.15	.15	.16	.16
19°C	.06	.07	.07	.07	.07	.08	.08	.08	.08

Para adicionar a la lectura

21°C	.07	.07	.07	.08	.08	.08	.08	.08	.08
22°C	.14	.14	.15	.15	.15	.15	.16	.16	.16
23°C	.21	.22	.22	.23	.23	.23	.24	.24	.24
24°C	.28	.29	.30	.30	.31	.31	.31	.32	.32
25°C	.37	.38	.38	.39	.40	.40	.40	.40	.40

IV. RESULTADOS

4.1. Aislamiento

La técnica que se utilizó par el aislamiento se muestra en el diagrama 2.3, la cual consistió en sembrar las cepas del fermentado de piña (A1), las cepas del fermentado de manzana (B1), y la cepa testigo (C1), en el medio de cultivo YMB (caldo extracto de malta, extracto de levadura). Se observó claramente la producción de gas causada por las levaduras fermentativas en el medio mencionado, por otro lado las levaduras se sembraron en el medio de cultivo sólido YMA (extracto de malta, extracto de levadura y agar). Los cultivos de levaduras presentaron un buen crecimiento y diferenciación de las colonias, las cuales se observaron de un color cremoso, ovales y rugosas, que son características del genero Saccharomyces cereviciae. A partir de ellas se estableció un cultivo puro a través de resiembras periódicas.

Para el cultivo puro comercial (C1), se utilizó el medio de cultivo YMA, observándose el crecimiento y forma de las colonias de la levadura.

4.2. Medios de cultivos utilizados para la esporulación

En los medios agar jugo de tomate (V8) y el Gorodkova se requirió 21 días de incubación para que se presentara la esporulación, además las colonias de las levadura crecieron grandes y bien formadas. Estas levaduras presentaron de 1 a 4

ascosporas por asca. En cuanto a los demás medios de cultivos utilizados (Acetato de Sodio, Mc. Clary's, Corn- Meal-Agar). Los resultados fueron negativos ya que no hubo formación de ascosporas a los 21 días de incubación quizás porque no se dejaron más tiempo.

4.3. Identificación de las levaduras aisladas

La tabla No. 3 nos muestra los resultados de las levaduras Saccharomyces cerevisiae, aislada del fermentado de piña, del fermentado de manzana, y la levadura comercial testigo. Las levaduras pertenecientes a este genero se caracterizaron por presentar formas celulares, ovales y esféricas de color cremoso y rugosas. Su reproducción vegetativa fue por gemación múltipolar, presentaron sedimento en medio líquido, hubo crecimiento a 37°C, formaron pseudomicelio en placas de Delmatus. Presentaron de 1 a 4 ascosporas por asca, las cuales fueron tanto esféricas como ovales y se tiñeron de color rojo con la tinción de Ziehl Neelsen.

Tabla No. 3 Pruebas morfológicas de Saccharomyces cerevisiae;
levaduras aisladas a partir de frutas fermentadas.

A1	B1	C1	PRUEBAS REALIZADAS
			CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS
MP	MP	MP	Crecimiento de reproducción vegetativa
C	C	C	Características de células vegetativas
			CARACTERISTICAS DE CULTIVO
-	-	-	Formación de película en medio líquido
+	+	+	Formación de sedimento en medio líquido
-	-	-	Formación de anillo en medio líquido
+	+	+	Crecimiento en medio sólido
+	+	+	Crecimiento a temperatura de 37°C
			CARACTERISTICAS SEXUALES
+	+	+	Formación de Pseudomicelio
O	O	O	Características de las ascosporas

MP = Gemación multipolar

+ = Si hubo crecimiento

C = Colonias cremosas rugosas

- = No hubo crecimiento

O = Ovales y esféricas

En la tabla No. 4 se muestran los resultados de las pruebas fisiológicas.

En la fermentación de los siguientes carbohidratos: Sacarosa, glucosa, galactosa, hubo producción de gas, lo cual implica que si fueron fermentados por las levaduras Saccharomyces cerevisiae aisladas del jugo de piña, del jugo de Manzana, y la levadura comercial testigo. En cuanto a los azúcares lactosa, D-manitol y el almidón soluble, no se presentó formación de gas, por tal motivo no pudieron ser fermentados.

En la asimilación de los siguientes carbohidratos: Sacarosa, glucosa, galactosa, si hubo crecimiento de las levaduras aisladas en el medio de cultivo basal que se utilizó. En cuanto a los carbohidratos maltosa y rafinosa, nada más fue asimilado por las levaduras aisladas del fermentado de manzana y la levadura comercial testigo; no fue asimilada por la levadura aislada del fermentado de piña. Los resultados sugieren que puede existir variedades diferentes dentro de la misma especie ya que los demás parámetros indican que las levaduras aisladas son Saccharomyces cerevisiae comparados con los resultados de Lodder en 1989. Los carbohidratos que no fueron asimilados por las levaduras aisladas fueron: Lactosa, D-manitol, almidón soluble, melobiosa, inulina, D-xilosa, celobiosa, L-ramnosa, L-arabinosa; esto se debe a que no pudieron ser degradados a compuestos más simples.

Tabla No. 4 Pruebas fisiológicas de *Saccharomyces cerevisiae*;
levaduras aisladas a partir de frutas fermentadas

C1	A1	B1	CARBOHIDRATOS
			FERMENTACION
+	+	+	Sacarosa
+	+	+	Glucosa
+	+	+	Galactosa
-	-	-	Lactosa
-	-	-	D-Manitol
-	-	-	Almidón soluble
			ASIMILACION
+	+	+	Sacarosa
+	+	+	Glucosa
+	+	+	Galactosa
-	+/-	-	Lactosa
-	-	-	D-Manitol
-	-	-	Almidón soluble
+	-	+	Maltosa
-	-	-	Melobiosa
-	-	-	Inulina
-	-	-	D-Xilosa
-	-	-	Celobiosa
-	-	-	L-Ramnosa
+	+/-	+	Rafinosa
-	-	-	L-Arabinosa

En seguida se finiquita la tabla de la hoja previa

Fermentación	Asimilación
+ = Producción de gas	- = No asimila
- = No produce gas	+ = Si asimila
+/- = bien definido	

Las cepas aisladas se conservaron exitosamente utilizando las técnicas descritas anteriormente, dando mejor resultado la técnica de inmersión en aceite mineral, ya que nos permitió conservar las cepas aislada por periodos largos sin presentar contaminación, previniendo la deshidratación, reduciendo la actividad metabólica y el crecimiento del cultivo.

El método de conservación por medio de papel filtro también fue de gran éxito a largo plazo, pero la desventaja es que al momento de propagar las colonias, estas crecen pequeñas.

4.4. Condiciones óptimas de crecimiento

Las siguientes gráficas nos muestran los resultados de las mediciones espectrofotométricas de cada una de estas levaduras Saccharomyces cerevisiae con clave (A1), aislada del jugo fermentado de piña, Saccharomyces cerevisiae con clave (B1), aislada del jugo fermentado de manzana y Saccharomyces cerevisiae comercial testigo con clave (C1).

Las condiciones óptimas de crecimiento de las levaduras aisladas del jugo fermentado de piña, manzana y la cepa comercial testigo, en cuanto a su pH y temperatura se determinaron como se describe en material y métodos.

4.4.1. pH óptimo de crecimiento

Los experimentos para determinar el pH óptimo de crecimiento se desarrollaron a la temperatura ambiente para cada cepa de la levadura aislada.

4.4.2. Temperatura óptima de crecimiento

La figura 12 muestra la actividad alcanzada por Saccharomyces cerevisiae aislada del fermentado de piña, esta es incubada a temperatura ambiente, donde se observa que su pH óptimo es de 4.5, sin embargo a pH 4.0 muestra una buena actividad de crecimiento, incubándose a temperatura ambiente.

En figura 13 se maneja la actividad de Saccharomyces cerevisiae aislada del fermentado de manzana, incubándose a temperatura ambiente, en esta figura se observa que su pH óptimo es de 4.5, pero a 3.5 presenta buena actividad de crecimiento.

La figura 14 se refiere a la actividad alcanzada por Saccharomyces cerevisiae comercial, incubada a temperatura ambiente, donde obtuvimos un pH óptimo de 4.5 pero a pH de 4.0 presenta una buena actividad de crecimiento.

Fig. 12: Curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* aislada del jugo fermentado de piña a temperatura ambiente a pH variable

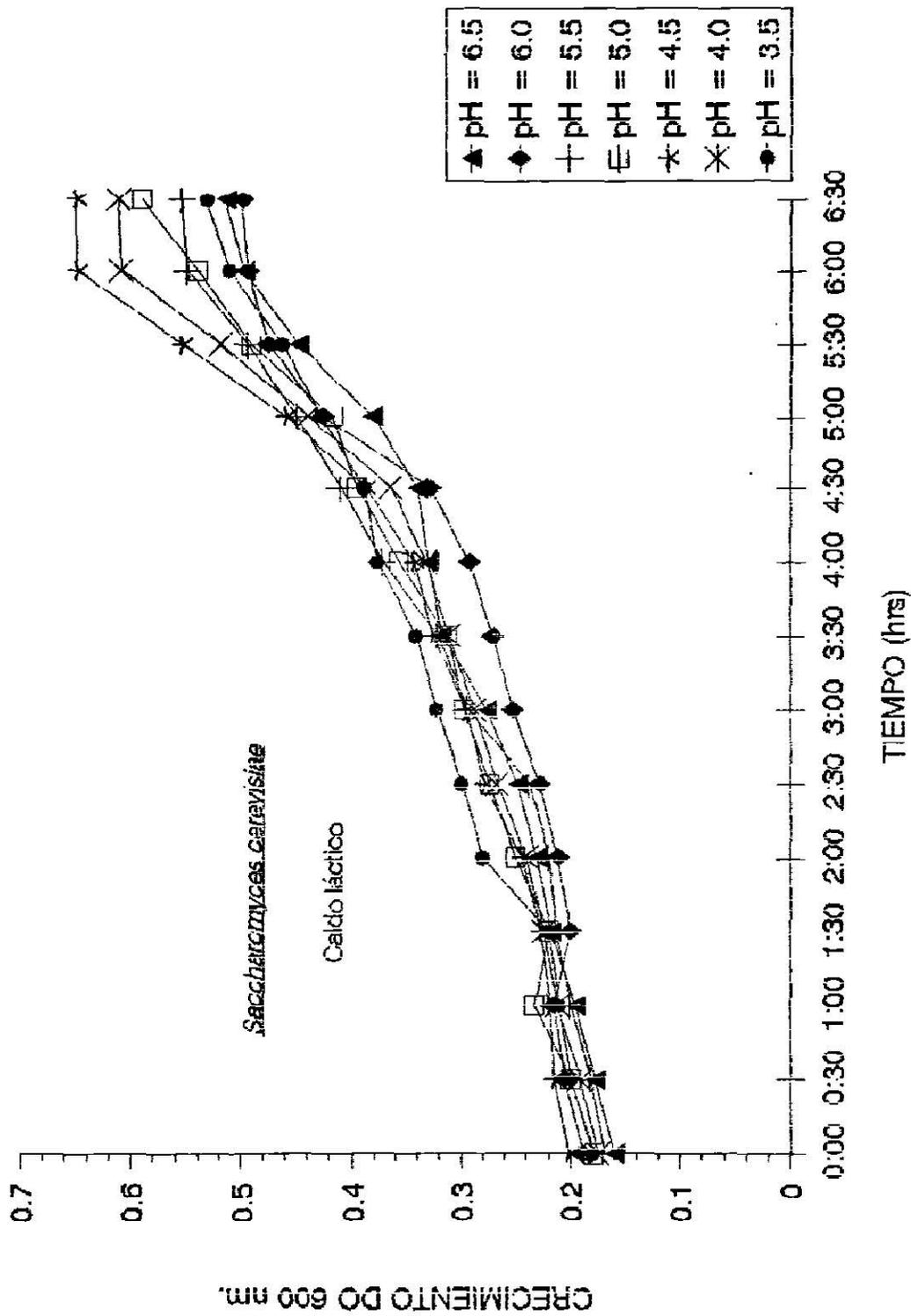


Fig. 13: Curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* aislada del jugo fermentado de manzana a temperatura ambiente y pH variable

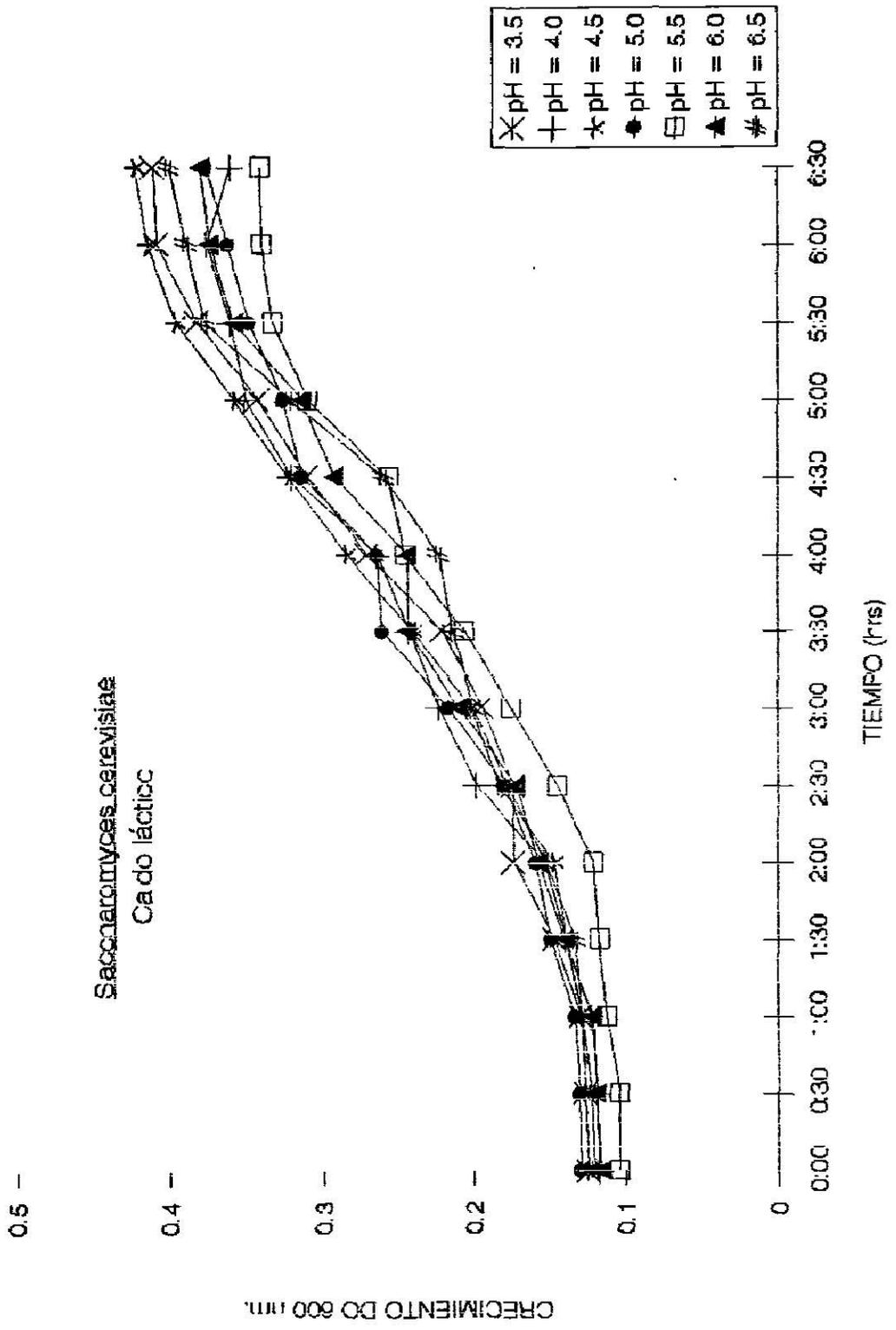
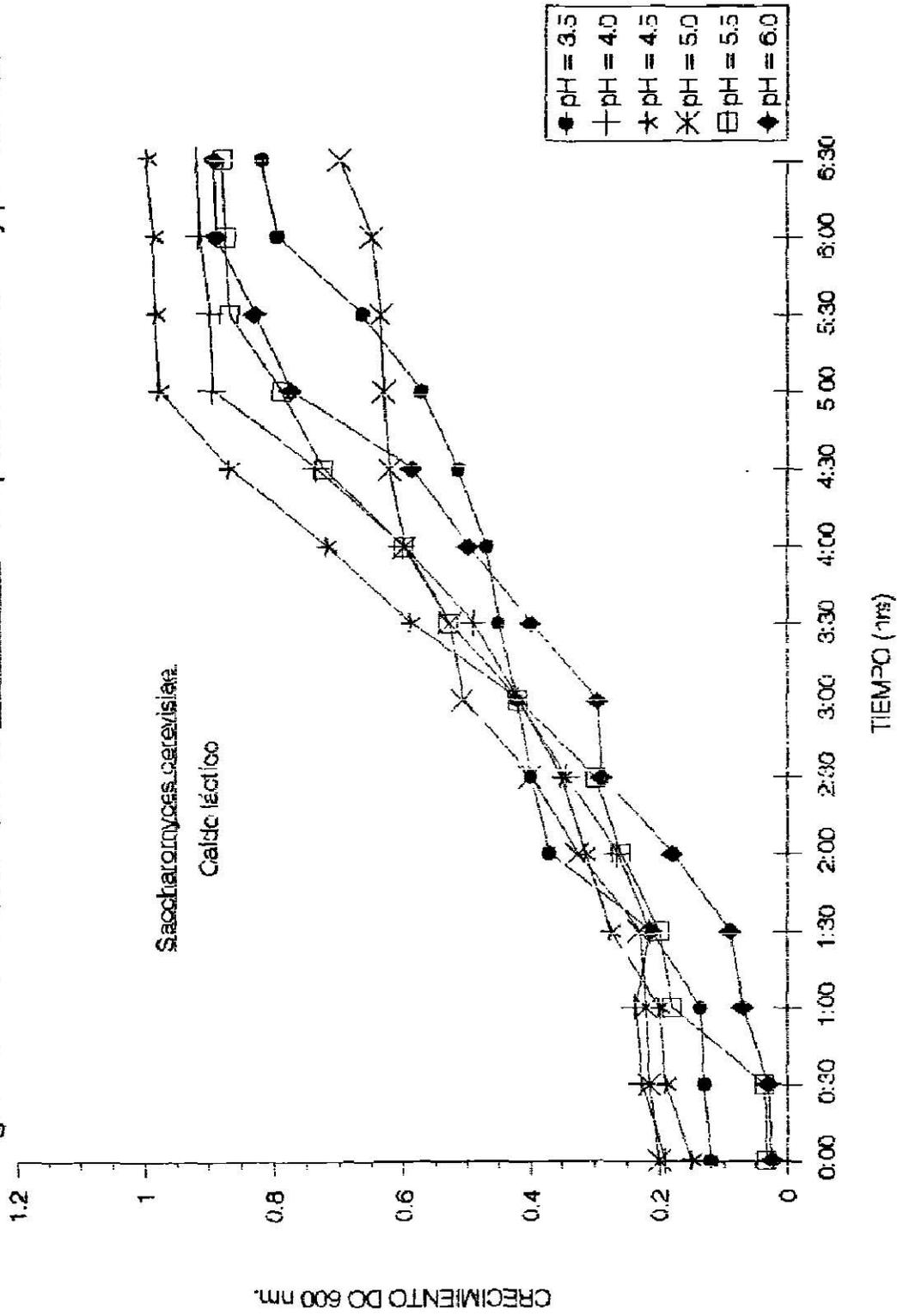


Fig. 14: Curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* a temperatura ambiente y pH variable.



En la figura 15 se representan las diferentes curvas de crecimiento de las cepas Saccharomyces cerevisea aislada del jugo fermentado de piña a pH óptimo de crecimiento, donde encontramos como temperatura óptima 30°C, pero a 25°C todavía hay una buena actividad de crecimiento.

La figura 16 nos muestra las curvas de crecimiento de la cepa Saccharomyces cerevisiae aislada del jugo fermentado de manzana a pH óptimo de crecimiento, en esta figura se nota que la temperatura óptima e de 25°C, aunque a 30°C hubo un buen crecimiento.

La figura 17 muestra las curvas de crecimiento de la cepa comercial testigo Saccharomyces cerevisiae, a pH óptimo de crecimiento, donde encontramos que la temperatura óptima de crecimiento es de 25°C, pero a 30°C todavía hay una buena actividad de crecimiento.

Fig. 15: Curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* aisladas del jugo fermentado de piña a pH de 4.5 y a temperatura variable.

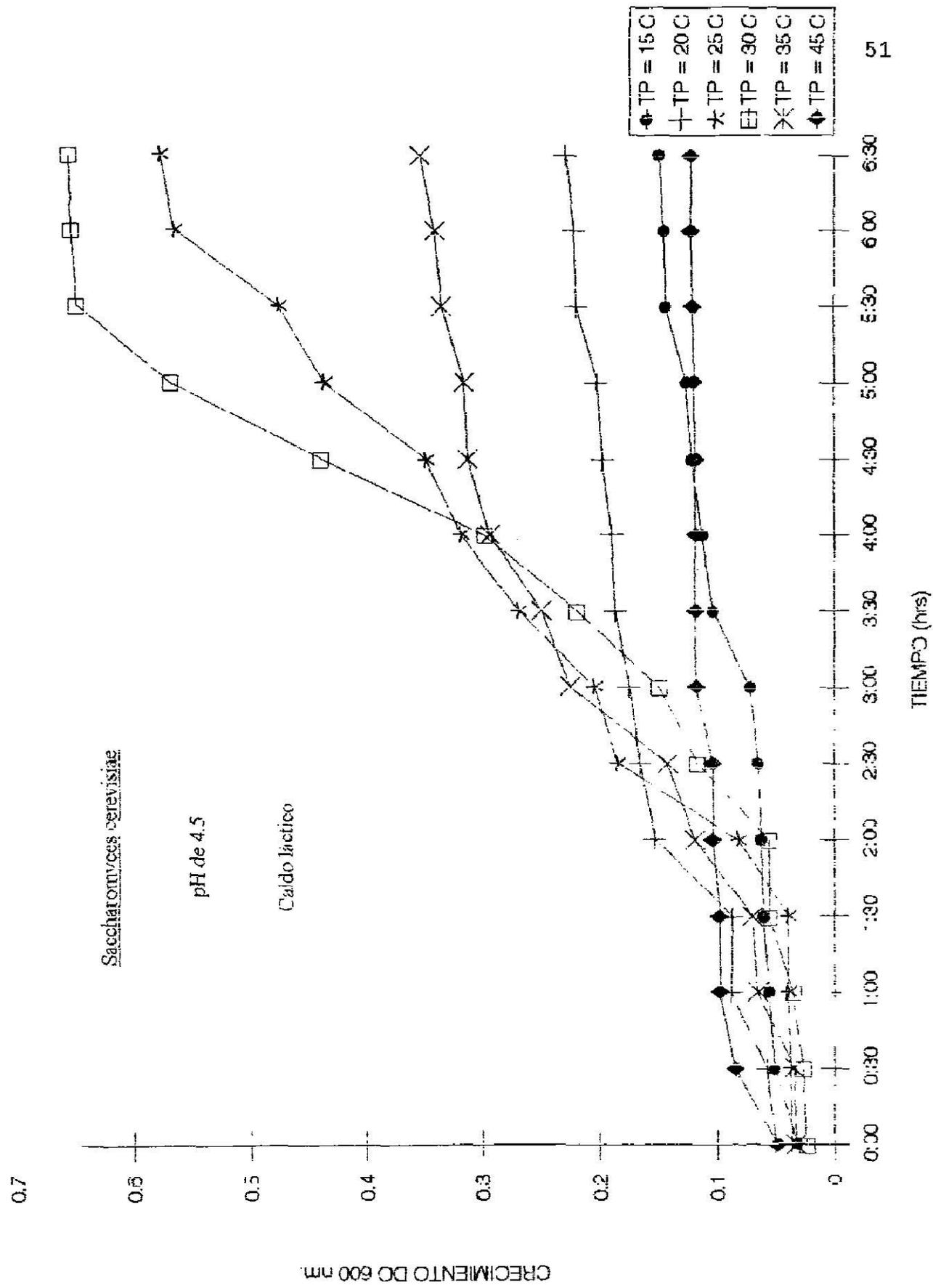


Fig. 16: Curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* a aislada del jugo fermentado de manzana a pH de 4.5 y a temperatura variable.

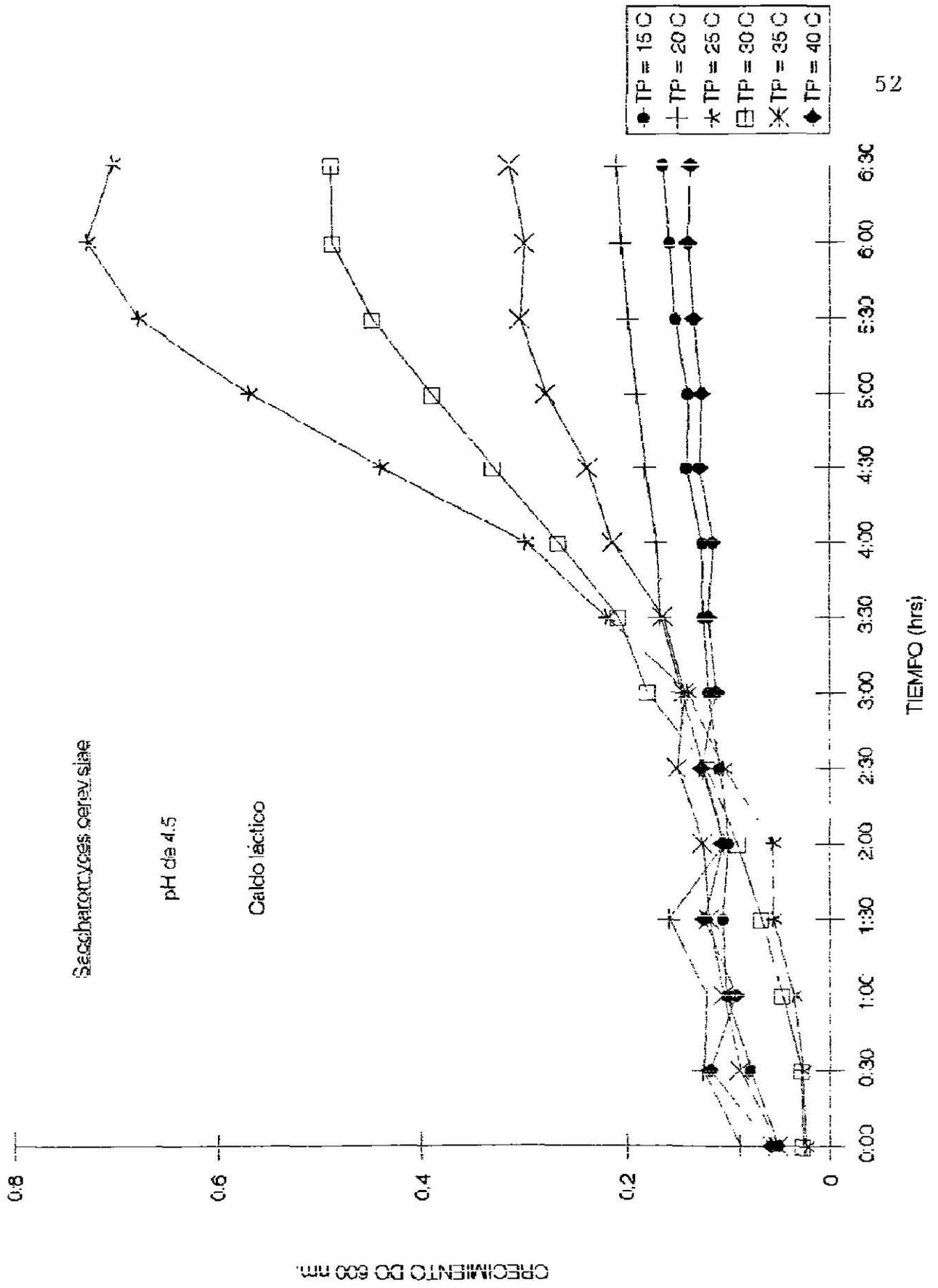
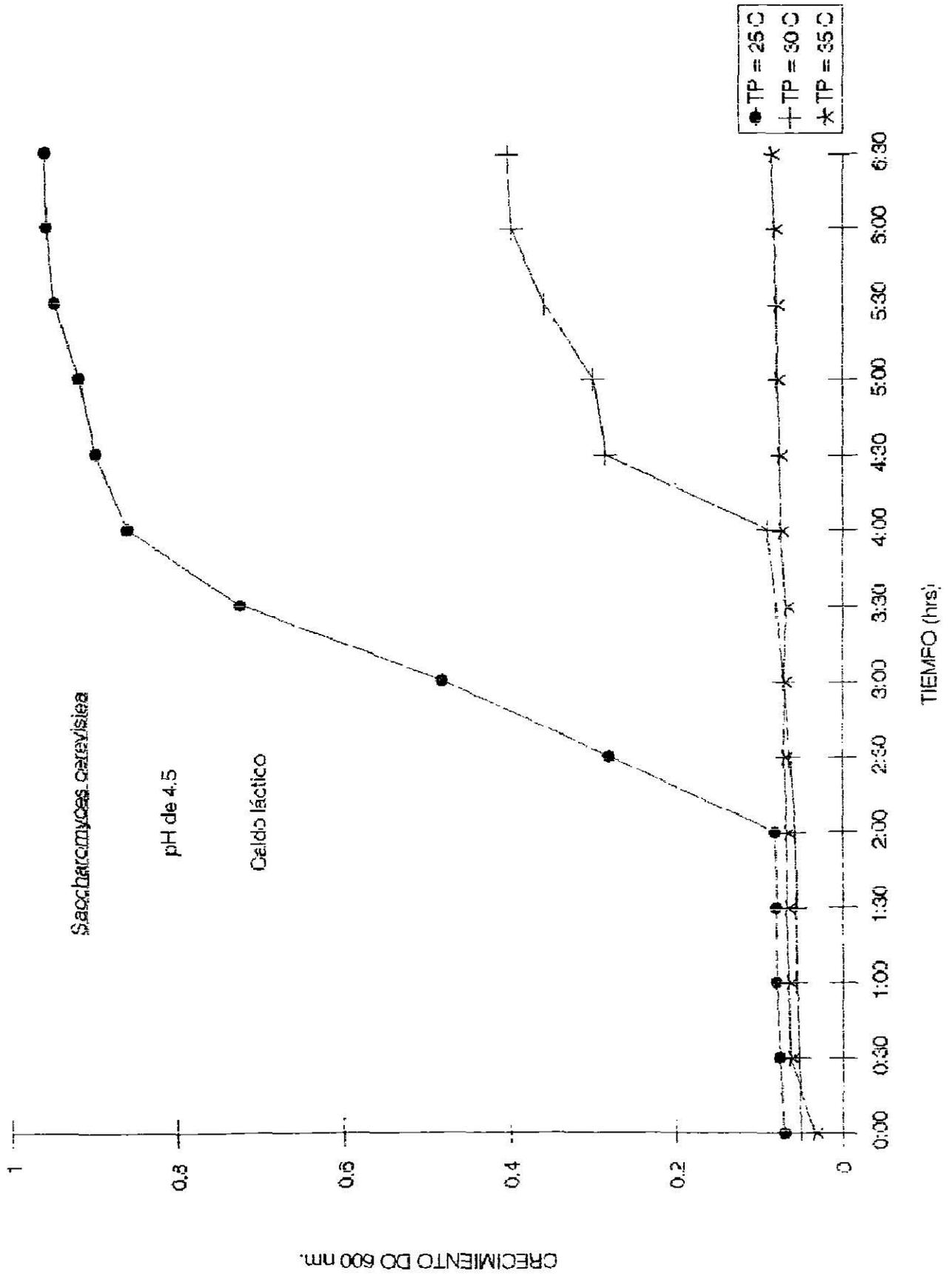


Fig. 17: Curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* a temperatura ambiente y a pH de 4.5.



A partir de estos parámetros óptimos de pH y temperatura obtuvimos el tiempo de generación o duplicación en minuto de cada levadura. Los resultados se muestran en la tabla No. 5

Tabla No. 5 Condiciones óptimas de crecimiento y tiempos de duplicación por minuto de las levaduras aisladas Saccharomyces cerevisiae.

Clave	Temp. ópt.	pH ópt.	Tiemp. de dupli. en minuto a pH óptimo	Tiemp. de dupli. en minuto a Temp. y pH óptimo
A1	30°C	4.5	100.	70.00
B1	25°C	4.5	99.03	76.02
C1	25°C	4.5	98.15	68.49

A1 = Levadura del fermentado de piña

B2 = Levadura del fermentado de manzana

C1 = Levadura comercial testigo

Los datos que se muestran en la tabla No. 5 se reafirma que la levadura comercial testigo es más eficiente, porque tiene un tiempo de generación más corto en minuto, que la levadura aislada del fermentado de piña y manzana.

4.5. Elaboración del vino

En la elaboración del vino se debe de tener mucha precaución en el control de la temperatura, cuando esta rebasa

los 30°C debe de enfriarse el mosto artificialmente y cuando la temperatura sobrepasa los 35°C se considera peligrosa, porque se inhibe la fermentación y esto da paso al crecimiento de bacterias, otro factor de suma importancia a considerar es el de utilizar frutas con un alto contenido de azúcar para disminuir los costos de producción y aumentar la rentabilidad.

En la tabla No. 6 se muestran las pruebas que se le hicieron a cada una de las muestras del vino, tales como densidad, acidez total, pH, grados brix y alcohol.

En las cepas Saccharomyces cerevisiae comercial testigo, y la cepa comercial Saccharomyces cerevisiae (E1), para panificación obtuvimos una concentración de 10.0 grados de alcohol, lo cual implica que son mejores que la cepa aislada del jugo fermentado de piña (A1), con 6.0 grados de alcohol, la cepa aislada del jugo fermentado de manzana (B1), con 5.0 grados de alcohol y la cepa Wikerhamia (D1), (obtenida del cepario de la facultad de Biología de la U.A.N.L., nos dio 2.0 grados de alcohol. Por otro lado también pusimos a fermentar el mosto de la fresa con sus propias levaduras silvestres, pero no se logro éxito, porque no obtuvimos alcohol. Estos resultados sugieren que las fermentaciones se efectúan mejor cuando se incluye el inóculo de la levadura adecuada productora de alcohol.

Los grados brix de vino están relacionados con la concentración de alcohol presente, porque a medida que las levaduras degradan los azúcares del mosto para su alimentación, estas producen alcohol etílico y gas carbónico.

La acidez del vino es de un rango 1.5 a 2.5, lo cual concuerda con la literatura revisada por Flores 1992. En cuanto a la densidad está dentro de los parámetros que se registran en los vinos de mesa.

Tabla No. 6 Resultados obtenidos del análisis del vino tratado bajo diferentes cepas de levaduras Saccharomyces cerevisiae.

Clave	Densidad	Acidez total	pH	grd. brix	% de Alcohol
A1	997	2.5	4.9	13.0	6.0
B1	990	2.7	4.8	15.0	5.0
C1	995	1.5	5.2	6.0	10.0
D1	995	1.4	5.4	5.8	10.0
E1	990	2.5	4.8	17.0	2.0
F1	---	1.5	5.0	19.5	---

V. CONCLUSIONES

Con los experimentos realizados podemos concluir lo siguiente: A partir del jugo fermentado de piña y manzana de frutas naturales, se aislaron dos cepas; mediante una serie de pruebas morfológicas, sexuales, de cultivo y fisiológicas (fermentación y asimilación de carbohidratos), podemos concluir que las dos levaduras aisladas son de Saccharomyces cerevisiae.

Los medios de cultivo que se utilizaron para el aislamiento de las dos cepas, fueron idóneos para nuestro propósito y fueron los siguientes: Caldo extracto de malta, extracto de levadura (YMB), y el medio sólido extracto de malta, extracto de levadura y agar.

Los medios de cultivo que mejor resultado dieron para la esporulación fue el agar jugo de tomate (V8), y el Worodkowa. Además también fue utilizado el medio de cultivo Wikerham para la identificación de la especie de las dos cepas aisladas, este fue idóneo para nuestro propósito.

En los parámetros de crecimiento evaluados en las levaduras aisladas del fermentado de manzana y la levadura comercial testigo se encontró que las condiciones óptimas de su desarrollo fueron a una temperatura de 25°C y a un pH de 4.5. Para la levadura aislada del fermentado de piña se encontró que su temperatura óptima fue a 30°C y a un pH de 4.5.

Las levaduras aisladas pueden ser utilizadas en un proceso de fermentación a nivel industrial, pero deben de ser bien controlados los parámetros que se mencionan en material y métodos, además se debe de hacer pruebas con diferentes mostos extraídos de frutas naturales. En nuestro caso utilizamos mosto extraído de la fresa, que dió resultados satisfactorios.

VI. RESUMEN

El objetivo principal de este trabajo fue aislar cepas de levaduras productoras de alcohol etílico a partir de jugos fermentados de frutas. El cual consiste en fermentar jugo de manzana (*Malus pumila*) y piña (*Ananas comosus*) en matraces de kitasato a temperatura ambiente, al mismo tiempo usamos como patron una cepa comercial liofilizada (Montrachet), para comparar nuestros resultados. Para el aislamiento se utilizó 0.1 ml del fermentado para ser inoculado en tubos de ensayo los cuales contienen un tubo durham invertido, dichos tubos contienen un caldo nutritivo YMB más 2 ml de penicilina y 3% de (v/v) de etanol, de los tubos que produjeron gas se toma una muestra para sembrarla en un medio sólido YMA. Posteriormente se hacen observaciones bajo el microscopio para determinar sus características morfológicas. Las cepas aisladas se sembraron en diferentes medios de cultivo para la formación de ascosporas, los cuales se mencionan en material y métodos.

Las condiciones óptimas de crecimiento para Saccharomyces cerevisiae aislada del fermentado de piña creció mejor a un pH de 4.5 y a una temperatura de 30°C y tardó un tiempo de generación de 70 minutos, Saccharomyces cerevisiae aislada del fermentado de manzana creció a un pH de 4.5 y a una temperatura de 25°C con un tiempo de generación de 76.02 minutos, Saccharomyces cerevisiae cepa comercial liofilizada encontramos un mejor crecimiento a un pH de 4.5 y a una temperatura de 25°C con un tiempo de generación de 68.49 minutos.

Para el proceso de fermentación se incluyeron seis cepas de levaduras en total y son las siguientes: Saccharomyces cerevisiae comercial liofilizada para vino (C1), Saccharomyces cerevisiae comercial para panificación (E1), en las cuales se obtuvieron 10 grados de alcohol, la cepa aislada del fermentado de piña (A1) con seis grados de alcohol, la cepa aislada del fermentado de manzana (B1) con cinco grados de alcohol, la cepa Wikerhamia (D1) obtenida del cepario de la Facultad de Ciencias Biológicas con dos grados de alcohol y por último las cepas silvestres del mosto de fresa, en la cual no obtuvimos alcohol.

VII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Berry C. J. J. 1987. Wine Making. 8ª Edición. Editorial Argus Books Limited.
- 2.- Brock T. D., D. W. Smith., M.T. Madigan. 1979. Biology of Microorganisms. Fourth Edition. Editorial Prentice Hall, INC., Englewood Cliffs, New York.
- 3.- Desrosier N. W. 1983. Elementos de tecnología de los alimentos. 5ª Edición. Editorial Continental, S.A. de C.V. México.
- 4.- Diaz J. J. J. 1984. El vino y la mesa. 3ª Edición. Editorial Continental, S.A. de C.V., México.
- 5.- Flores Hernández A. 1992. Producción de vino y aguardiente de tuna. Ciencia y Desarrollo CONACYT. Vol. 17 # 102. P. 65-96.
- 6.- Frazier W. C. 1978. Microbiología de los alimentos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza.
- 7.- Galan W. L. J., L. H. Morales. 1991. Manual de Microbiología Industrial. Laboratorio de Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias Biológicas U.A.N.L. AP. Postal # 63-F. Sn. Nicolás de los Garza N. L. México. p. 2.12.
- 8.- Garza P. S. N. 1985. Aislamiento de identificación de cepas nativas de Saccharomyces sp. Tesis de Licenciatura en Q.B.P. Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. P. 6-12.

- 9.- Gherna R.L., P. Gerhardt, R. Costilow, W. A. Wood, R.G.E. Murray, E.W. Nester, N. Krieg, G.B. Phillips. 1981. Manual of Methods for General Bacteriology. 2ª Edición. Ediciones American Society For Microbiology. Washinton.
- 10.- Hesseltine C. W. and W. C. Haynes. 1973. Sources and management of micro-organisms for the development of a fermentation industry. In Iditorial Microbiology. Richard W.T. (Editor). Editorial Dowden, Hutchinson Ross, INC. Stroudsburg, Pensylvania, U.S.A. P. 23-35. 1977.
- 11.- Hoff J. E. y J. Janick. 1975. Los alimentos. 1ª Edición. Editorial Herman Blume, Madrid. P. 213-223.
- 12.- Jorgensen A. 1959. Microbiología de las fermentaciones industriales. 7ª Edición. Editorial Acribia. Zaragoza.
- 13.- Lodder J., K. Van Rij, S.A. Meyer, C.P. Kurtzman, J.W. Fell, F. Sherman, G.R. Fink, C.W. Lawrence, G. Stewart 1989. Tercer curso internacional de topicos sobre taxonomía genética y conservación de las levaduras y su aplicación en biotecnología. Centro de investigación y de estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional. 1ª Edición. Editorial Almesa. Madrid.
- 14.- Magallón M. C. 1985. Efecto de la concentración de la glucosa sobre la producción de etanol de cepas silvestres de Saccharomyces sp. Tesis de Licenciatura

en Q.B.P. Facultad de Ciencias Biológicas U.A.N.L.

- 15.- Madrid V. A. 1987. Manual de enología práctica. 1ª Edición. Editorial Almesa. Madrid.
- 16.- Meyer R. M. , D. P. Gaetano, C. M. Figura. 1982. Control de calidad de Productos Agropecuarios. 1ª Edición. Editorial trillas, S.E.P. México. P. 33-44.
- 17.- Muñoz E. and W.M. Ingledew. 1989. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 55, # 6. P. 1560-1564.
- 18.- Mareca C. I. 1969. Enologia. 1ª Edición. Editorial Alhambra, S.A. Madrid. Buenos Aires México. P. 31-40.
- 19.- Pelczar M.J., R.D. Reid y E.C. Chan. 1982. Microbiología. 4ª Edición. Editorial Mc. Graw-Hill México. P. 271- 287.
- 20.- Peynaud E. 1977. Enología práctica. 1ª Edición. Ediciones Mundi. Madrid. P. 13-51, 119-132.
- 21.- Prescott C.S. y C. Gordon. 1962. Microbiología Industrial 3ª Edición. Editorial Aguilar. Madrid. P. 13-65.
- 22.- Reyes C. J. L., F. J. González. 1977. Técnicas para la elaboración de cultivadores de vid.
- 23.- Rhodes A. Y L. Fletcher Derek. 1969. Principios de Microbiología Industrial. 1ª Edición. Editorial Acribia. Zaragoza.
- 24.- Ribereau G. J. 1954. Transformaciones y tratamientos de vinos. 1ª Edición. Editorial Salvat. Barcelona, Madrid. P. 615-617.

- 25.- Salle A. J. 1943. Fundamental Principles de Bacteriologia.
Second Edición. Editorial Mc. Graw-Hill Book Company.
New York.
- 26.- Sánchez Marroquín A. 1961. Principios de Microbiología
Industrial. 1ª Edición. Editorial Química S. A.
de C.V.

