

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITATANA
UNIDAD IZTAPALAPA
"CASA ABIERTA AL TIEMPO"**

- CBS

TESIS PARA OBTENER LA MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

**CARACTERIZACION Y EVALUACION ENOLOGICA DE LA
LEVADURA: *Saccharomyces cerevisiae* VAR *chevalieri* AISLADA
DEL PULQUE.**

PRESENTA: PATRICIA RUIZ PEÑA

1999



Casa abierta al tiempo

54

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

IDONEA COMUNICACION DE RESULTADOS

CARACTERIZACION Y
EVALUACION ENOLOGICA DE
LA CEPA Saccharomyces
cerevisiae VAR. chavalieri
AISLADA DE PULQUE

En México, D.F. se presentaron a las 16:00 horas del día 29
del mes de JULIO del año 1999 en la Unidad
IZTAPALAPA de la Universidad Autónoma Metropolitana, los
suscritos miembros del Jurado.

M. EN C. SANTIAGO CAPELLA VIZCAINO;
M. EN C. LORENA GOMEZ RUIZ Y
M. EN C. JOSE MARIANO GARCIA GARIBAY

bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último
se reunieron a la presentación de la Idónea Comunicación de
Resultados para la obtención del Grado de

Maestra en: BIOTECNOLOGIA

de: PATRICIA RUIZ PEÑA

quien presentó una comunicacion de resultados, cuya denominación
aparece al margen y de acuerdo con el artículo 78 fracciones I, II, III
y V del Reglamento de Estudios Superiores de esta Universidad, los
miembros del Jurado resolvieron:

aprobarla

Acto continuo, el Presidente del Jurado comunicó al interesado el
resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la
protesta.



PATRICIA RUIZ PEÑA
FIRMA DEL INTERESADO

REVISO

DR. ANTONIO AGUILAR AGUILAR
DIRECCION DE SISTEMAS ESCOLARES

VISTO BUENO

DR. JOSE LUIS ARREDONDO FIGUEROA
DIRECTOR DE DIVISION

VOCAL

M. EN C. LORENA GOMEZ RUIZ

PRESIDENTE

M. EN C. SANTIAGO CAPELLA VIZCAINO

SECRETARIO

M. EN C. JOSE MARIANO GARCIA GARIBAY

Índice

pág

capítulo I

1.1 Introducción.....	4
1.2 Justificación.....	6
1.3 Objetivo general.....	7
1.3.1 Plan de trabajo.....	7

capítulo II ANTECEDENTES

2.1 Fenómeno zimocida.....	8
2.1.1 Clasificación de las levaduras zimocidas.....	8
2.1.2 La toxina zimocida y su modo de acción.....	9
2.2 Factores involucrados en la vinificación.....	10
2.2.1 Inóculo.....	10
2.2.1.1 Producción y tolerancia al etanol.....	11
2.2.1.2 Tolerancia al SO ₂	11
2.2.1.3 Tolerancia a altas concentraciones de azúcares fermentables.....	12
2.2.1.4 Temperatura.....	12
2.2.2 Otros.....	13
2.2.2.1 Norma Oficial Mexicana.....	13
2.2.3 Calidad sensorial de los vinos.....	13
2.2.3.1 Sabor y aroma del vino.....	14
2.2.3.2 Evaluación Sensorial.....	15
2.2.3.3 Compuestos responsables.....	15

capítulo III METODOLOGIA

3.1 Resistencia de la <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>chevalieri</i> a levaduras zimocidas.....	20
3.1.1 Microorganismos.....	20
3.1.2 Conservación de cepas.....	21
3.1.3 Propagación.....	21
3.1.4 Determinación de crecimiento.....	21
3.1.5 Detección de la sensibilidad de la cepa de estudio a los factores aniquilantes.....	21
3.2 Caracterización de la levadura de estudio.....	22
3.2.1 Propagación de la levadura.....	22
3.2.2 Determinación del crecimiento.....	22
3.2.3 Tolerancia al etanol.....	22
3.2.4 Determinación del pH óptimo de crecimiento.....	22
3.2.5 Crecimiento a altas concentraciones de azúcar.....	23
3.2.6 Tolerancia a altas temperaturas.....	23

3.2.7 Resistencia al metabisulfito de sodio.....	23
3.3 Proceso de vinificación.....	24
3.3.1 Técnicas analíticas en mostos y vinos.....	24
3.3.2 Variedad de uvas utilizadas.....	24
3.3.3 Preparación del inóculo.....	24
3.3.4 Diseño de tratamientos.....	25
3.3.5 Proceso de vinificación de uvas blancas.....	25
3.3.6 Proceso de vinificación de uvas tintas.....	26
3.4 Determinación de la calidad fisicoquímica de los vinos elaborados con respecto a la NOM.....	28
3.4.1 Determinación de etanol.....	28
3.4.2 Determinación de acidez total.....	28
3.4.3 Determinación de acidez volátil.....	28
3.4.4 Determinación del contenido de azúcares reductores directos.....	28
3.5 Evaluación Sensorial.....	29
3.5.1 Mantenimiento de jueces.....	29
3.5.2 Descripción del sabor y aroma.....	29
3.5.3 Definición de atributos.....	29
3.5.4 Evaluación.....	30
3.6 Perfiles Cromatográficos.....	31
3.6.1 Preparación de las muestras.....	31
3.6.2 Obtención de perfiles cromatográficos.....	31
3.7 Espectrometría de Masas.....	31

capítulo IV RESULTADOS

4.1 Resistencia de la <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>chevalieri</i> a levaduras zimocidas.....	31
4.2 Caracterización de la levadura de estudio.....	32
4.2.1 Tolerancia al etanol.....	33
4.2.2 Determinación del pH óptimo de crecimiento.....	33
4.2.3 Crecimiento a altas concentraciones de sustrato.....	34
4.2.4 Tolerancia a altas temperaturas.....	34
4.2.5 Resistencia al metabisulfito de sodio.....	34
4.2 Proceso de vinificación.....	35
4.4 Determinación de la calidad fisicoquímica de los vinos elaborados con respecto a la NOM.....	42
4.4.1 Determinación de etanol.....	42
4.4.2 Determinación de acidez total.....	42

4.4.3 Determinación de acidez volátil.....	43
4.4.4 Determinación del contenido de azúcares reductores directos.....	43
4.5 Evaluación Sensorial.....	
4.5.1 Atributos Generados.....	45
4.5.2 Atributos a analizar.....	47
4.5.3 Resultados de la evaluación sensorial.....	47
4.5.4 Análisis Estadístico.....	
4.5.4.1 Hipótesis.....	49
4.5.4.2 Análisis de Varianza.....	49
4.6 Perfiles Cromatográficos.....	
4.6.1 Cromatografía de Gases.....	58
4.7 Espectrometría de Masas.....	62

capítulo V ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1 Resistencia de la <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>chevalieri</i> contra levaduras zimocidas.....	64
5.2 Caracterización de la levadura de estudio.....	
5.2.1 Tolerancia al etanol.....	64
5.2.2 Determinación del pH óptimo de crecimiento.....	64
5.2.3 Crecimiento a altas concentraciones de sustrato.....	64
5.2.4 Tolerancia a altas temperaturas.....	65
5.2.5 Resistencia al metabisulfito de sodio.....	65
5.3 Proceso de vinificación.....	65
5.4 Determinación de la calidad fisicoquímica de los vinos elaborados con respecto a la NOM.....	
5.4.1 Determinación de etanol.....	66
5.4.2 Determinación de acidez total.....	66
5.4.3 Determinación de acidez volátil.....	66
5.4.4 Determinación del contenido de azúcares reductores directos.....	66
5.5 Evaluación Sensorial.....	67
5.6 Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas.....	68

capítulo VI

CONCLUSIONES.....	69
BIBLIOGRAFIA.....	71

capítulo I

1.1 INTRODUCCION

Una de las industrias biotecnológicas más importantes en países como Francia, Japón, Australia, Nueva Zelanda, Argentina, España, Chile, Checoslovaquia, Estados Unidos, Alemania por mencionar algunos y por supuesto México, es la vinícola. En la producción de vinos es esencial un proceso de fermentación el cual es susceptible de sufrir una prolongación o detención, lo cual provoca que el producto final no cumpla con los objetivos de calidad de su elaboración además de las pérdidas económicas que se producen.

Para encontrar las causas de esta detención en las fermentaciones se han realizado estudios sobre los factores y combinaciones de éstos que pueden contribuir al problema (por ejemplo el oxígeno presente, nutrientes, temperatura, etc.).

Dentro de esta búsqueda se ha encontrado un fenómeno de antagonismo microbiano, que tiene grandes implicaciones en las fermentaciones prolongadas (Ribéreau-Gayon, 1985). Este antagonismo se debe a la producción de toxinas por ciertas levaduras llamadas aniquilantes o zimocidas (en inglés "killer") que resultan letales para levaduras sensibles (Van Vuuren y Jacobs, 1992).

Este fenómeno fue descubierto en cepas de *Saccharomyces cerevisiae* por Bevan y Makower en 1963, quienes propusieron que las cepas podrían ser clasificadas en uno de tres fenotipos: zimocida o aniquilante (killer), sensible y resistente o neutra. Cuando se ponen a crecer las células zimocidas con las sensibles, encontramos una gran proporción de las últimas, muertas. Las células neutras o resistentes no sufren ningún cambio (Woods, y Bevan, 1968).

Estudios posteriores, demostraron la presencia de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* con actividad zimocida en las fermentaciones espontáneas de vinos, en varias regiones vitivinícolas del mundo con resultados muy variables de la presencia tanto de cepas sensibles a este factor zimocida, como cepas resistentes y cepas neutras.(Kitano, et al, 1984 Heard y Fleet, 1987 Radler y Schmitt, 1987).

Además de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, se han reportado cepas de otros géneros, como *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Torulopsis* y *Ustilago*; éstas se han encontrado en vinos (Heard y Fleet, 1987), pero también se han encontrado en cerveza (Young, 1987)(Philliskirk y Young, 1975), pulque (Estrada, 1996), en aceitunas (Marquina, et al, 1992), en agua (Vadkertiová, R. y Sláviková, E. 1995) por mencionar algunas fuentes.

Se han encontrado levaduras zimocidas por ejemplo en un 27% de mostos de vinos japoneses y en el mismo porcentaje en racimos de uvas putrefactos; en Francia hay grandes diferencias en los porcentajes, ya que en cada región vitivinícola se ha encontrado desde 0% hasta 100% de levaduras

zimocidas en la flora nativa enológica. En Uruguay, Brasil y Argentina también se han encontrado levaduras de los tres fenotipos (Estrada, 1996, Vázquez y Toro, 1994).

En un estudio previo de aislamiento e identificación de levaduras zimocidas del pulque y aguamiel, se aisló e identificó una levadura que presentaba resistencia a la exposición de dos cepas zimocidas de colección: *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 738 que produce la toxina K₂ y *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 que produce la toxina K₆; la levadura se identificó como *Saccharomyces cerevisiae* var. *chevalieri* (Estrada, 1996), la cual resulta relevante ya que ésta podría ser inoculada en un mosto de uvas siempre y cuando no altere las propiedades químicas y sensoriales del vino y no sea eliminada por una levadura silvestre aniquilante. De hecho cepas resistentes de esta especie se encuentran presentes en mostos de uvas para vinificación.

1.2 JUSTIFICACION

La producción de vino en diversos países involucra la inoculación del mosto de uva con cultivos de levadura puros que limitan el crecimiento de levaduras indeseables y permiten tener un mejor control de la fermentación. Las fermentaciones se llevan a cabo con mostos no estériles, por lo cual son muy susceptibles a ser contaminadas por la flora asociada a las propias uvas o durante el proceso de elaboración por el equipo utilizado.

El interés enológico de las levaduras aniquilantes radica en el hecho de que esas levaduras, cuando están presentes, pueden dominar la fermentación vínica inicialmente inoculada con levaduras sensibles; de hecho en la industria se utilizan cepas de colección que han sido cuidadosamente propagadas en medios estériles y que nunca han tenido la necesidad de competir en medios con toxinas o con algunos otros factores producidos por flora contaminante que disminuyan o inhiban su crecimiento, por lo que nunca han generado ningún mecanismo de defensa en contra de estos medios adversos.

La consecuencia de contaminaciones con cepas aniquilantes indeseables resulta en problemas tales como fermentaciones prolongadas, altas concentraciones de ácidos volátiles, producción de H_2S y aromas desagradables, acetaldehído y ácido láctico, así como reducción de la producción de etanol.

Por el interés de no disminuir la calidad del vino ni aumentar los costos que trae el no conseguir una fermentación idónea, se propone el uso de una levadura que sea resistente a las toxinas producidas por levaduras aniquilantes y además que contribuya a obtener las características necesarias para un buen vino.

1.3 OBJETIVO GENERAL

- Caracterización y evaluación del potencial enológico de la levadura identificada como *Saccharomyces cerevisiae* var. *chevalieri* aislada de pulque resistente a toxinas producidas por cepas aniquilantes.

1.3.1 Plan de Trabajo.

- Probar su resistencia contra diez levaduras zimocidas.
- Caracterización de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* var. *chevalieri* aislada del pulque en términos de los siguientes aspectos:
 - Tolerancia al etanol.
 - pH de crecimiento.
 - Tolerancia a altas concentraciones de sustrato.
 - Tolerancia al metabisulfito de sodio.
 - Tolerancia a altas temperaturas.
- Elaboración de vinos a partir de uvas blancas y uvas tintas con diferentes tratamientos.
- Evaluación de la calidad fisicoquímica de los vinos elaborados.
- Evaluación sensorial de los vinos elaborados.
- Perfiles cromatográficos de los componentes volátiles de los vinos, por Cromatografía de Gases e identificación de los posibles componentes por Espectrometría de Masas.

capítulo II

ANTECEDENTES

2.1 FENOMENO ZIMOCIDA

El factor zimocida está asociado a un micovirus que cuenta con dos genomas de doble-hélice de RNA (dhRNA) uno medio (M) y uno largo (L); el M codifica para la toxina y para la inmunidad de este polipéptido, mientras que el L codifica para la proteína que cubre los micovirus (Tipper, y Bostian, 1984). Usualmente esos virus son ventajosos para la célula, aunque en algunas condiciones especiales podrían resultar patogénicos.

Análisis genéticos del fenómeno zimocida en cepas de laboratorio de *Saccharomyces cerevisiae*, revelaron que el rasgo distintivo fue una herencia de forma no-Mendeliana; y que además, el carácter zimocida se transfiere durante el proceso de citoducción, donde sólo ocurren mezclas citoplasmáticas (Young, 1987).

Tanto los dh-RNA L, como los M, se encuentran encapsulados como partículas virales. Esas partículas son isoméricas y tienen un diámetro de 33-40 nm. Se sabe también que esta encapsulación es necesaria para su mantenimiento y expresión (Hopper et al, 1977).

2.1.1 Clasificación de las levaduras zimocidas.

Se han encontrado 11 tipos de espectro de actividad zimocida (K_1 a K_{11}) y once tipos de espectros de resistencia. La expresión del carácter zimocida por todas las cepas zimocidas resulta de la síntesis y excreción de la toxina zimocida. La identificación de las toxinas se ha logrado hacer de diferentes maneras: por determinación del espectro de actividad contra cepas sensibles, por ensayos de actividad contra mutantes resistentes a ciertas toxinas, por determinación de la estructura de la toxina y por ensayos de reactividad cruzada de la toxina y los organismos que la producen (interacción entre cepas). De esta última forma de determinación, Young y Yagiu (1978), clasificaron 20 cepas de levaduras aniquilantes identificadas por Philliskirk y Young (1975) ensayando sus interacciones, pero sólo existen hasta el momento 11 tipos de toxinas. La K_{11} la asignaron Bussey y Skipper (1975) incluyendo estudios de Rogers y Bevan (1978), y esta es de *Torulopsis glabrata* ATCC 15126. De las cepas aniquilantes en general existen varias cepas con carácter zimocida idéntico, es decir sintetizan toxinas idénticas.

En general todas las cepas de colección de *Saccharomyces cerevisiae* presentan un fenotipo zimocida K_1 . Las de tipo K_2 contaminan fermentadores usados en la industria cervecera y en vinícola y existe una cepa de fenotipo K_3 , *Saccharomyces capensis* NCYC 761, la que difiere de la K_2 en que no resulta zimocida en *Saccharomyces uvarum* NCYC 190 (Young, 1987).

2.1.2 La toxina zimocida y su modo de acción.

Síntesis y maduración de la protoxina.

Existen evidencias genéticas que claramente demuestran que el dhRNA-M es determinante tanto para la producción de la proteína como para la inmunidad de la levadura. Estudios recientes determinan que el precursor de la proteína o protoxina, también le confiere inmunidad a la levadura (Boone, *et al.*, 1986). Esta protoxina puede actuar como inhibidor competitivo de la toxina madura, saturando un receptor de la membrana celular que normalmente media la acción de la toxina, y es así como ejerce su acción de inmunidad.

En un inicio se forma la protoxina, que posteriormente se convierte en la toxina por medio de la acción de una endoglucosidasa H. Esta glucosilación es necesaria para una eficiente excreción de la toxina. Mediante un mapeo de péptidos de la protoxina se encontró que primero tiene un peso molecular de 43 000 Da y después se convierte a uno de 34 000 Da, el cual contiene todos los aminoácidos de la toxina. Se propone que una de las hebras del dhRNA-M, se traslada al retículo endoplasmático donde es llevada por un secuenciador N-terminal y la protoxina se glucosila hasta el peso molecular de 43 000 Da. Este pasa a través del aparato de Golgi en vesículas secretoras donde ocurre la división proteolítica y se forma la toxina unida con disulfuros α y β . La protoxina tiene un componente γ , que es el sitio de glucosilación, y se postula que permanece en la membrana celular donde confiere inmunidad a la toxina secretada. (Young, 1987).

Toxinas zimocidas.

La toxina activa K_1 de *S. cerevisiae*, es una proteína de bajo peso molecular que consiste en dos subunidades, una de 9.5 kDa y otra de 9 kDa. Es una proteína glucosilada con enlaces disulfuro y contiene 109 residuos de aminoácidos. Es estable en un pH entre 4.2 y 4.6 a 30°C (Bussey, 1981). Kurzweilová y Sigler en 1993, reportaron que a 4°C la toxina K_1 retiene su actividad a pH entre 3 y 6, por varios días.

La toxina K_1 es secretada al medio durante la fase exponencial de crecimiento (Palfrey y Bussey, 1979).

La toxina K_2 de *S. cerevisiae*, es producida por una levadura vinica heterotática (Extremera y Montoya, 1980). Esta es una glucoproteína con un peso molecular de 16 000 Da, es activa en un pH entre 2.8 y 4.8, pero es óptima a un pH entre 4.2 y 4.4 (Pfeiffer y Radler, 1984). Aunque Michalcáková *et al.*, (1991), encontraron que tiene su máxima eficiencia entre un pH de 3.5 y 4.0, a 22°C.

Modo de acción de la toxina K_1 .

Una vez que la toxina se secreta al medio, es absorbida por un glucano de la pared celular (β -(1-6) D-glucano) de una célula sensible, posteriormente se liga a un receptor de la membrana celular el cual se daña, (este paso es demandante de energía) provocando la liberación de iones K^+ , ATP y otros metabolitos, lo que destruye el gradiente de pH de la membrana. (De la Peña *et al.*, 1981). Todos esos eventos provocan la inactivación de las células sensibles (Radler y Schmitt, 1987).

Una observación importante es que las células sensibles en la fase exponencial de crecimiento, son más susceptibles a la acción de la toxina que cuando están en la fase estacionaria de crecimiento.

El máximo deterioro sobre las levaduras se tiene después de dos a tres horas de exposición a la toxina, dependiendo de ésta (Skipper y Bussey, 1977).

2.2 FACTORES INVOLUCRADOS EN LA VINIFICACION.

2.2.1 Inóculo

No es hasta que Louis Pasteur demuestra entre 1857 y 1876 que las levaduras son las responsables de la transformación de carbohidratos a etanol y CO_2 cuando se conoció la verdadera causa de la aparición de alcohol en el mosto de uva.

Además de la fermentación alcohólica, en la elaboración de los vinos están involucrados otros mecanismos metabólicos que contribuyen de manera importante a la adquisición de las características sensoriales particulares.

2.2.1.1 Producción y tolerancia al etanol.

El etanol es un componente antimicrobiano, ya que en el caso de la fermentación espontánea de los mostos de uvas se encuentra una sucesión de microorganismos debida en alguna forma a la tolerancia que cada uno de ellos tenga al etanol. Se ha reportado que en la tolerancia al etanol de las levaduras influye la composición del medio, sobre todo la existencia de lípidos (Rose, A., 1987). El mayor efecto tóxico del etanol se da en la membrana celular. El grado de inhibición es relativo a otros factores ambientales como la temperatura o la concentración de sustrato (Jones, *et al*, 1981).

Se ha reportado que *Saccharomyces cerevisiae* var. *chevalieri* que produce hasta 18.3%(v/v) de etanol, y que está dentro de las principales responsables de la fermentación alcohólica en vinos con fermentaciones "espontáneas" o "naturales" (sin inóculo) (Farkâs, 1988); también se ha reportado que en vinos tintos checos se encuentra pero en un bajo porcentaje, aproximadamente en un 1% (Oreglia, 1978); en vinos franceses se encuentra en mayor proporción (85%) después de *S. ellipsoideus* y fundamentalmente en la región de Burdeos.

A continuación se reproduce una tabla donde se concentran diferentes especies de *Saccharomyces* de acuerdo a su capacidad de producir etanol (Tabla 1); aquí podemos observar que *S. cerevisiae* var. *chevalieri* produce entre 11.2 y 18.3% (V/V) de etanol y es la segunda especie más productora después de *S. oviformis* (*S. bayanus*), por lo que se recomienda su uso como cultivo puro.

TABLA 1. Habilidad de producir etanol de varias especies de *Saccharomyces*.

Fuente: Farkás, 1988.

Habilidad para producir etanol		
Especie de levadura	Grado mínimo	Grado máximo
<i>S. bailii</i>	8.0	12.6
<i>S. chevalieri</i>	11.2	18.3
<i>S. ellipsoideus</i>	8.0	16.8
<i>S. fermentati</i>	4.3	9.1
<i>S. florentinus</i>	8.1	9.0
<i>S. heterogenicus</i>	9.2	18.2
<i>S. italicus</i>	12.6	17.0
<i>S. oviformis</i>	11.9	18.4
<i>S. rosei</i>	7.8	13.0
<i>S. uvarum</i>	7.2	9.9

2.2.1.2 Tolerancia al SO₂.

El dióxido de azufre o anhídrido sulfuroso es utilizado desde los Egipcios y después por los Romanos, para evitar la contaminación bacteriana, especialmente con bacterias acéticas. No se conoce exactamente el mecanismo de resistencia de algunos microorganismos, pero se sabe que es más eficiente sobre bacterias y que además su actividad antimicrobiana depende del pH del medio siendo más eficiente a pH ácidos (Rose, 1987).

El SO₂ es un compuesto extremadamente reactivo que interacciona con componentes celulares, pero en dosis de 10 a 100 veces mayores que las que se adicionan a las bebidas, desamina residuos de citosina, rompe puentes disulfuro de proteínas, convierte la metionina en sulfóxido de metionina y reacciona con NAD⁺, tiamina y fosfato de piridoxal. En el caso de las especies de *Saccharomyces cerevisiae*, una concentración de 1mM y pH por abajo de 4, causa un rápido decremento del ATP lo cual provoca la muerte celular, el efecto puede ser reversible si se aleja a las células de la exposición del sulfuroso antes de una hora (Rose, 1987).

Existen cepas más resistentes que otras, lo cual se cree que puede ser causado por las diferencias en composición de las membranas plasmáticas y en la fácil difusión del sulfuroso a la célula. El pH interno en muchas levaduras está alrededor de 6.5 así que una vez que el sulfuroso entra a la célula se convierte en ion bisulfito, lo cual provoca que se difunda más sulfuroso dentro de la célula (Rose, 1987).

Oreglia (1978) reporta que la especie *Saccharomyces cerevisiae* var. *chevalieri* es muy poco resistente al sulfuroso.

2.2.1.3 Tolerancia a altas concentraciones de azúcares fermentables.

La composición del mosto y la calidad del material que va a ser fermentado repercutirán en el producto, especialmente en vinos. Dentro de los aspectos más importantes en la elaboración de los vinos está la concentración de azúcares y acidez presentes en el momento de la cosecha, la región de que se trate y las condiciones climáticas que se dieron durante ese año.

En regiones como Querétaro México se obtienen mostos de uvas de aproximadamente 200g/l de azúcares fermentables, aunque esto depende de las condiciones meteorológicas de ese año de cosecha, pero hay regiones donde se obtienen hasta 300g/l (Margarith, 1981), de un pH alrededor de 4 (Amerine, 1976) y el grado de alcohol que se debe alcanzar está entre los 10-12° GL.

De acuerdo a lo reportado por Farkâs (1988) *Saccharomyces cerevisiae* var. *chevalieri* es una levadura que se encuentra frecuentemente en los mostos de uvas sobre todo tintas y fermenta glucosa, galactosa y sacarosa.

2.2.1.4 Temperatura

La temperatura influye en la actividad de las levaduras, dado que se pueden provocar cambios morfológicos (Watson, 1987), se puede producir una interrupción en la síntesis de esterol y ácidos grasos y también si la temperatura es la máxima tolerable por la levadura puede causar desestabilización de la membrana plasmática (Jones, *et al*, 1981).

En el caso de las levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* se ha reportado que tiene un crecimiento máximo entre 28 y 35°C, y que crece solo hasta 40°C (Jones *et al*, 1981).

Se ha observado que en condiciones aerobias, las levaduras se propagan siguiendo la Ley de Arrhenius. Sin embargo, en condiciones anaerobias ésta no se cumple, ya que el efecto tóxico del etanol aumenta con la temperatura (Rose, 1987). Esto se explica si se considera que en la etapa inicial de la fermentación de *Saccharomyces cerevisiae*, las velocidades de crecimiento microbiano y de formación de etanol se estimulan por las altas temperaturas (25-40°C), pero finalmente tanto la concentración de células como la producción de etanol, se ven severamente deprimidas al ejercer ese producto un efecto inhibitorio sobre las enzimas, el cual es menos intenso a bajas temperaturas. Por esa razón se pueden obtener rendimientos alcohólicos más elevados cuando se fermenta a temperaturas menores a 25 °C en procesos prolongados.

Una fermentación de temperatura uniforme y controlada reduce las mermas de alcohol y de bouquet, además de retrasar la autólisis de las levaduras. La fermentación fría (4-10 °C) inhibe el crecimiento bacteriano, pero el rendimiento alcohólico es inferior al de temperatura óptima cuando no se incrementa el período de fermentación.

La formación de compuestos secundarios de la fermentación, como alcoholes superiores y ésteres, también se incrementa con las temperaturas altas de fermentación, lo que contribuye a la modificación de los rendimientos y de las características sensoriales del vino.

2.2.2 Otros

Otros factores que influyen en la obtención de vinos de calidad es la variedad de uva y grado de maduración de ésta, las condiciones agrotécnicas y climáticas como el suelo, agua, el sol que prevaleció durante ese año de cosecha, las técnicas empleadas para extracción del mosto, el transporte de éste, el tipo de fermentación (contenedores, extracción de color de la piel de la uva, grado de sulfitación), la finalización del proceso de fermentación, la fortificación o mejoramiento del producto, las

fermentaciones secundarias y finalmente el tipo de añejamiento (botellas o contenedores de madera) y por último las condiciones de almacenamiento (Margalith, 1981).

2.2.2.1 Normas Oficiales

Los vinos elaborados deben permanecer dentro de lo que las normas oficiales de cada país estipulan. Para el caso de México tenemos que la Secretaría de Comercio y Fomento Industrial en la Norma Oficial NOM-V-12-1986 de Bebidas Alcohólicas-Vinos establece las siguientes especificaciones químicas:

	MINIMO	MAXIMO
Grado alcohólico G.L.	8.5	14.0
Acidez total (como ácido tartárico g/L)	4.5	10.0
Acidez volátil (como ácido acético g/L)		1.2
Vino seco: azúcares reductores (g/L)		10.0

2.2.3 Calidad Sensorial de los vinos.

2.2.3.1 Sabor y aroma del vino.

El sabor y aroma de un vino pueden ser considerados los factores más importantes de su calidad. El sabor es el resultado de la interacción de los constituyentes químicos con los sentidos del olfato y del gusto del consumidor, que se debe por una parte, a compuestos volátiles, responsables de su olor, y por otra parte, a sustancias no volátiles, las cuales producen las diferentes sensaciones gustativas (dulzura, acidez, amargura y salado).

La detección sensorial de los compuestos presentes en los vinos, depende de los umbrales de percepción humana y de las concentraciones en que estén presentes. Generalmente los compuestos volátiles pueden ser percibidos en muy bajas concentraciones, ya que nuestros órganos sensoriales son extremadamente sensibles a ciertas sustancias aromáticas (los umbrales varían entre 10^{-4} y 10^{-8} g/L)(Guadagni, *et al*, 1963).

En muchas ocasiones la detección y apreciación sensorial no aporta un juicio objetivo, lo que lleva a una evaluación deficiente; además, el vocabulario utilizado puede resultar confuso debido a que una definición o una palabra no se interpreta de la misma forma en los diferentes países vinícolas (Santillán, 1995).

2.2.3.2 Evaluación Sensorial.

La evaluación sensorial es una disciplina científica que se emplea para evocar, medir, analizar e interpretar reacciones de aquellas características de los alimentos y otros materiales según como sean percibidos por los sentidos de la vista, el olfato, el tacto, el gusto, el oído.

Las pruebas sensoriales se dividen en :

Pruebas Afectivas y Pruebas Analíticas; las primeras se realizan con personas no entrenadas en técnicas sensoriales es decir con consumidores y las segundas se llevan a cabo con jueces entrenados y en un laboratorio adecuado para tal fin. Dentro de las pruebas analíticas tenemos métodos sensitivos, cuantitativos y cualitativos y dentro de este último encontramos el Análisis Descriptivo Cuantitativo.

Los Métodos de Análisis Descriptivos, son definidos como métodos que proporcionan una descripción (palabras) de un producto o una serie de productos, este análisis puede incluir todos los parámetros de un producto o una serie de éstos, o puede ser limitado a determinados aspectos por ejemplo el aroma, gusto y resabio, tratando de definir las propiedades de los alimentos objetivamente.

El Análisis Descriptivo Cuantitativo (QDA) fue desarrollado a mitad de los años setenta para responder a la necesidad de una técnica que pudiera ser usada para describir las características sensoriales de un producto con precisión en términos matemáticos. Con esta técnica, la estadística puede ser usada para medir la variabilidad y comparar o contrastar un producto contra otros (Stone, *etal*, 1974).

El Análisis Descriptivo Cuantitativo se basa en el principio de la habilidad de los jueces para verbalizar percepciones de un producto de una manera confiable. Esta prueba involucra una selección formal y un procedimiento de entrenamiento, desarrollo y uso de un lenguaje sensorial y la calificación de productos en prueba con repetición de productos para obtener una completa descripción cuantitativa.

En los vinos se han realizado estudios sobre análisis sensoriales y fisicoquímicos desde los años cincuenta; en los análisis sensoriales realizados con expertos catadores, incluyen términos subjetivos (Santillán, 1995), que producen muchas veces ambigüedad y además de que en cada país pueden definir cada palabra de diferente forma y después al traducirlos a otros idiomas cambian de significado también, por lo que en este estudio se usó el Análisis Descriptivo Cuantitativo, utilizando atributos específicos con un grupo de jueces entrenados.

2.2.3.3 Compuestos responsables del aroma y sabor de los vinos.

En años recientes se han utilizado además de técnicas sensoriales, técnicas analíticas para poder determinar los compuestos responsables del aroma y sabor de los vinos, aunque sabemos que el aroma de un vino resulta del balance global de los cientos de diferentes compuestos que están en él y no del impacto individual de cada uno de ellos.

Los compuestos responsables del aroma de un vino pueden ser clasificados en los siguientes grupos: (Falqué, *et al*, 1996)

I. Compuestos procedentes de la uva:

Estas sustancias ya están presentes en la uva y son transferidas al vino como tales o después de sufrir una transformación, contribuyendo a las características típicas del mismo. Por ejemplo, los compuestos que caracterizan a la uva utilizada en este estudio, la *Cabernet Sauvignon* son las metoxipirazinas, fundamentalmente el 2-metoxi-3-isobutilpirazina o cualquier otro compuesto que cumpla con la estructura de 3-alkil-2-metoxipirazina que le dan un olor herbáceo típico de estos vinos.

La mayor parte de los cambios en el aroma que se producen entre las diferentes cepas de esta variedad, se deben a las concentraciones de los distintos compuestos volátiles en las uvas o en los vinos; aunque también tienen influencia las condiciones climáticas y regionales de los viñedos. Un aroma común entre todas las cepas de esta variedad es la pimienta campana dado por el 2-metoxi-3-isobutilpirazina, que a su vez la distingue de otras variedades de uva. Entre los alcoholes típicos de esta variedad se encuentran: 4-metil-pentanol; los alcoholes C₆ resultantes de las transformaciones de los ácidos linoleico y linolénico de las uvas y sus hollejos como el 1-hexanol, cis-2-hexen-1-ol y cis-3-hexen-1-ol; los alcoholes típicos de los vinos como: 1-heptanol, 2-heptanol, 1-octanol y alcohol bencílico también se han encontrado.

Dentro de los ésteres que se han encontrado en las cepas de *Cabernet Sauvignon* están los etil ésteres de cadenas saturadas de ácidos monocarboxílicos desde el propiónico hasta el láurico; los dietil ésteres de las cadenas de los ácidos carboxílicos, del malónico al glutárico; dos ésteres del ácido succínico, etil-lactato y etil furoato; 2 insaturados (dietil-malato y dietilcinamato) y uno aromático (dietilftalato); tiene concentraciones elevadas de acetatos y butirato de etilo. Solo se ha identificado la γ -butirolactona y se sospecha la presencia de γ -lactonas sustituidas. Se han reportado cuatro carbonilos no propios de la uva pero si producidos durante el proceso como: furfural (tienen niveles bajos), benzaldehído, fenilacetaldehído y β -ionona. En los vinos de esta variedad de uva se han encontrado estireno y 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftaleno que son dos hidrocarburos aromáticos (Lorenzo, 1996).

Existen ácidos grasos de cadenas medianas que dependen de la cantidad de azúcares provenientes de las uvas, y de la madurez de la misma, la cantidad de ácidos grasos de cadena mediana aumenta cuando disminuye la cantidad de sólidos insolubles durante la maceración.

También se encuentran compuestos terpénicos, los más comunes son el linalool, geraniol, α -terpineol, horticeneol y nerol entre otros que pueden ser encontrados en todas las variedades de uva. Los

terpenos provienen del anabolismo de los carotenoides de la uva o de reacciones de hidrólisis ácidas o enzimáticas que se dan durante el proceso (Lorenzo, 1996).

Las uvas maduras producen menos aldehídos que las verdes. Los más comunes son: cis-2-hexenol, trans-2-hexenol, hexenal, trans-2-hexenal (Lorenzo, 1996).

Existe la formación de compuestos que dan aroma, antes de la fermentación; ésta se da en la molienda cuando el mosto entra en contacto con el aire; estos compuestos en general son: alcoholes y aldehídos de formación rápida, sobre todo de C₆ que llegan a dar características sensoriales herbáceas y amargas (Lorenzo, 1996).

II. Compuestos formados durante la fermentación.

La presencia o no de sólidos solubles e insolubles de la uva afectan en la producción de compuestos volátiles durante la fermentación, fundamentalmente de alcoholes superiores y de ácidos grasos de cadenas medianas, ya que dependen de la cantidad de azúcares presentes en la uva. (Lorenzo, M., 1996)

Entre estas sustancias se incluyen al etanol, que depende de la concentración de azúcar disponible, la característica que proporciona al vino es el cuerpo y permite la percepción de otros compuestos que generan el bouquet del vino.

Otros compuestos son el glicerol y el ácido succínico. El glicerol depende de factores ambientales (bajas temperaturas y alta sulfitación incrementan la concentración de este compuesto), también contribuyen las fuentes de carbono disponibles diferentes de los carbohidratos. El glicerol imparte viscosidad al vino.

El ácido succínico contribuye a la acidez del vino; otros compuestos son: el acetaldehído, que puede acumularse en los vinos como resultado de la oxidación del etanol. El ácido acético es el mayor constituyente de la acidez volátil; puede formarse a partir de la oxidación del acetaldehído o también lo pueden producir las levaduras *Apiculta* o *Saccharomyces*.

La acidez titulable comprende muchos compuestos, pero solo una fracción es derivada de la actividad microbiana a través de la glucólisis o del ciclo del ácido cítrico; esos ácidos son sustratos de fermentaciones secundarias. El ácido pirúvico y el ácido α -cetoglutarico son los ácidos que se acumulan durante la vinificación (Lorenzo, 1996).

Los ésteres son otro grupo de componentes presentes que provienen de la fermentación alcohólica; se produce intracelularmente por esterificación química y biológica, dependiendo fuertemente del tipo de microorganismo. El acetato de etilo, que no debe existir en grandes cantidades y que depende de la variedad de uva y del tipo de vinificación, se produce a partir del ácido acético y el etanol por medio de esterasas; es muy abundante en vinos jóvenes. Se han identificado otros ésteres como el acetato de isopentilo que aparece hasta la segunda fase de la fermentación, el acetato de metilo, en la fase de anaerobiosis, formiato de etilo, propionato de etilo, lactato de etilo que se forma durante la crianza y se ve favorecido por la presencia de ácido láctico, butirato de etilo, caproato, heptanoato,

caprilato, decanoato, pelargonato, laurato, isoamilacetato de etilo, el 2-fenil-etilacetato, 3-metil-butylacetato, hexanoato de etilo y octanoato de etilo (Palacios, *et al*, 1996).

Un grupo importante de compuestos son los alcoholes superiores o "aceites de fusel", los cuales son responsables de la sensación de resaca posterior a la ingestión de bebidas alcohólicas. Los más comunes son:

Los alcoholes amílicos 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol, los cuales se encuentran en mayor concentración y aumentan a lo largo de la fermentación en la fase anaerobia. El 2-metil-1-butanol surge de la desaminación de la isoleucina, depende de la flora microbiana durante la fermentación. El 3-metil-1-butanol, surge a partir de la leucina. Su aroma es a plátano y es producido por levaduras liofilizadas, transformado a su vez en su éster acetato de isoamilo.

El 1-butanol y el 2-butanol existen en vinos pero demuestran la presencia de bacterias lácticas, también pueden depender de la levadura principal. Tienen olor penetrante que afecta la calidad.

El 2-metil-1-propanol, es un componente principal del aceite de fusel, su concentración depende de la variedad de uva y la temperatura de fermentación; disminuye cuando se realiza la fermentación a temperatura controlada. Tiene olor típico a fruta acerba (áspera al gusto).

El 1-propanol depende de la cepa de levadura y temperatura de fermentación, su producción se relaciona con el metabolismo de treonina y metionina, disminuye con el desfangado, la corrección de acidez y el tratamiento de estabilización tartárica.

Hexanol: se encuentra en trazas, proviene de la uva, su cantidad depende de la actividad de las enzimas lipoxigenasas y de la alcohol deshidrogenasa, así como de la variedad de la vid y del contacto con los hollejos. Su olor es característico a hierba cortada y heno, típico de uvas poco maduras. Las vías metabólicas que los producen está conectada con el metabolismo de ciertos aminoácidos y se da por una serie de reacciones en las cuales el aminoácido es desaminado por medio de una oxidación, descarboxilado y reducido a su alcohol correspondiente, también se pueden producir de precursores durante la biosíntesis de aminoácidos que se da durante el crecimiento de las levaduras.

Otro alcohol que aparece en pequeñas concentraciones en los vinos es el feniletanol, y su interés particular se debe a que da una nota floral, se presume que se produce a partir de un precursor, el ácido fenilpirúvico, el cual está presente en el mosto. Se ha visto que cuando se adiciona fenilalanina y triptofano a los mostos se mejora el bouquet probablemente por los altos niveles de feniletanol: se ha observado que se produce más feniletanol en vinos que se elaboran con la flora asociada a la uva que en vinos con un cultivo puro.

También se ha encontrado 2-butanol y lactonas en algunos vinos (Margalith, 1981) así como compuestos del azufre (Palacios, *et al*, 1996).

El fenol y los compuestos fenólicos son volátiles importantes en el vino, generalmente provienen de la alcoholisis de la lignina de las barricas que contienen al vino durante el añejamiento, pero también

pueden producirse durante la fermentación microbiana por diferentes rutas metabólicas a partir de los sólidos de la uva que siguen las levaduras durante la fermentación.

Los ácidos grasos que se encuentran provienen de la fermentación a partir del metabolismo de lípidos y en algunos casos desde la uva; algunos de los más comunes son el cáprico, caproico, caprílico y octanoico.

III. Compuestos formados en el envejecimiento.

Durante la permanencia en botella o bodega, numerosas sustancias son transformadas químicamente y extraídas de la madera, por ejemplo 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftaleno, dimetilsulfuro y vainillina, dándole de esta forma un nuevo matiz al aroma del vino (bouquet).

Como se analiza anteriormente, son numerosos los factores que van a contribuir en la composición y concentración de los compuestos responsables del sabor y aroma de un vino: factores ambientales (clima, suelo...); variedad; condición del fruto (grado de madurez); tratamientos prefermentativos (sulfitación, maceración); condiciones durante el período de fermentación (pH, temperatura, nutrientes, microflora...); tratamientos postfermentativos (clarificación, mezcla, etc.) condiciones de añejamiento (maduración en botella, en bodega).

Gracias a la Cromatografía de Gases y a la Espectrometría de Masas se ha conseguido separar y cuantificar muchos de estos compuestos. (Palacios, *et al*, 1996), los cuales se han relacionado con el aroma que producen como los siguientes:

1. Los ácidos caproico, cáprico y caprílico dan un aroma suave y redondo al vino cuando se encuentran en concentraciones de 4 a 10 ppm. Por separado se ha visto que el ácido caproico da olores a rancio, el cáprico a cítrico y el caprílico a frutas y juntos dan olores a lácteos, dulce y cremoso. Algunos derivados de ácidos grasos tienden a dar aromas frutales o a jabón.
2. El aroma a ácido lo da el 1,4-butandiol, el ácido hexanoico y la suma de etil-4-hidroxibutirato y desconocidos.
3. El de alcohol el 1-butanol, 2-metil-1-propanol.
4. La astringencia los fenoles totales.
5. El dulce: 3-etil-tio-1-propanol, 1-propanol, 3-hidroxi-4,5-dimetil-2-furanona, dietilmalato, ácido isovalérico, ácido octanoico, ácido hexanoico, etilvainillato, 3-metil-butil-etil-9-hidroxi-nonanoato, etil-2-metil-propanoato, la suma de 1,1-dietoxietano y 2,4-dimetil-1,3-dioxano.
6. El frutal: alcohol isobutílico, 2-feniletanol, 1-hexanol, alcohol isoamílico, ácido hexanoico, ácido decanoico, ácido octanoico, etilhexanoato, etil-laurato, etilacetato, etil-2-metil-propanoato, 3-metil-butilacetato, hexilacetato, etilcaprilato, etil-etil-butirato, hexilhexanoato, etilcaproato, octanoato, etil-2-metil-butirato, etilpentanoato, etilbutanoato, etil-lactato, 2-metil-butil-acetato, metiloctanoato, etildecanoato, isoamilacetato, etilcetil-3-metil-butirato, metilhexanoato, dietilsuccinato, caprato.

7. El de manzana: relación de etanal/acetal, o acetal, etil-2-metil-butirato, etil-3-metil-butirato, isoamilacetato.
8. Cereza: hexanal, butirato de etilo.
9. Madera: 4-etil-fenol, alcohol bencílico, 2-etil-fenol, derivados fenólicos, 4-fenil-3-hidroxibutan-2-ona, furfural, 2-fenil-etil-2-hidroxipropionato, dietilsuccinato, metil-4-hidroxibenzoato, etil-2-hidroxiglutarato, suma de etil-3-metoxi-4-hidroxibenzoato y etil-3-hidroxi-4-metoxi-benzoato, eugenol, roble-lactona.
10. Vinagre: ácido acético y etil acetato.
11. Flores: hexanol, 2-feniletanol, alcohol bencílico, ácido octanoico, ácido decanoico, etil-2-hidroxi-3-fenil-propanoato, etil-2-metil-propanoato, etil-octanoato, β -butil-hexanoato, etil-butanoato, etil-2-hidroxi-propionato, hexilacetato, feniletilacetato, etil-octanoato, dietilsuccinato, 2-fenetilacetato, etilhexanoato, monoterpenos, suma de pantolactona y 4-etilguayacol, limoneno, naftaleno, linalool, nerol, suma de etil-9-decenoato y damascenona, suma de 1,1-dietoxietano y 2,4-dimetil-1,3-dioxano, suma de ácido butírico y hortrienol (Lorenzo, 1996).

capítulo III

METODOLOGIA

3.1 RESISTENCIA DE LA CEPA *Saccharomyces cerevisiae* var. *chevalieri* CONTRA LEVADURAS ZIMOCIDAS.

3.1.1 Microorganismos.

La cepa de estudio fue aislada de pulque e identificada como *Saccharomyces cerevisiae* var. *chevalieri* según lo descrito por Estrada (1995).

Para conocer la resistencia de la levadura de estudio se utilizaron cepas de colección cuya toxina está perfectamente caracterizada.

Las cepas que se probaron fueron las siguientes:

K₁	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC 232
K₂	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC 738
K₃	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC 761
K₄	<i>Candida glabrata</i> NCYC 388
K₅	<i>Hansenula anomala</i> NRRL-Y-2153
K₆	<i>Kluyveromyces marxianus</i> NCYC 587
K₇	<i>Pichia membranifaciens</i> NCYC 333
K₈	<i>Hansenula anomala</i> NRRL-Y-2153-4
K₉	<i>Williopsis mrakii</i> NRRL-Y-1364
K₁₀	<i>Kluyveromyces marxianus</i> NCYC 575

Las cepas NCYC fueron obtenidas de la National Collection of Yeasts Cultures, Norwich, Inglaterra, y las cepas NRRL de Northern Regional Research Laboratories, Preoria Illinois, EUA.

3.1.2 Conservación de cepas.

Todas las cepas se conservaron bajo refrigeración en tubos de ensaye utilizando medio GELPA compuesto de:

GLUCOSA (2%)
EXTRACTO DE LEVADURA (0.5%)
PEPTONA DE GELATINA (1%)
AGAR BACTERIOLOGICO (2%)

3.1.3 Propagación.

Para la propagación de todos los microorganismos incluyendo la cepa de estudio se utilizó medio GELP similar al GELPA solo que sin el agar microbiológico.

Se ajustó a un pH de 4.8 con solución de fosfatos.

La propagación se realizó en matraces Erlenmeyer de 500 ml, con un volumen de trabajo de 150 ml; se incuban durante 3 días a 28°C a 150 rpm, en incubadora con agitación rotatoria New Brunswick G-25

3.1.4 Determinación de crecimiento

El crecimiento se midió por turbidimetría, se medía la absorbancia inicial y final del medio con el microorganismo a 650 nm. Se comparó contra una curva patrón de absorbancia contra peso seco. La determinación se realizó en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160 A.

3.1.5 Detección de la sensibilidad de la cepa de estudio a los factores aniquilantes.

Una vez propagada la cepa de estudio en medio líquido se adicionó 0.5 ml del cultivo en la superficie de medio GELPA con 0.003% de AZUL DE METILENO en caja petri, para formar un tapete sobre el agar, con una concentración de aproximadamente 10^4 g/ml, y distribuyendo con un rodillo de vidrio. Se hicieron cuatro pozos en el agar y en ellos se inocularon 50 µl del cultivo de la cepa zimocida, con la misma concentración de microorganismos que el tapete anterior. Las placas se incubaron a 28°C durante 4 días observándose una vez por día. Un halo claro alrededor del pozo con un borde de color azul más intenso, indica que no hubo crecimiento de la levadura de estudio, por lo que se concluyó que la toxina de la levadura aniquilante es letal para ésta.

3.2 CARACTERIZACION DE LA LEVADURA EN ESTUDIO.

3.2.1 Propagación de la levadura

Se propagó en el medio líquido GELP, se inoculó una asada en 150 ml de medio contenido en un matraz Erlenmeyer de 1L.

3.2.2 Determinación de crecimiento

Además de turbidimetría, el crecimiento se midió utilizando una cámara de Neubauer, una vez cada 24 horas, tiñiendo 1 ml de mosto con microorganismo y adicionando 4 ml de azul de metileno al 1% y aforando a 50 ml; finalmente se ponía una muestra en la cámara de Neubauer y se contaba el número de células vivas.

3.2.3 Tolerancia al etanol

En matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 50 ml del medio GELP se incubaba 1 ml de la levadura de estudio que provenía del cultivo de propagación, en presencia de: 5, 10, 11, 12, 13, 14 y 15% (v/v) de etanol y se observaba si había crecimiento por turbidimetría después de 72 h de incubación a 30°C y 200 r.p.m. de agitación, en incubadora con agitación rotatoria New Brunswick G-25.

3.2.4 Determinación del pH óptimo de crecimiento

Se utilizó medio GELP pero ajustando el pH a 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, con solución de fosfatos; se usaron matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 50 ml de medio y se incubaba 1 ml del cultivo de propagación como en el caso anterior, se media si había o no crecimiento por turbidimetría después de incubar por 72 h a 30°C con una agitación de 200 rpm.

3.2.5 Crecimiento a altas concentraciones de azúcar.

Se utilizó 1 ml del cultivo de propagación proveniente de matraces Erlenmeyer de 250 ml. Se observó si había o no crecimiento por turbidimetría después de incubar 72 h. a 30°C y con una agitación de 200 rpm utilizando el siguiente medio: MgSO_4 0.05 %, extracto de levadura 0.5% y se varió la cantidad de glucosa en 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280 y 320 g/l, y de sulfato de amonio 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 y 90.5 g/L. Se ajustó el pH a 4.8 con solución de fosfatos.

3.2.6 Tolerancia a altas temperaturas

En matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 50 ml del medio GELP, se incubaba 1 ml de la levadura de estudio que provenía del cultivo de propagación exponiendo a la levadura a las siguientes temperaturas: 26, 29, 31, 34, 37, 41, 44 °C y se determinaba si había o no crecimiento por turbidimetría después de 72 h de incubación a 200 rpm de agitación.

3.2.7 Resistencia al metabisulfito de sodio

En matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 50 ml mosto de uvas blancas (22.5°Bx) y tintas (18.5°Bx), se inoculó 1 ml del cultivo de propagación, se utilizaron 100, 200, 300 y 400 ppm de metabisulfito de sodio. Se observó si había crecimiento o no después de 6 días por turbidimetría.

3.3 PROCESO DE VINIFICACION

Uno de los propósitos de este estudio fue la elaboración de vinos de forma similar a los que se elaboran en la industria, por lo que fue necesario trabajar en una industria vitivinícola ubicada en la región vitícola de Querétaro, específicamente en la empresa " Los Eucaliptos ", en Ezequiel Montes Querétaro.

3.3.1 Técnicas analíticas en mostos y vinos.

La cuenta de levaduras viables se realizó por medio de la cámara de Neubauer.

Para los azúcares totales se utilizó un Brixómetro.

Para acidez total: se tomaron 15 ml de muestra, se adicionaron 2 gotas de fenolftaleína y se neutralizó con NaOH.

Para la determinación de etanol se destilaron 250 ml de muestra, se recogieron 200 ml del destilado y se leyó la concentración del etanol por medio de un alcoholímetro.

Para determinar sulfuroso total se utilizaron 50 ml de muestra, se adicionaron 15 ml de KOH, se dejó reposar 15 min, después de este tiempo se adicionaron 2 ml de almidón y 10 ml de H_2SO_4 y se tituló con Iodo.

3.3.2 Variedad de uvas utilizadas.

Uva blanca: *Saint Emillion (Ugni blanc)*.

Uva tinta: *Cabernet Sauvignon*.

Ambas procedentes de viñedos localizados en el estado de Querétaro.

3.3.3 Preparación del inóculo

Una asada de la cepa *Saccharomyces cerevisiae var. chevalieri* se propagó en medio GELP durante 30 h a 30°C, de aquí se tomó 1 ml y se propagó en 200 ml de un mosto de uvas blancas y en uno de tintas; después se trasladó a uno de 700 ml hasta alcanzar una concentración de 10^6 levaduras/ml, todo en las mismas condiciones de temperatura.

3.3.4 Diseño de tratamientos.

Se diseñaron cinco tratamientos para cada tipo de uva a utilizar:

El Tratamiento 1: Fue un mosto que se **pasteurizó** y se **sulfitó** (adicionó SO_2) y se le **adicionó el inóculo** de estudio. En este tratamiento nos interesaba conocer de qué forma crece nuestra cepa de estudio sin la presencia de la flora asociada a las uvas y además el efecto que ejerce el SO_2 en ella.

A: VINO TINTO 1: VINO BLANCO

Tratamiento 2: Fue un mosto que también se **pasteurizó** y se le **adicionó el inóculo** de estudio pero no se sulfitó, esto con la finalidad de conocer el crecimiento de nuestra cepa de estudio sin la presencia de SO_2 y de microorganismos acompañantes en las uvas.

B: VINO TINTO 2: VINO BLANCO

Tratamiento 3: En este caso se usó un mosto no pasteurizado, **sulfitado** y adicionado **con la cepa de estudio**, en este tratamiento lo que se deseaba evaluar era el crecimiento de nuestra cepa en presencia de la flora asociada a la uva y el efecto del sulfuroso.

C: VINO TINTO 3: VINO BLANCO

Tratamiento 4: Este tratamiento fue similar al anterior solo que no se sulfitó, en este caso la flora microbiana vendrá a ser mayor ya que no hay sulfito que detenga el crecimiento de cierta parte de microorganismos.

D: VINO TINTO 4: VINO BLANCO

Tratamiento 5: Este fue nuestro mosto control, el cual constó de un mosto no pasteurizado, **sin el microorganismo de estudio** y con SO_2 . Estas son las condiciones normales de elaboración de vino en esta fábrica.

E: VINO TINTO 5: VINO BLANCO

Estos tratamientos se llevaron a cabo para los dos tipos de uvas, es decir se manejaron 10 tratamientos, y en el proceso de vinificación de forma general que se describe a continuación algunos pasos serán omitidos por la diferencia de los tratamientos.

3.3.5 Proceso de vinificación de las uvas blancas

VENDIMIA: Se llevó a cabo el corte de uvas y la colección de éstas en canastillas de plástico.

MOLIENDA: En este proceso se extrajo el jugo de las uvas y se separó el hollejo (cáscara) y el raspón (tronco donde se sostienen los granos de uva).

PASTEURIZACION: Se calentó el jugo de uvas a 70 °C durante 30 min (OPCIONAL).

SULFITADO: Se adicionó metabisulfito de potasio (160 ppm) (OPCIONAL).

ENCUBADO: Se colocaron aproximadamente 17 L de mosto de uva en garrafrones de vidrio de 19L SIN hollejo.

INOCULACION: Se adicionó 5% (v/v) del pie de cuba (OPCIONAL).

FERMENTACION: Se siguió la fermentación por medio del consumo de azúcares, aumento de etanol y levaduras viables. Se llevó a cabo aprox. a 23°C hasta agotar los azúcares.

ADICION DE SACAROSA: En algunos casos para obtener mayor concentración de etanol es necesario este paso, fundamentalmente cuando las uvas tienen baja concentración de este azúcar y se da por las condiciones climáticas de ese año de cosecha. La cantidad a adicionar dependerá de la concentración de etanol que se desee producir, considerando la fase de crecimiento de los microorganismos y el vino a elaborar.

TRASIEGO: Una vez que se consumieron los azúcares fermentables, el mosto se trasladó a otro garrafón separándolo de las borras (hollejo, semillas y todo lo que se haya precipitado).

CLARIFICACION: Se adicionó caseína (20g/hl) y bentonita (60g/hl) previamente hidratadas.

SEGUNDO TRASIEGO: Se trasladó el vino a otro recipiente separándolo de borras.

FILTRACION: Se hizo pasar el vino a través de un filtro de celulosa.

EMBOTELLADO : En botellas de vidrio verde de 750 ml con tapón de corcho.

3.3.6 Proceso de vinificación de las uvas tintas

VENDIMIA: Se llevó a cabo el corte de uvas y la colección de éstas en canastillas de plástico.

MOLIENDA: Se extrajo el jugo de las uvas y se separó el raspón.

PASTEURIZACION: Se calentó el jugo de uvas a 70 °C durante 30 min(OPCIONAL).

SULFITADO: Se adicionó metabisulfito de potasio (160ppm) (OPCIONAL).

ENCUBADO: Se colocaron aproximadamente 17 L de mosto de uva en garrafrones de vidrio de 19L, dejándolo en contacto con los hollejos (cáscara de la uva).

INOCULACION: Se adicionó 5% (v/v) del pie de cuba (OPCIONAL).

FERMENTACION: Se siguió la fermentación por medio del consumo de azúcares, aumento de etanol y levaduras viables. Se llevó a cabo aprox. a 23°C hasta agotar los azúcares.

ADICION DE SACAROSA: En algunos casos para obtener mayor obtención de etanol es necesario este paso, fundamentalmente cuando las uvas tienen baja concentración de este azúcar y se da por las condiciones climáticas de ese año de cosecha. La cantidad a adicionar dependerá de la concentración de etanol que se desee producir, considerando la fase de crecimiento de los microorganismos y el vino a elaborar.

TRASIEGO: Una vez que se consumieron los azúcares fermentables, el mosto se trasladó a otro garrafón separándolo de las borras y de los orujos (cáscara de la uva posterior a la fermentación).

CLARIFICACION: Se adicionó grenetina y bentonita previamente hidratadas.

SEGUNDO TRASIEGO: Se trasladó el vino a otro recipiente separándolo de borras (sedimento).

FILTRACION: Se hizo pasar el vino a través de un filtro de celulosa.

EMBOTELLADO : En botellas de vidrio verde de 750 ml con tapón de corcho.

3.4 DETERMINACION DE LA CALIDAD FISICOQUIMICA DE LOS VINOS ELABORADOS CON RESPECTO A LA NORMA OFICIAL MEXICANA.

3.4.1 Determinación de etanol

Se llevo a cabo por medio de la Técnica Semichon-Flanzy-Jaulmes, en lugar de la que se describió anteriormente, debido a que la Norma Oficial Mexicana determina que para análisis fisicoquímicos es necesario usar esta técnica, la que describo a continuación:

Se colocó en el vaso destilador de un destilador de micro kjeldal 15 ml de vino y se recibió 1 ml del destilado en 25 ml de solución de dicromato de potasio. Posteriormente se hirvió en baño maría durante 3 minutos, finalmente se enfrió y se tituló con una solución de sulfato ferroso amoniacal; como indicador se usa o-fenantrolina ferroso.

3.4.2 Determinación de acidez total

Se realizó una titulación de 10 ml de vino con NaOH 0.1 N utilizando azul de bromotimol como indicador.

3.4.3 Determinación de acidez volátil

Se colocó en la copa del microdestilador 25 ml de vino y se recibieron aproximadamente 40 ml de destilado en un frasco gerber que contenía 10 ml de agua destilada fría y se tituló con NaOH 0.01 N usando azul de bromotimol como indicador.

3.4.4 Determinación de azúcares reductores directos

Se utilizó el método de Fehling (Modificación de Causse Bonnans). Primero se tituló el reactivo de Fehling (tartrato de sodio y potasio, NaOH, CuSO_4 , ferrocianuro de potasio) con una solución de glucosa al 0.5% usando como indicador azul de metileno. Se calentaron 10 ml de muestra con 5 ml de HCl por 3 minutos, posteriormente se enfrió y se neutralizó con NaOH y se aforó a 50 ml, se adicionaron 5 ml de subacetato de plomo al 25%, se agitó y se filtró; el filtrado se tituló con el reactivo de Fehling.

3.5 EVALUACION SENSORIAL

3.5.1 Jueces.

Se contó con la colaboración de seis jueces, todos estudiantes de la Universidad Iberoamericana. Estos jueces habían sido previamente entrenados para analizar vinos sensorialmente usando el método de Análisis Descriptivo Cuantitativo (QDA) (Santillán, 1995).

3.5.2 Descripción de sabor y aroma.

Se llevaron a cabo 5 sesiones en las cuales se les proporcionó las muestras 5 (vino blanco adicionado con metabisulfito de potasio y sin el microorganismo de estudio, es decir es el tipo de vino que se produce industrialmente) y E (vino tinto adicionado con metabisulfito de potasio y sin el microorganismo de estudio, es decir es como el tipo de vino que se produce industrialmente), durante estas sesiones se les pidió a los jueces que describieran al vino en sabor y aroma.

3.5.3 Definición de atributos.

Con el vocabulario generado durante la Etapa I se seleccionaron los 7 atributos de mayor aparición para cada tipo de vino que se dieron tanto en aroma y sabor. En esta etapa a los jueces se les proporcionaron muestras de los vinos 5 y E a las cuales se les resaltaron notas con los 7 atributos, para discutir las definiciones y las referencias de lo más intenso en cada atributo. Esto se llevo a cabo usando vino y agua como solvente de la siguiente forma :

Para definir alcohol se utilizó etanol G.R. al 35%.

Para ácido se utilizó ácido cítrico G.R. 0.04g/100 ml de solución.

Para dulce se utilizó sacarosa G.R. 0.8g/100 ml de solución.

Para salado se utilizó NaCl G.R. 0.15g/100 ml de solución.

Para amargo se utilizó cafeína G.R. 0.03g/100 ml de solución.

Para manzana se utilizó un sabor artificial a manzana al 0.1%.

Para afrutado se utilizó un sabor artificial a afrutado al 0.1%

Para uva se utilizó un sabor artificial a uva al 0.1%

Para astringente se utilizó raspón de uva.

Las concentraciones se calcularon según Jellinek, (1980) y Firmenich fue el proveedor de los sabores artificiales.

Estas dos etapas se pueden resumir de la siguiente forma, primero se les proporcionó a los jueces una muestra de vino blanco y una de tinto con el fin de que describieran a ambos vinos con palabras, una vez contabilizadas las frecuencias de aparición de cada palabra se eligieron 7 palabras o 7 atributos (los de mayor aparición), de aquí se prepararon soluciones que representaron a cada atributo en una forma intensa, por ejemplo para el atributo alcohol se utilizó una solución de alcohol al 35%, con eso los jueces acordaron que esa iba a ser la nota a alcohol, que a esa sensación se referían a alcohol y además eso era lo más intenso cuando se referían a esa nota.

3.5.4 Evaluación.

Se utilizó un cuestionario de evaluación similar al que utilizó Santillán, (1995), que presento a continuación:

1. Para la evaluación sensorial de los vinos blancos se utilizó el siguiente cuestionario:

NOMBRE: _____		FECHA: _____	
Instrucciones: Evalúe y califique cada uno de los atributos que se listan a continuación. Marque sobre la escala una línea vertical que describa la intensidad del descriptor que está evaluando.			
MUESTRA: _____			
ALCOHOL	---	I	-----I
ACIDO	---	I	-----I
DULCE	---	I	-----I
SALADO	---	I	-----I
AMARGO	---	I	-----I
MANZANA	---	I	-----I
AFRUTADO	---	I	-----I

1. Para vinos tintos se usó el siguiente cuestionario:

NOMBRE: _____		FECHA: _____	
Instrucciones: Evalúe y califique cada uno de los atributos que se listan a continuación. Marque sobre la escala una línea vertical que describa la intensidad del descriptor que está evaluando.			
MUESTRA: _____			
ALCOHOL	---	I	-----I
ACIDO	---	I	-----I
SECO	---	I	-----I
SALADO	---	I	-----I
AMARGO	---	I	-----I
ASTRINGENTE	---	I	-----I
UVA	---	I	-----I

En la evaluación de las muestras, se calificaba la intensidad en sabor de cada atributo; se les proporcionó en una sesión las muestras 4 y 5 con el cuestionario correspondiente y después de aproximadamente 30 minutos se les proporcionó las muestras C, D y E con su cuestionario; entre cada muestra ellos tomaron agua y galletas habaneras para eliminar el sabor de la muestra anterior. También se tenían muestras con notas resaltadas para que en caso de que algún juez tuviera que recordar algún atributo, lo solicitara para comparar y evaluar la (o las) muestra.

Se llevaron a cabo 2 sesiones similares a la anterior para tener 3 repeticiones en total.

3.6 PERFILES CROMATOGRAFICOS

3.6.1 Preparación de las muestras.

Se diluyeron los vinos al 65% y se pasaron a través de discos de extracción de fase reversa utilizando discos de octadecil (C_{18}) de 40 mm de tamaño de partícula, y 47 mm de diámetro de la marca Supelco, posteriormente los compuestos retenidos en el disco se eluyeron con diclorometano y se concentraron con nitrógeno gaseoso.

3.6.2 Obtención de perfiles por Cromatografía de Gases.

Posteriormente se tomó 1 ml del concentrado de la operación anterior y se inyectó en un Cromatógrafo de Gases de las siguientes características: Cromatógrafo 5890A HP con un detector FID, Integrador HP3396A. Se utilizó una Columna Capilar SP 1000 de 30 m X 0.32 mm X 0.25 mm. Se utilizaron los siguientes flujos:

- Split: 30 ml/min
- Purga: 4.2 ml/min
- Detector: nitrógeno 30 ml/min, hidrógeno 33.8 ml/min, aire 315 ml/min.

La velocidad de calentamiento fue de 25°C/min, la temperatura inicial fue de 60°C y la final de 220°C. Se utilizó un tiempo final de 30 min. Se realizó en Split.

3.7 ESPECTROMETRIA DE MASAS.

El Espectrómetro de Masas conserva las mismas características y programa de temperaturas descritos para el Cromatógrafo de Gases pero difieren en el detector que en este caso es un detector de Espectrometría de Masas con software de integración de HP.

capítulo IV

RESULTADOS

4.1 RESISTENCIA DE LA CEPA EN ESTUDIO CONTRA LEVADURAS ZIMOCIDAS.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se observó un halo de inhibición, en la caja petri correspondiente a la levadura *Kluyveromyces marxianus* (con factor aniquilante K_{10}), lo cual quiere decir que la toxina producida por este microorganismo resulta letal para la levadura que se está estudiando.

Sólo en este caso se observó un halo de inhibición, con las restantes levaduras aniquilantes que se probaron, se observó crecimiento sin inhibición de la levadura en estudio.

4.2 CARACTERIZACION DE LA LEVADURA EN ESTUDIO.

4.2.1 Tolerancia al etanol

La figura 4.2.1 muestra que la máxima concentración de etanol tolerada fue de 11%.

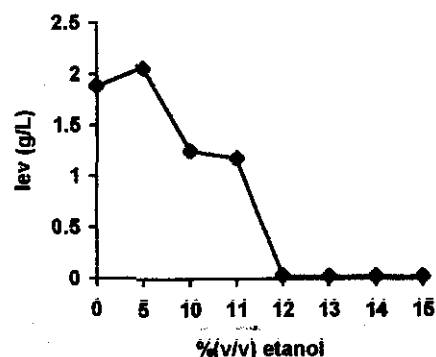


Fig. 4.2.1 Curva que muestra el crecimiento de la levadura en estudio a diferentes concentraciones de etanol.

4.2.2 Determinación del pH óptimo de crecimiento

En la figura 4.2.2 podemos observar una curva en la que tenemos una meseta que nos representa el máximo crecimiento, en un rango de pH alrededor de 3 a 7. En fermentaciones de mostos de uva se trabaja en un pH aproximadamente de 4, lo cual nos asegura el crecimiento de nuestra levadura, no obstante, la levadura de estudio mostró una muy amplia tolerancia al pH, mostrando la capacidad de crecer desde un pH neutro hasta muy ácido.

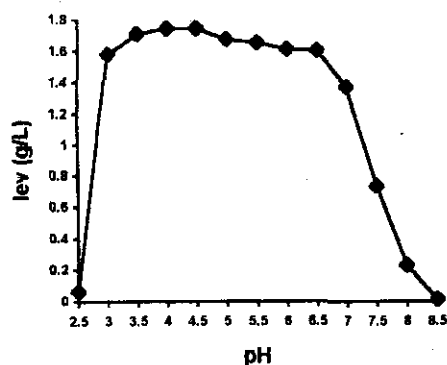


Fig. 4.2.2 Curva que representa el crecimiento de la levadura en estudio a diferentes pH.

4.2.3 Crecimiento a altas concentraciones de sustrato

Cuando se estudiaron diferentes concentraciones de glucosa en el medio de cultivo se observó que el crecimiento de la levadura no se vio alterado (ver figura 4.2.3) en un rango de 120 a 280 g/l de glucosa. Esto implica que se trata de una levadura osmotolerante, capaz de crecer en concentraciones de hasta 28% de glucosa sin problemas de inhibición. Para el caso de los mostos de uva se tiene como máximo en los climas más calurosos una concentración de 300 g/l (Margalith, P., 1981), lo cual también asegura la utilización de éste azúcar en mostos con altas concentraciones de azúcares.

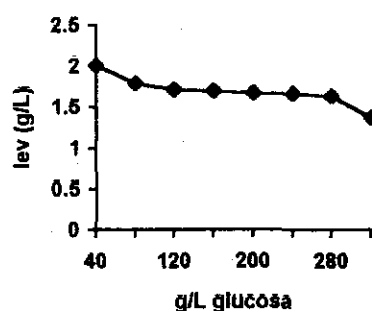


Fig. 4.2.3 Curva que representa el crecimiento de la levadura en estudio a diferentes concentraciones de glucosa.

4.2.4 Tolerancia a altas temperaturas

En la figura 4.2.4 se observa el crecimiento de la levadura en estudio a diferentes temperaturas comenzando con 26°C y con una temperatura final de 44°C. En este caso observamos un crecimiento máximo a 29°C; mientras que a 44°C se detuvo el crecimiento. Dado que observamos crecimiento desde los 26°C, la levadura entra en la clasificación de levaduras mesófilas.

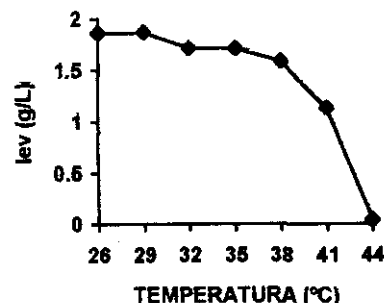


Fig. 4.2.4 Curva que representa el crecimiento de la levadura en estudio a diferentes temperaturas.

4.2.5 Resistencia al metabisulfito de sodio

Cuando se utilizaron diferentes dosis de metabisulfito de potasio en mostos se observó que para el caso del mosto de uvas blancas, la levadura en estudio resistió hasta 300 ppm, como podemos observar en la fig. 4.2.5, donde casi no hay diferencia entre 0 ppm de sulfuroso y las otras dosis empleadas, con excepción de 400 ppm donde sí se registró una inhibición severa.

Para el caso del mosto de uvas tintas, la levadura resistió hasta 200 ppm (ver fig 4.2.5), pero para el caso del mosto que no contenía sulfuroso se obtuvo mayor número de levaduras y fue disminuyendo conforme se aumentó la dosis de sulfuroso, lo cual implica que la inhibición en este caso fue más notoria, mostrándose inhibición completa a partir de 300 ppm.

Cabe mencionar que el retardo de crecimiento fue menor en los mostos de uvas tintas, como puede observarse en los primeros tres días en las gráficas 4.2.5.

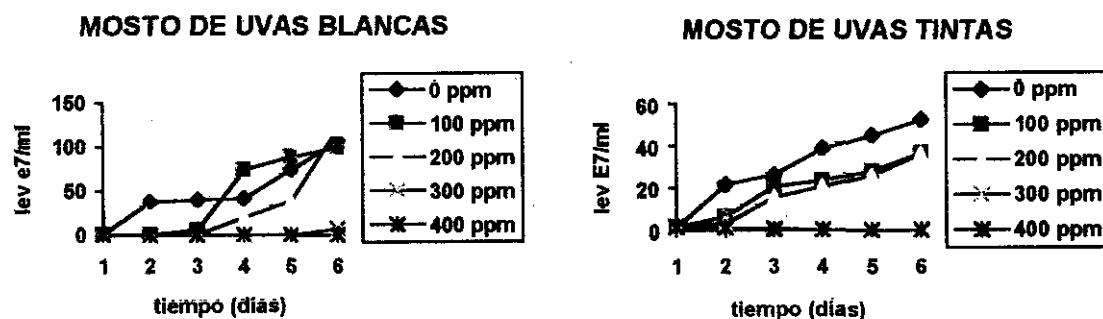


Fig. 4.2.5 Curvas que representan el crecimiento de la levadura en estudio después de seis días utilizando diferentes concentraciones de sulfuroso.

4.3 PROCESO DE VINIFICACION

Con relación a la **vinificación** se llevaron a cabo 5 tratamientos, cuya descripción y resultados de las cinéticas de fermentación se muestran a continuación:

TRATAMIENTO UNO

En este tratamiento se pasteurizó tanto el mosto de uvas tintas como el de uvas blancas, la pasteurización fue a 70°C durante 30 min. Posteriormente se adicionó el inóculo o pie de cuba, y finalmente se agregó metabisulfito de potasio en la concentración señalada.

PARA EL VINO BLANCO (VINO 1):

Se observó un retraso en el crecimiento de la levadura de estudio, en el consumo de azúcares así como en la producción de etanol, debido a la adición de metabisulfito de potasio (fig.4.3.1.). Al sexto día se observó consumo de azúcares con la respectiva producción de etanol y crecimiento de la levadura; el crecimiento tuvo un máximo al noveno día y al disminuir la cuenta de las levaduras disminuyó el consumo de azúcares, alcanzando al final de la fermentación 11 °G.L. de etanol al onceavo día.

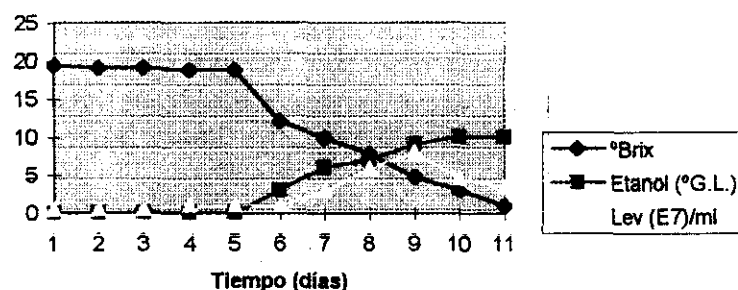


Fig.4.3.1. Gráfica que representa el consumo de azúcares (disminución de °Brix), producción de etanol (°GL) y el crecimiento microbiano (lev (E7)/ml) en vino blanco con el tratamiento 1.

PARA EL VINO TINTO (VINO A):

El consumo de azúcares se observó desde el primer día, agotando los azúcares al octavo y llegando a producir 8 °G.L., por lo que se adicionó sacarosa (fig 4.3.2.). En este caso se alcanzaron 15.6 °G.L en veintitrés días. El mayor número de levaduras fue al octavo día.

Como podemos observar esto difiere de la tolerancia que tuvo al etanol que fue de 11%. Esto podría deberse a que los mostos de uvas contienen componentes que hacen a la membrana celular de la levadura más resistente al etanol. Adicionalmente, la tolerancia medida a altas concentraciones de etanol

desde el inicio de la fermentación, resulta en una mayor inhibición que cuando el etanol es producido por la misma levadura en forma gradual a lo largo de la fermentación.

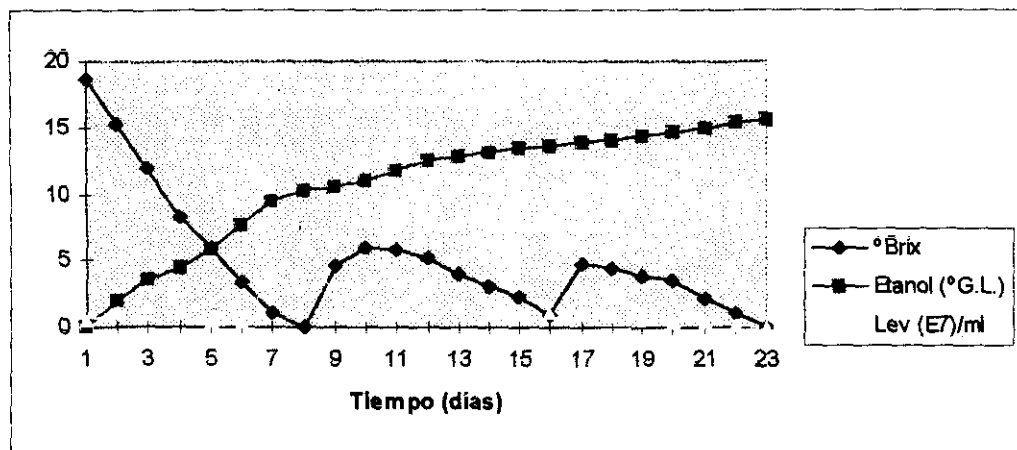


Fig. 4.3.2 Gráfica que representa el consumo de azúcares (disminución de °Brix), producción de etanol (°GL) y el crecimiento microbiano (lev (E7)/ml) en vino tinto con el tratamiento 1.

TRATAMIENTO DOS

Se pasteurizaron los mostos en las mismas condiciones que el anterior, posteriormente se adicionó el pie de cuba y NO se agregó metabisulfito de potasio.

PARA VINO BLANCO (VINO 2):

La ausencia de metabisulfito permitió el inmediato crecimiento microbiano por lo que desde el primer día se observó consumo de azúcares y producción de etanol (fig 4.3.3). Se observó el máximo número de células al octavo día, alcanzando 10 °G.L. de etanol al final de la fermentación que fue al onceavo día.

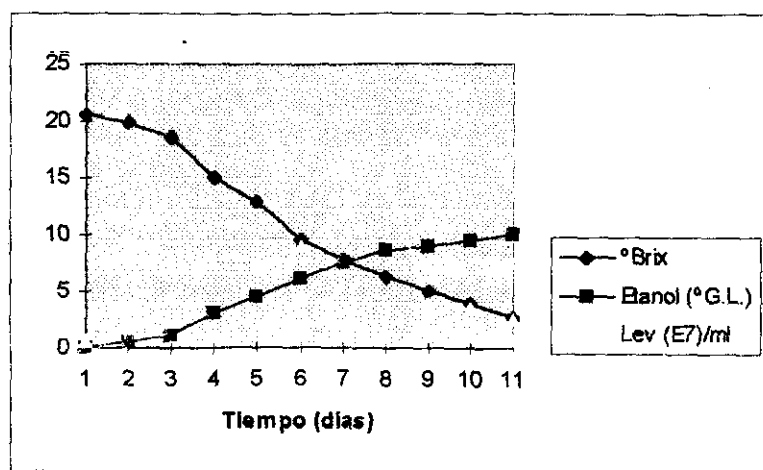


Fig. 4.3.3. Gráfica que representa el consumo de azúcares (disminución de °Bx), producción de etanol (°GL) y el crecimiento microbiano (lev (E7)/ml) en vino blanco con el tratamiento 2.

PARA VINO TINTO (VINO B):

En este caso se agotaron los azúcares al sexto día y se adicionó sacarosa, en este momento se tenían 8.5 °G.L. y finalmente se alcanzó una concentración de etanol de 15 °G.L (fig 4.3.4) en veintitrés días. La concentración máxima de levaduras se alcanzó en el noveno día.

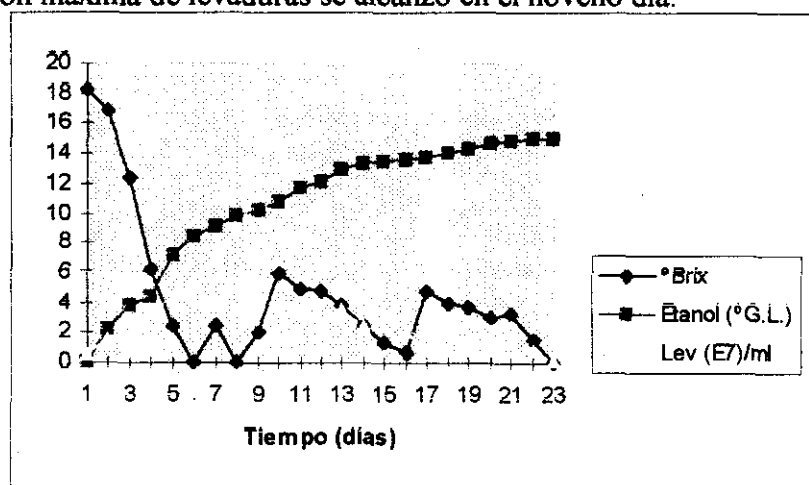


Fig. 4.3.4 Gráfica que representa el consumo de azúcares en vino tinto (disminución de °Bx), producción de etanol (°G.L) y el crecimiento microbiano (lev (E7)/ml) en vino tinto con el tratamiento 2.

TRATAMIENTO TRES

Para este tratamiento **NO** se pasteurizó el mosto, pero se adicionó el pie de cuba y se agregó metabisulfito de potasio.

PARA VINO BLANCO (VINO 3):

Se observó un retraso en la fermentación por la adición de metabisulfito, y fue hasta el noveno día donde comenzó el consumo de azúcares por parte de los microorganismos (fig 4.3.5.), su crecimiento máximo fue en el día doce y se alcanzaron 11 °G.L. en el día catorce, último día de fermentación.

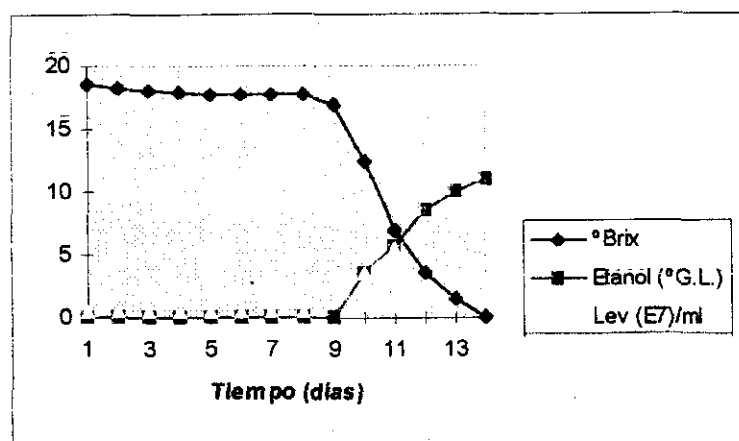


Fig. 4.3.5 Gráfica que representa el consumo de azúcares en vino blanco (disminución de °Bx) producción de etanol (°GL) y crecimiento microbiano (lev (E7)/ml) en vino blanco con el tratamiento 3.

PARA VINO TINTO (VINO C):

El consumo de azúcares se observó desde el primer día agotándose éstos al sexto, y alcanzando 8 °G.L.(fig 4.3.6), por lo que se adicionó sacarosa y al catorceavo día se alcanzaron 13 °G.L. En el onceavo día se observó el máximo crecimiento microbiano.

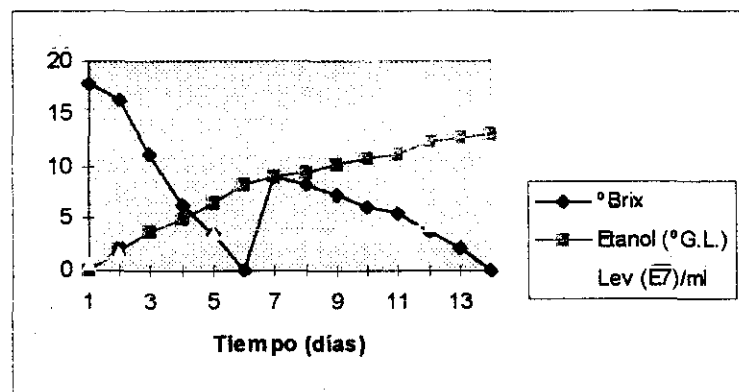


Fig 4.3.6 Gráfica que representa el consumo de azúcares (disminución de °Brix), producción de etanol (°GL) y crecimiento microbiano (lev (E7)/ml) en vino tinto con el tratamiento 3.

TRATAMIENTO CUATRO

En este tratamiento **NO** se pasteurizó el mosto, se adicionó el pie de cuba y **NO** se le agregó metabisulfito de potasio.

PARA VINO BLANCO (VINO 4):

Por la ausencia de metabisulfito, el consumo de azúcares fue inmediato, observando un crecimiento microbiano máximo al tercer día (fig 4.3.7); se obtuvieron 11 °G.L. de etanol al final de la fermentación que fue de diez días.

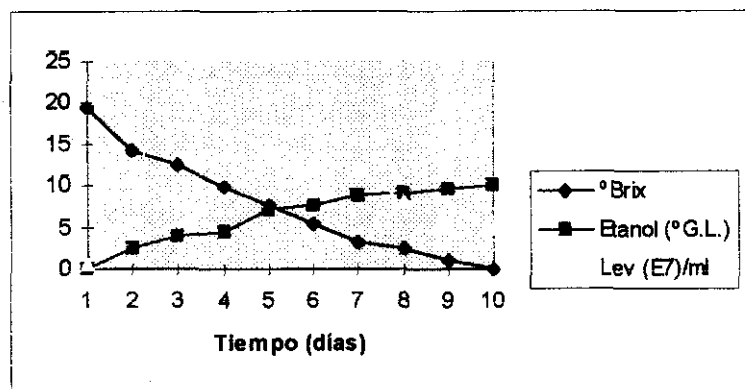


Fig. 4.3.7 Gráfica que representa el consumo de azúcares (disminución de °Brix), producción de etanol (aumento de °GL) y el crecimiento microbiano (lev (E7)/ml) en vino blanco con el tratamiento 4.

PARA VINO TINTO (VINO D):

Se agotaron los azúcares en el sexto día obteniendo 8 °G.L. pero se adicionó sacarosa y se llegó a una concentración de 11.4 °G.L (fig 4.3.8). La máxima concentración de levaduras fue en el séptimo día. La fermentación fue de 14 días.

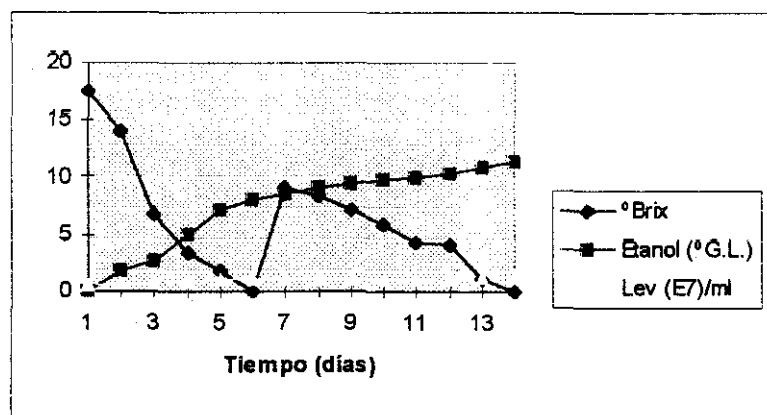


Fig 4.3.8. Gráfica que representa el consumo de azúcares (disminución de °Brix) producción de etanol (°GL) y el crecimiento microbiano (lev (E7)/ml) en vino tinto con el tratamiento 4.

TRATAMIENTO CINCO O VINO CONTROL

Esta fue una fermentación como se lleva a cabo en la industria, donde sólo se adiciona metabisulfito y NO se utiliza pie de cuba.

PARA VINO BLANCO (VINO 5):

Aquí se observó que hasta el décimo día se inició el consumo de azúcares (fig 4.3.9), pero en cuatro días más se agotaron los azúcares fermentables, y finalmente se obtuvieron 10 °G.L. en catorce días de fermentación.

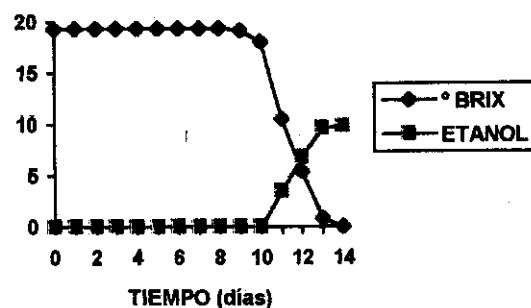


Fig 4.3.9 Gráfica que representa el consumo de azúcares (diminución de °Brix) y producción de etanol (°GL) en vino blanco con el tratamiento 5 (control).

PARA VINO TINTO (VINO E):

En este caso en el quinto día se agotaron los azúcares alcanzando una concentración de etanol de 8 ° G.L., después de adicionar sacarosa la producción final de etanol fue de 13.6 °G.L.(fig 4.3.10) en 12 días.

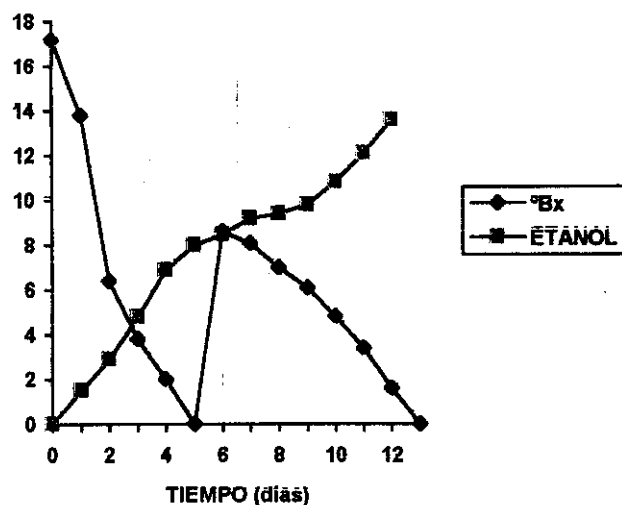


Fig 4.3.10 Gráfica que representa el consumo de azúcares (disminución de °Brix) y producción de etanol (°GL) en vino tinto con el tratamiento 5 (control).

4.4 DETERMINACION DE LA CALIDAD FISICOQUIMICA DE LOS VINOS ELABORADOS DE ACUERDO A LA NOM.

4.4.1 Determinación de etanol

En los vinos blancos 1, 2 y 3 se presentó un problema de contaminación llamada "flor", esta es una contaminación por levaduras que acidifican y enturbian el vino. Por lo que contamos sólo con los vinos 4 y 5 para continuar con los análisis.

Vino 4: Este vino no fue sulfitado y contaba con pie de cuba (inóculo)

Vino 5: Este vino fue sulfitado y no contaba con pie de cuba (inóculo).

En el análisis de etanol se obtuvo lo siguiente:

VINOS BLANCOS	
4	14.1
5	13.7

En vinos tintos se obtuvo:

Vino A: Este vino se pasteurizó, fue sulfitado y tenía pie de cuba (inóculo)

Vino B: Este vino se pasteurizó, no fue sulfitado y tenía pie de cuba (inóculo)

Vino C: Este vino no se pasteurizó, fue sulfitado y tenía pie de cuba (inóculo)

Vino D: Este vino no se pasteurizó, no fue sulfitado y tenía pie de cuba (inóculo)

Vino E: Este vino no se pasteurizó, fue sulfitado y no tenía pie de cuba (inóculo)

VINOS TINTOS	
A	14.8
C	13.3
E	13.0

4.4.2 Determinación de acidez total

En los vinos blancos se obtuvo lo siguiente:

VINO	g/L ÁCIDO TARTÁRICO
4	11.4
5	8.0

En los vinos tintos:

VINO	g/L ÁCIDO TARTÁRICO
A	7.3
B	4.8
C	7.7
D	7.1
E	8.2

4.4.3 Determinación de acidez volátil

En los vinos blancos se obtuvo lo siguiente:

VINO	g/L ÁCIDO ACÉTICO
4	0.27
5	0.27

En el caso de los vinos tintos se obtuvo:

VINO	g/L ÁCIDO ACÉTICO
A	0.28
B	0.24
C	0.24
D	0.24
E	0.27

4.4.4 Determinación de azúcares reductores directos

En las muestras de vino blanco se obtuvo lo siguiente:

VINO	g/L
4	0
5	0

Y en las muestras de vino tinto:

<i>VINO</i>	<i>g/L</i>
A	9.2
B	18.2
C	0
D	0
E	0

4.5 EVALUACION SENSORIAL

4.5.1 Atributos generados

Los atributos de sabor en el vino blanco 4 fueron:

ATRIBUTO	FRECUENCIA
alcohol	22
dulce	10
ácido	35
salado	20
limón	5
amargo	20
picante	20
manzana	6
afrutado	10
uva	15
metálico	4
astringente	3
agrio	4

Los atributos de aroma en el vino blanco 4 fueron:

ATRIBUTO	FRECUENCIA
ácido	12
alcohol	21
fermentado	5
afrutado	7
dulce	9
manzana	12
pera	3
fermento	8
vinagre	5
ajo	2
uva	9
seco	2
durazno	3
suave	4
cebolla	1

Los atributos de sabor en el vino tinto E fueron:

ATRIBUTO	FRECUENCIA
ácido	33
alcohol	29
salado	13
amargo	30
astringente	13
afrutado	9
limón	6
dulce	11
madera	4
ciruela pasa	2
moras	11
seco	12
uva	7
zarzamora	2
frutas	4

Los atributos de aroma en vino tinto E fueron:

ATRIBUTO	FRECUENCIA
alcohol	36
frutal	9
uva	18
ácido	13
dulce	14
cereza	5
jerez	3
moras	11
ciruela	2
vinagre	2
madera	3
nuez moscada	2
flores	3
cerillo quemado	2
pasas	2
jarabe	2
piloncillo	2

De acuerdo a estos resultados se eligieron los atributos de mayor frecuencia en aroma y sabor y se observó que se trataban de los mismos atributos, lo cual es de esperarse ya el sabor implica una percepción global integrada por excitaciones causadas en los sentidos del gusto y del olfato. Por esta razón se decidió que para la evaluación de todas las muestras se analizara únicamente el sabor.

4.5.2 Atributos a analizar

Para vino blanco:

<i>alcohol</i>	<i>afrutado</i>	<i>Ácido</i>	<i>dulce</i>
<i>salado</i>	<i>amargo</i>	Manzana	

Y los atributos para vino tinto

<i>ácido</i>	<i>alcohol</i>	<i>Salado</i>	<i>amargo</i>
<i>astringente</i>	seco	Uva	

4.5.3 Resultados de la evaluación sensorial

De acuerdo al cuestionario que se les proporcionó a los jueces se midió en centímetros en una escala no estructurada la intensidad de cada atributo obteniendo lo siguiente:

Para la muestra de vino blanco 4

ATRIBUTO	JUEZ 1			JUEZ 2			JUEZ 3			JUEZ 4			JUEZ 5			JUEZ 6		
	REPETICION			REPETICION			REPETICION			REPETICION			REPETICION			REPETICION		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Alcohol	5.5	6.0	3.3	1.0	2.1	3.0	5.6	5.6	3.6	2.3	2.9	2.7	3.7	4.6	4.2	2.9	3.7	3.4
Ácido	6.2	3.4	2.4	1.6	6.4	2.6	6.6	5.7	5.1	6.4	4.6	5.6	1.5	4.0	5.6	5.0	3.9	4.2
Dulce	3.5	3.1	3.8	5.6	3.4	4.0	2.6	4.0	5.6	2.8	3.4	2.9	4.1	3.8	5.0	6.1	5.2	4.3
Salado	2.8	3.6	3.8	3.6	4.7	4.8	1.9	2.7	3.5	4.1	1.5	3.0	0.5	0.3	0.5	0.2	0	0
Amargo	3.3	0.6	5.2	0.9	1.9	1.5	2.3	3.5	4.1	3.2	3.3	3.1	2.8	3.0	4.0	3.6	3.5	5
Manzana	4.7	1.3	1.3	1.1	1.5	2.2	4.4	3.0	5.5	4.5	5.4	4.8	5.5	5.0	2.2	4.8	5.9	6.1
Afrutado	7.3	5.1	0.7	1.8	2.3	4.4	5.6	4.0	4.6	0	5.7	3.2	4.1	5.5	2.8	6.4	5.4	5.6

Para la muestra de vino blanco 5:

ATRIBUTO	JUEZ 1			JUEZ 2			JUEZ 3			JUEZ 4			JUEZ 5			JUEZ 6		
	REPETICION			REPETICION			REPETICION			REPETICION			REPETICION			REPETICION		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Alcohol	4.6	0.9	2.2	1.9	1.2	1.6	4.0	2.0	2.0	0.4	1.6	1.2	2.1	2.2	3.0	2.3	0.8	1.1
Ácido	6.4	3.9	1.4	0	4.3	1.1	2.6	0.5	0.2	2.8	2.7	2.6	1.8	1.7	2.7	4.7	3.1	2.5
Dulce	7.0	3.2	3.6	2.6	2.7	4.6	1.1	1.8	0	2.8	2.7	2.7	4.1	2.8	2.0	2.8	4.2	1.8
Salado	1.3	5.3	5.0	3.4	3.8	5.4	0	0.4	0	0	0.5	0	1.0	0.4	0.4	0	0.1	0
Amargo	2.0	6.8	0.9	2.4	2.0	4.2	0.5	2.4	0.3	6.5	2.2	3.7	0	4.3	5.8	1.5	3.2	2.8
Manzana	1.2	0.4	1.5	2.2	1.0	1.6	1.5	1.8	3.3	0	3.5	2	3.8	3.7	2.7	3.8	5.9	5.7
Afrutado	2.8	0.9	2.9	2.8	1.5	2.5	1.9	3.2	2.9	0	0.7	0	3.2	3.3	2.3	3.4	4.9	6.0

Para la muestra de vino tinto C se obtuvo lo siguiente:

ATRIBUTO	JUEZ 1			JUEZ 2			JUEZ 3			JUEZ 4			JUEZ 5			JUEZ 6		
	REPETICION			REPETICION			REPETICION			REPETICION			REPETICION			REPETICION		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Alcohol	5.1	7.1	7.5	2.3	5.6	3.0	7.1	5.5	4.0	2.3	4.5	2.3	6.6	4.9	5.3	6.3	3.8	4.5
Ácido	3.0	5.1	5.7	2.4	5.3	2.3	2.7	6.9	4.5	1.3	6.2	3.2	6.0	4.3	4.8	5.3	4.2	4.1
Seco	4.0	6.5	6.6	0	4.1	1.3	4.5	4.9	4.7	1.7	2.3	2.1	2.8	2.6	2.8	5.8	5.7	4.9
Salado	2.1	1.9	4.4	6.0	4.9	4.6	0.5	2.4	1.6	1.8	1.6	0.5	0.8	0.2	0.4	0	0	0
Amargo	3.9	5.6	2.7	3.6	3.9	6.6	5.4	5.6	5.4	3.4	5.1	5.3	3.8	6.2	5.1	6.0	5.9	5.3
Astringente	1.6	4.4	1.4	0.5	1	1.3	0.1	2.4	1.5	3.8	5.1	4.8	3.0	2.8	3.1	6.8	5.8	5.4
Uva	2.7	1.5	0.7	4.7	5.0	4.2	0.4	5.5	1.7	0.3	3.5	3.5	4.4	4.9	4.6	5.0	4.5	4.6

Para la muestra de vino tinto D los resultados fueron:

ATRIBUTO	JUEZ 1			JUEZ 2			JUEZ 3			JUEZ 4			JUEZ 5			JUEZ 6		
	REPETICION			REPETICION			REPETICION			REPETICION			REPETICION			REPETICION		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Alcohol	5.4	4.6	6.7	5.0	5.4	3.0	6.7	7.1	4.0	2.5	3.7	3.8	4.0	3.8	3.5	4.1	3.2	5.5
Ácido	6.7	3.4	2.4	2.1	3.6	0.9	0.8	3.7	3.0	3.5	4.4	3.3	3.4	5.0	4.1	4.2	4.7	4.7
Seco	1.6	4.1	3.7	3.4	4.6	1.7	3.4	3.7	3.6	0.5	2.1	1.8	4.6	4.0	3.8	2.4	5.5	5.8
Salado	2.6	3.7	1.9	2.8	3.6	2.2	2.1	0	0.8	0.8	0.6	0.4	0.6	0.3	0.2	0.3	0.3	0
Amargo	6.1	6.8	1.3	3.5	2.8	0.9	7.0	7.1	5.0	3.0	4.6	3.9	0	5.0	2.0	6.0	4.1	5.4
Astringente	1.8	5.2	5.0	0.8	1.6	0.5	0.3	4.5	3.5	2.1	5.3	3.8	5.5	5.3	5.1	6.1	4.7	6.4
Uva	1.0	6.3	1.8	4.7	4.9	4.4	2.8	3.5	0	5.2	6.4	4.8	5.0	5.0	4.8	5.3	4.2	5.4

Para la muestra E los resultados fueron los siguientes:

ATRIBUTO	JUEZ 1			JUEZ 2			JUEZ 3			JUEZ 4			JUEZ 5			JUEZ 6		
	REPETICION			REPETICION			REPETICION			REPETICION			REPETICION			REPETICION		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Alcohol	6.9	7.7	7.4	5.3	6.0	6.4	7.6	7.7	6.0	4.4	4.7	3.4	4.6	5.3	4.8	4.1	7.1	7.1
Ácido	4.6	6.0	3.3	1.4	2.3	1.3	3.7	1.8	5.9	2.7	5.8	5.5	2.8	5.6	3.8	4.8	4.7	5.8
Seco	5.2	4.0	4.7	2.0	5.3	0.8	4.7	3.8	4.2	2.6	0.8	1.5	6.1	5.6	5.0	5.3	6.2	7.2
Salado	3.2	2.5	3.8	3.1	2.4	2.9	0.9	0.8	2.3	1.1	0	0	4.7	0.3	0.8	0	0.3	0
Amargo	6.4	6.6	5.4	1.5	2.4	2.9	6.4	7.3	7.1	5.6	5.5	5.5	3.1	5.6	4.8	5.4	6.4	6.1
Astringente	7.3	5.1	3.3	0.7	2.9	1.4	5.8	0	4.1	1.4	1.4	1.7	5.6	4.8	6.1	6.3	7.1	7.3
Uva	6.6	7.1	5.1	4.6	5.0	5.3	6.1	4.2	3.4	4.2	2.9	6.2	4.3	2.8	5.0	5.8	6.3	5.8

4.5.4 Análisis Estadístico

4.5.4.1 Hipótesis

Ho: Las medias para cada atributo son diferentes.

Ha: Las medias para cada atributo son iguales.

Donde se rechaza la Ha se realizó una comparación de medias por el método de Duncan para saber que muestras eran diferentes.

Se deseaba que en el caso de los vinos tintos las medias de las muestras C y E fueran iguales.

4.5.4.2 Análisis de Varianza

Para el atributo amargo se obtuvieron los siguientes resultados:

Fuente de variación	Suma de cuadrados	de g.l.	Cuadrado medio	F	nivel sig.
EFECTOS PRINCIPALES					
Muestras	0.013735	1	0.0137351	0.005	0.9467
Jueces	12.071666	5	2.9100856	0.824	0.5437
Repeticiones	5.820171	2	2.4143332	0.993	0.3836
RESIDUAL	79.130709	27	2.9307670		
TOTAL (CORREGIDO)	97.009722	35			

En este caso se observa que para el atributo amargo no existe diferencia significativa entre las muestras de vino blanco 4 y 5.

El análisis de varianza para el atributo alcohol es el siguiente:

Fuente de variación	Suma de cuadrados	de g.l.	Cuadrado medio	F	nivel sig.
EFECTOS PRINCIPALES					
Muestras	23.178819	1	23.178819	22.208	0.0001
Jueces	24.369165	5	4.873833	4.67	0.0034
Repeticiones	0.530130	2	0.265065	0.254	0.7776
RESIDUAL	28.180625	27	1.0437269		
TOTAL (CORREGIDO)	77.855556	35			

Como se observa en este análisis de varianza para el atributo alcohol, sí existe diferencia significativa entre las muestras de vino blanco 4 y 5. De aquí se realizó una prueba de Análisis de Rango Múltiple por el método de Duncan donde se observa que el atributo alcohol se detecta con mayor intensidad en la muestra 4; los resultados del análisis fueron los siguientes:

Fuente de variación	Suma de cuadrados	de g.l.	Cuadrado medio	F	nivel sig.
EFFECTOS PRINCIPALES					
Muestras	33.334181	1	33.334181	11.415	0.0022
Jueces	12.975686	5	2.595137	0.889	0.5023
Repeticiones	2.749233	2	1.374617	0.471	0.6296
RESIDUAL	78.843597	27	2.9201332		
TOTAL (CORREGIDO)	127.57889	35			

*denota una diferencia estadísticamente significativa.

Para el atributo **ácido** en las muestras 4 y 5 también se **encontró diferencia significativa** en el análisis de varianza, por lo que también se realizó un análisis de rango múltiple por el método de Duncan, y también se encontró que éste atributo era más intenso en el vino 4.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	de g.l.	Cuadrado medio	F	nivel sig.
EFFECTOS PRINCIPALES					
Muestras	33.334181	1	33.334181	11.415	0.0022
Jueces	12.975686	5	2.595137	0.889	0.5023
Repeticiones	2.749233	2	1.374617	0.471	0.6296
RESIDUAL	78.843597	27	2.9201332		
TOTAL (CORREGIDO)	127.57889	35			

Fuente de variación	Suma de cuadrados	de g.l.	Cuadrado medio	F	nivel sig.
EFFECTOS PRINCIPALES					
Muestras	11.354462	1	11.354462	6.994	0.0135
Jueces	13.849851	5	2.769970	1.706	0.1671
Repeticiones	1.048015	2	0.524008	0.323	0.7269
RESIDUAL	43.830538	27	1.6233533		
TOTAL (CORREGIDO)	68.887500	35			

*denota una diferencia estadísticamente significativa.

Para el atributo **dulce** en las muestras 4 y 5 también se **encontró diferencia significativa** en el análisis de varianza, por lo que también se realizó un análisis de rango múltiple por el método de Duncan, y también se encontró que éste atributo era más intenso en el vino 4.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	de g.l.	Cuadrado medio	F	nivel sig.
EFFECTOS PRINCIPALES					
Muestras	11.354462	1	11.354462	6.994	0.0135
Jueces	13.849851	5	2.769970	1.706	0.1671
Repeticiones	1.048015	2	0.524008	0.323	0.7269
RESIDUAL	43.830538	27	1.6233533		
TOTAL (CORREGIDO)	68.887500	35			

MUESTRA	N	ME	GRUPO
Vino 5	19	2.9545886	X
Vino 4	17	4.0919304	X
CONTRASTE		DIFERENCIA	
Vino 4 -Vino 5		1.13734 *	

*denota una diferencia estadísticamente significativa.

Para el atributo **salado** en las muestras 4 y 5 también se **encontró diferencia significativa** en el análisis de varianza, por lo que también se realizó un análisis de rango múltiple por el método de Duncan, y también se encontró que éste atributo era más intenso en el vino 4.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	de g.l.	Cuadrado medio	F	nivel sig.
EFECTOS PRINCIPALES					
Muestras	6.575444	1	6.575444	5.710	0.0241
Jueces	82.968266	5	16.593653	14.410	0.0000
Repeticiones	2.976503	2	1.488251	1.292	0.2911
RESIDUAL	31.092334	27	1.1515679		
TOTAL (CORREGIDO)	126.50972	35			

MUESTRA	N	ME	GRUPO
Vino 5	19	1.4940665	X
Vino 4	17	2.3595728	X
CONTRASTE		DIFERENCIA	
Vino 4 -Vino 5		0.86551 *	

*denota una diferencia estadísticamente significativa.

Para el atributo **manzana** en las muestras 4 y 5 también se **encontró diferencia significativa** en el análisis de varianza, por lo que también se realizó un análisis de rango múltiple por el método de Duncan, y también se encontró que éste atributo era más intenso en el vino 4.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	de g.l.	Cuadrado medio	F	nivel sig.
EFECTOS PRINCIPALES					
Muestras	14.085803	1	14.085803	8.871	0.0061
Jueces	64.011288	5	12.802258	8.062	0.0001
Repeticiones	0.305037	2	0.152519	0.096	0.9087
RESIDUAL	42.873642	27	1.5879127		
TOTAL (CORREGIDO)	115.93556	35			

MUESTRA	N	ME	GRUPOS SIGNIFICATIVOS
Vino 5	19	2.5906909	X
Vino 4	17	3.8574631	X
CONTRASTE		DIFERENCIA	
Vino 4 -Vino 5		1.26677 *	

*denota una diferencia estadísticamente significativa.

Para el atributo **afrutado** en las muestras 4 y 5 también se **encontró diferencia significativa** en el análisis de varianza, por lo que también se realizó un análisis de rango múltiple por el método de Duncan, y también se encontró que éste atributo era más intenso en el vino 4.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	de g.l.	Cuadrado medio	F	nivel sig.
EFFECTOS PRINCIPALES					
Muestras	22.863924	1	22.863924	9.945	0.0039
Jueces	51.731276	5	10.346255	4.500	0.0041
Repeticiones	0.532729	2	0.266365	0.116	0.8910
RESIDUAL	62.074409	27	2.2990522		
TOTAL (CORREGIDO)	131.44750	35			

MUESTRA	N	ME	GRUPOS SIGNIFICATIVOS
Vino 5	19	2.5628692	X
Vino 4	17	4.1767932	X
CONTRASTE		DIFERENCIA	
Vino 4 -Vino 5		1.61392 *	

*denota una diferencia estadísticamente significativa.

Una forma útil de representar todos los atributos al mismo tiempo en las muestras de vino blanco, es utilizando gráficos de araña donde se observan los promedios correspondientes a cada atributo, y donde también corroboramos los resultados obtenidos anteriormente (fig 4.5.1).

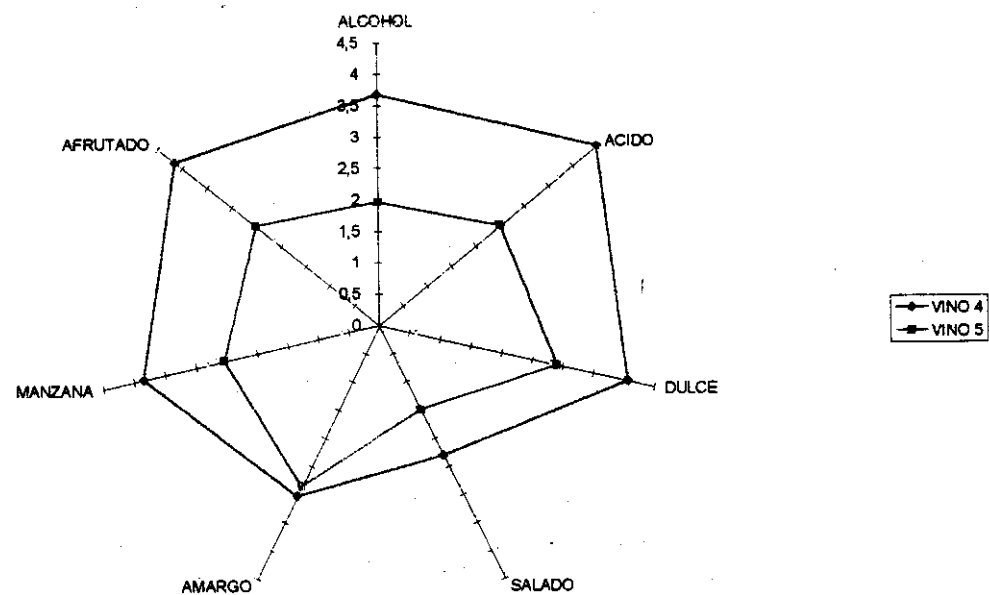


Fig. 4.5.1 Gráfico de arafia correspondiente a los atributos de sabor de los vinos blancos.

El análisis de varianza en vinos tintos fue el siguiente:

Para el atributo **alcohol** se obtuvo:

Fuente de variación	Suma de cuadrados	df	gl	Cuadrado medio	F	nivel sig.
EFFECTOS PRINCIPALES						
Muestras	18.262593	2		9.131296	7.261	0.0019
Jueces	53.503704	5		10.700741	8.509	0.0000
Repeticiones	2.767037	2		1.383519	1.100	0.3418
RESIDUAL	55.334815	44		1.2576094		
TOTAL (CORREGIDO)	129.86815	53				

Como se observa **existe diferencia significativa** entre muestras, por lo que se procedió a hacer un análisis de rangos múltiples por el método de Duncan , donde se obtuvo lo que a continuación se muestra.

MUESTRA	NÚMERO	GRUPO	GRUPO SIGNIFICATIVO
Vino d	18	4.5555556	X
Vino c	18	4.8722222	X
Vino e	18	5.9166667	X
CONTRASTE		DIFERENCIA	
Vino c - Vino d		0.31667	
Vino c - Vino e		-1.04444*	
Vino d - Vino e		-1.36111*	

*denota una diferencia estadísticamente significativa.

De aquí se obtiene que las muestras de vino tinto c y e tienen diferencia significativa, y que en la muestra e se detecta mayor intensidad del atributo alcohol, cabe mencionar que las muestras c y e contemplan el mismo tratamiento, la única diferencia es que la muestra c contiene el microorganismo de estudio y la muestra e no. De aquí que sea primordial el análisis entre éstas dos muestras, para ir observando que tan diferente resulta el adicionar un inóculo, particularmente el del objetivo de éste estudio.

Para el atributo **ácido** el análisis de varianza que se muestra a continuación revela que **no existe diferencia significativa** entre muestras.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	df	gl	Cuadrado medio	F	nivel sig.
EFFECTOS PRINCIPALES						
Muestras	5.041111	2		2.5205556	1.475	0.2398
Jueces	32.133333	5		6.4266667	3.761	0.0064
Repeticiones	13.440000	2		6.7200000	3.933	0.0268
RESIDUAL	75.178889	44		1.7086111		
TOTAL (CORREGIDO)	125.79333	53				

En lo que se refiere al atributo **seco**, el análisis de varianza reportó que **no existe diferencia significativa** entre muestras, como se observa a continuación:

Fuente de variación	Suma de cuadrados	de g.l.	Cuadrado medio	F	nivel sig.
EFFECTOS PRINCIPALES					
Muestras	6.007073	2	3.003519	2.004	0.1470
Jueces	82.823704	5	16.564741	11.050	0.0000
Repeticiones	6.565926	2	3.282963	2.190	0.1240
RESIDUAL	65.958148	44	1.4990488		
TOTAL (CORREGIDO)	161.35481	53			

En lo referente al atributo **salado** el análisis de varianza determinó que **no existe diferencia significativa** entre muestras como se observa a continuación:

Fuente de variación	Suma de cuadrados	de g.l.	Cuadrado medio	F	nivel sig.
EFFECTOS PRINCIPALES					
Muestras	3.670000	2	1.835000	2.077	0.1374
Jueces	98.206667	5	19.641333	22.232	0.0000
Repeticiones	1.084444	2	0.542222	0.614	0.5459
RESIDUAL	38.872222	44	0.8834596		
TOTAL (CORREGIDO)	141.83333	53			

En el análisis de varianza para el atributo **amargo** se observó que **sí existe diferencia significativa** entre muestras, como se ve a continuación:

Fuente de variación	Suma de cuadrados	de g.l.	Cuadrado medio	F	nivel sig.
EFFECTOS PRINCIPALES					
Muestras	11.329259	2	5.664630	3.146	0.0529
Jueces	57.309815	5	11.461963	6.365	0.0002
Repeticiones	9.610370	2	4.805185	2.668	0.0806
RESIDUAL	79.233704	44	1.8007660		
TOTAL (CORREGIDO)	157.48315	53			

De aquí se realizó un análisis de varianza de rango múltiple utilizando el método de Duncan, para conocer que muestras eran diferentes, y como se observa a continuación, tenemos diferencia significativa entre las muestras de vino d y e; en este caso se observó que el atributo amargo es más intenso en la muestra e.

MUESTRA	Nº DE VOTOS	MEDIA	GRUPO HOMOGÉNEO
Vino d	18	4.1388889	X
Vino c	18	4.9333333	XX
Vino e	18	5.2222222	X
CONTRASTE		DIFERENCIA	
Vino c - Vino d		0.79444	
Vino c - Vino e		-0.28889	
Vino d - Vino e		-1.08333*	

*denota una diferencia estadísticamente significativa.

En lo que se refiere al atributo **astriigente** el análisis de varianza muestra que **no existe diferencia significativa** entre muestras.

Fuente de variación	Suma cuadrados	de g.l.	Cuadrado medio	F	nivel sig.
EFECTOS PRINCIPALES					
Muestras	9.08481	2	4.542407	1.979	0.1503
Jueces	135.85259	5	27.170519	11.836	0.0000
Repeticiones	2.78037	2	1.390185	0.606	0.5502
RESIDUAL	101.00148	44	2.2954882		
TOTAL (CORREGIDO)	248.71926	53			

Finalmente para el atributo **uva** al análisis de varianza muestra que **sí existe diferencia significativa** entre muestras:

Fuente de variación	Suma cuadrados	de g.l.	Cuadrado medio	F	nivel sig.
EFECTOS PRINCIPALES					
Muestras	23.379259	2	11.689630	5.244	0.0091
Jueces	27.365370	5	5.473074	2.455	0.0478
Repeticiones	4.819259	2	2.409630	1.081	0.3481
RESIDUAL	98.083704	44	2.2291751		
TOTAL (CORREGIDO)	153.64759	53			

El análisis de rango múltiple mostró diferencia significativa entre la muestra de vino c y e, y también en este caso encontramos que en el vino e el atributo **uva** es más intenso.

MUESTRA	Nº	ME	GRUPO
Vino c	18	3.4277778	X
Vino d	18	4.1944444	XX
Vino e	18	5.0388889	X
CONTRASTE		DIFERENCIA	
Vino c - Vino d		-0.76667	
Vino c - Vino e		-1.61111*	
Vino d - Vino e		-0.84444	

*denota una diferencia estadísticamente significativa.

Los vinos tintos también se presentan a continuación en un gráfico de araña como se observa en la figura 5.4.2.

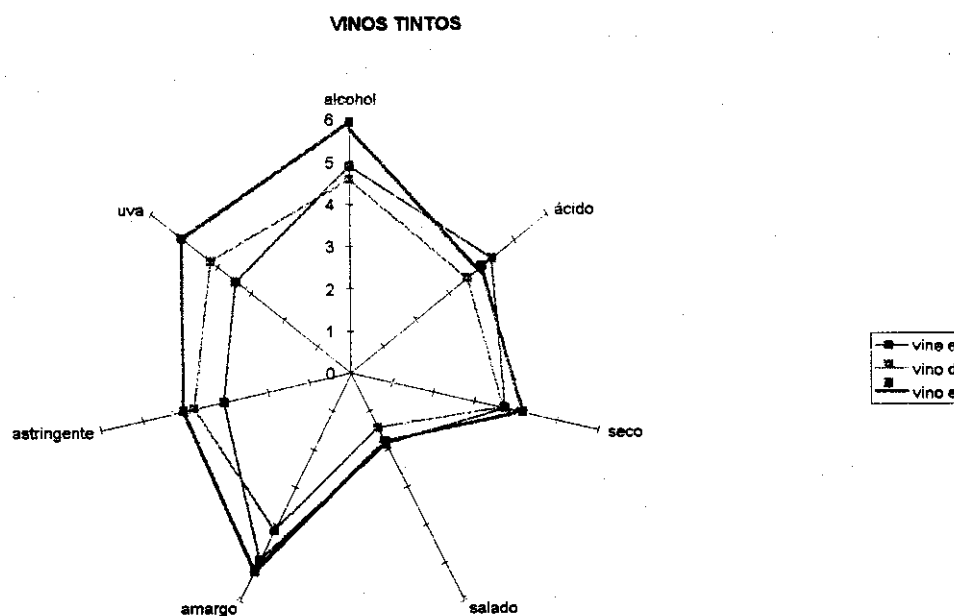


Fig. 5.4.2 Gráfico de araña correspondiente a los vinos tintos

4.6 PERFILES CROMATOGRAFICOS

4.6.1 Cromatografía de Gases

Se eligieron los picos de mayor área, y se observó que entre los vinos 4 y 5 (vinos blancos) y entre los vinos C y D (vinos tintos) coincidían los tiempos de retención (con un intervalo de diferencia entre muestras de aproximadamente 0.01-0.1 min). Posteriormente se eligió el pico de mayor área para cada tipo de vino y se consideró como el 100% para después obtener el porcentaje correspondiente a los demás picos a partir de éste.

Para los vinos blancos se obtuvo lo siguiente:

Vino 4

En este vino se obtuvieron 132 picos.

Nota: el porcentaje uno (%1) se refiere al % de ese pico con respecto al del tiempo de retención de 10.2 min, es decir del pico de mayor área.

<i>Tiempo de Retención (min)</i>	<i>%1</i>
2.895	19.314
6.905	2.453
8.353	1.118
8.730	4.362
8.833	2.955
8.867	2.73
9.063	51.435
9.4	8.044
9.482	2.961
9.939	1.199
10.015	1.276
10.2	100
10.966	12.922
11.531	1.781
12.268	2.126
13.141	1.051
13.235	7.477
13.68	31.249

Vino 5

En este vino también se obtuvieron 132 picos.

El pico de mayor área en este vino se detectó a los 10.216 min que se tomó como 100%

Time (min)	Area
2.905	14.709
6.910	2.705
8.350	1.262
8.735	6.503
8.837	2.409
8.871	3.01
9.064	24.7
9.428	8.772
9.485	2.418
9.945	1.27
10.02	1.531
10.216	100
11	16.098
11.536	26.186
12.276	3.257
13.15	1.753
13.28	15.835
13.698	47.742

Y para los vinos tintos:

Vino C

En este vino se obtuvieron 120 picos.

El de mayor área se detectó a los 9.075 min.

Time (min)	%I
2.909	42.262
5.089	2.694
7.22	2.547
8.842	2.518
9.075	100
11.09	6.727
11.83	3.411
13.227	3.013
13.695	42.298
15.41	35.942
20.942	4.627

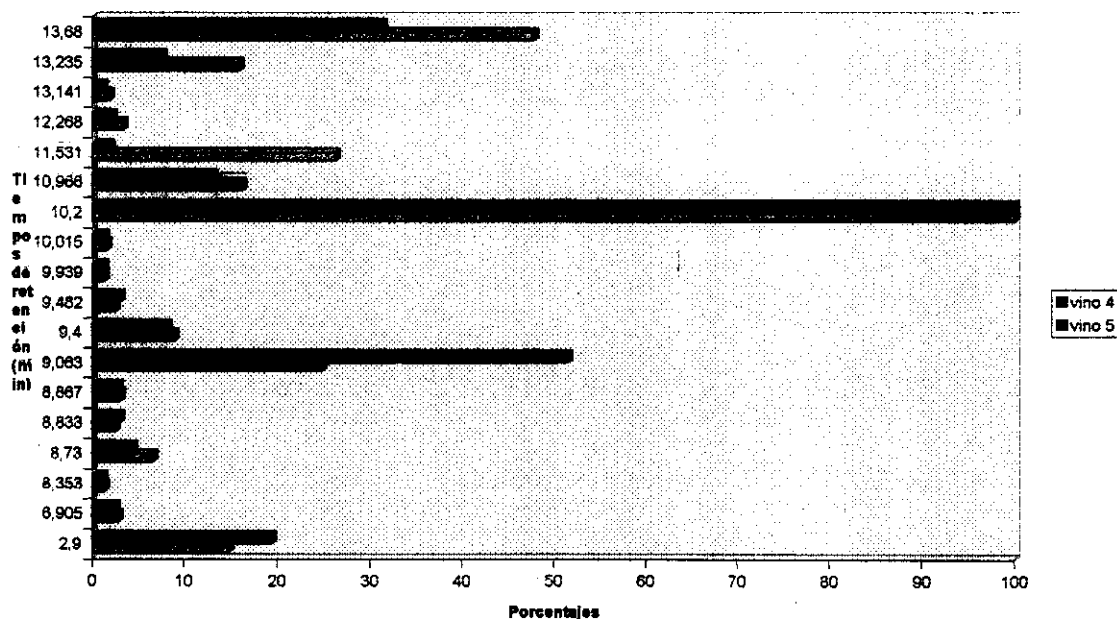
Vino E

En este otro se obtuvieron 110 picos, y el pico de mayor área está a los 9.073 min.

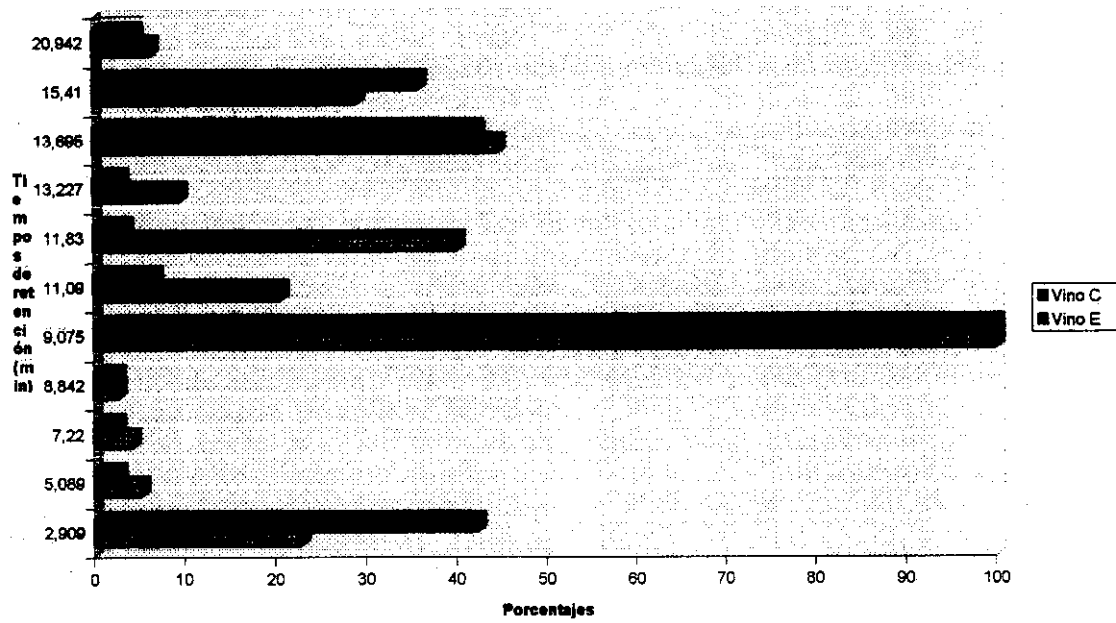
Tiempo de Retención (min)	%I
2.909	22.793
5.093	5.168
7.223	4.229
9.073	100
11.021	20.56
11.709	40.045
13.3	9.454
13.691	44.622
15.403	29.097
20.941	6.414
8.743	2.637

De aquí se graficaron los datos que aparecen a continuación, donde se observa que tienen perfiles similares y que sólo difieren en concentración. Lo mismo se observa para los vinos tintos.

VINOS BLANCOS



VINOS TINTOS



4.7 ESPECTROMETRIA DE MASAS

Se inyectaron en el Espectrómetro de Masas sólo las muestras C y E de vino tinto, ya que en el caso de los vinos blancos no existe un vino con el inóculo de estudio y todos los demás parámetros fijos (Sulfitación, no pasteurización).

El objetivo era identificar algunos de los compuestos provenientes de ambos vinos tintos y comparar los posibles compuestos de los que esté constituido. Se obtuvieron los siguientes resultados Para el Vino C:

En estos resultados se procedió de la misma forma que en el caso anterior, es decir se tomó el pico de mayor área como 100% y se calculó el porcentaje (%2) correspondiente de los demás picos con respecto al del pico que se obtuvo a los 17.006 min.

<i>Tiempo de Retención (min)</i>	<i>%2</i>
6.796	10.31
10.870	1.07
13.955	0.81
14.209	3.26
15.932	0.73
17.006	100
17.418	0.40
18.393	1.95
18.634	40.28
19.739	8.46
20.828	14.12
22.318	15.72
23.688	5.86
24.706	31.76
28.190	21.22

Para el Vino E

En este vino se obtuvo el pico de mayor área a los 17 min.

Tiempo de Retención (min)	%
6.801	7.33
10.882	2.33
13.979	1.36
14.232	3.85
15.932	0.58
17	100
17.429	3.24
18.394	1.99
18.645	42.49
19.745	17.1
20.838	35.74
22.461	7.83
23.703	4.61
24.679	39.09
28.145	20.2

En este caso también se encontraron coincidencias en tiempos de retención, y con la ayuda de la biblioteca integrada al Espectrometro de Masas se identificó a que compuesto correspondía cada pico en los tiempos de retención anteriores.

En la siguiente tabla se muestran los tiempos de retención correspondientes, los compuestos posibles y el porcentaje en el que el compuesto del pico se parece al compuesto que propone la biblioteca integrada al Espectrómetro de Masas.

Para el Vino C

Tiempo de Retención (min)	compuesto posible	%
6.796	3-metil-1-butanol	83
10.870	ácido octanoico etil éster	64
13.955	ácido fórmico heptil éster	43
14.209	ácido butanedioico, dietil éster	56
15.932	ácido acético fenil éster	64
17.006	Bencenetanol	86
17.418	ácido hexanoico, 2 etil	83
18.393	ácido butanediolico-hidroxil-dietil éster	64
18.634	ácido octanoico	70
19.739	ácido hexanoico	59
20.828	ácido decanoico	64
22.318	ácido butanedioico dietil éster	50
23.688	ácido dodecanoico	91
24.706	ácido 1,2-bencendicarboxílico butil-8-metil	59
28.190	ácido 1,2-bencendicarboxílico butil-2-etil	83

Para el Vino E

tiempo de Retención (min)	compuesto posible	%
6.801	3-metil-1-butanol	78
10.882	ácido octanoico etil éster	95
13.979	ácido fórmico heptil éster	83
14.232	ácido butanedioico, dietil éster	83
15.932	ácido acético fenil éster	78
17	Bencenetanol	83
17.429	ácido hexanoico, 2 etil	50
18.394	ácido butanedioico-hidróxi-dietil éster	78
18.645	ácido octanoico	52
19.745	ácido hexanoico	64
20.838	ácido decanoico	53
22.461	ácido butanedioico dietil ester	45
23.703	ácido dodecanoico	98
24.679	ácido 1,2-bencendicarboxílico butil-8-metil	74
28.145	ácido 1,2-bencendicarboxílico butil-2-etil	83

Como se observa en las dos tablas anteriores se encuentran los mismos compuestos sólo que difieren en el porcentaje en el que se parecen al pico correspondiente, pero finalmente es muy alta la probabilidad de que se trate de los mismos compuestos.

Se encontraron compuestos que se han definido anteriormente y que son constituyentes habituales de los vinos, y de los vinos elaborados específicamente con *Cabernet Sauvignon*. Analizando los aproximadamente 50 picos que se obtuvieron se encontraron muchos compuestos esperados, como ésteres de ácidos grasos, ácidos grasos, pirazinas y lactonas fundamentalmente. (Ver tablas II y III)

Tabla II. Posibles compuestos y sus tiempos de retención en el vino C.

tiempo de retención	compuesto	%
12.605	ácido fórmico hexil-éster	38
13.533	butirolactona	83
14.426	3-ciclohexeno-1-metanol,a,a	42
15.245	1-pentanol, 4-metil	47
15.631	1-(metoximetil)-aziridina	53
15.715	ácido butanoico, etil éster	12
16.294	ácido hexanoico	83
18.634	ácido octanoico	70
24.062	1-pentanol-2-metil	33

Tabla III. Posibles compuestos y sus tiempos de retención en el vino E.

tiempo de retención	Compuesto	%
13.304	etanol, 2-etilenoxi	23
15.233	1-decanol	83
15.703	ácido acético-etil-éster	27
16.270	ácido dodecanoico, etil-éster	91
16.330	ácido hexanoico	78
16.487	ácido butanoico, butil-éster	64
16.632	ácido propanoico, 2-metil, 1- (1,1-dimetil)	83
17.610	Ciclopropano, nonil	90
20.289	3-(1-metil-propil), 2-metoxi-pirazina	17

capítulo V

ANALISIS DE RESULTADOS

5.1 RESISTENCIA DE LA LEVADURA EN ESTUDIO CONTRA LEVADURAS ZIMOCIDAS

Una vez realizadas las pruebas de resistencia de la cepa de estudio contra las levaduras aniquilantes sólo la levadura *Kluyveromyces marxianus*, productora de la toxina K10 resultó ser letal sin embargo, este es un género que no encontramos en la vinificación, por lo que no representaría problema en este tipo de fermentaciones.

5.2 CARACTERIZACION DE LA LEVADURA EN ESTUDIO.

5.2.1 Tolerancia al etanol

La levadura resistió 11%(V/V) de etanol y se encuentra reportado que algunas cepas de la especie *Saccharomyces cerevisiae* resisten hasta 13% (V/V) (Rose, 1987), aunque cabe aclarar que en la elaboración de vinos se obtiene etanol a partir de la conversión de los azúcares en alcohol y que en este caso tuvimos que la levadura en estudio producía 15.6%(V/V) de etanol, pero podemos ver con estos dos resultados la diferencia de adicionar altas concentraciones de etanol y la producción progresiva de este metabolito que se da cuando la levadura va convirtiendo el sustrato en alcohol. Para la elaboración de vinos se estipula que se requieren 12.5% (V/V) de etanol como máximo, lo cual nuestra levadura produce perfectamente.

5.2.2 Determinación del pH del crecimiento

El pH es otro parámetro importante en la elaboración de vinos, ya que como partimos de un mosto de uvas que va a ser utilizado como sustrato para convertirlo en alcohol, es necesario que la levadura crezca en las condiciones de pH en las que se encuentra el mosto, el cual es alrededor de 4. (Amerine, 1976). De acuerdo con esto se obtuvo que el máximo crecimiento de nuestra levadura fue a pH 4, con lo cual nos aseguramos que la levadura de estudio propuesta crecerá en esas condiciones.

5.2.3 Crecimiento a altas concentraciones de sustrato

El mosto de uvas en México tiene 200 g/l de azúcares fermentables, y el resultado que obtuvimos fue que la levadura en estudio creció hasta en 320 g/l de glucosa, lo cual nos da una amplia osmotolerancia. Además está reportado que la especie *Saccharomyces cerevisiae* crece en concentraciones de 220 g/l como máximo, (Jones, 1981) por lo cual resulta muy interesante el resultado obtenido.

5.2.4 Tolerancia a altas temperaturas

En cuanto a la temperatura observamos que creció hasta 41°C, y se tiene reportado que la especie *Saccharomyces cerevisiae* tolera hasta 40°C pero su máximo crecimiento está entre 28 y 35°C (Jones, 1981), lo cual concuerda con nuestros resultados.

5.2.5 Resistencia al metabisulfito de sodio

Una vez obtenido el mosto de uvas para la elaboración de vinos, es necesario eliminar algunos microorganismos indeseables, y esto se logra con la adición de metabisulfito de sodio o de potasio en dosis máximas en vinos blancos de 275 ppm y en vinos tintos de 175 ppm (García-Garibay, *et al*, 1993), por lo cual fue necesario probar la tolerancia de la levadura en estudio contra este antimicrobiano, donde se obtuvo que para mostos de uvas blancas resiste hasta 300 ppm y en mostos de uvas tintas hasta 200 ppm, con lo que nos aseguramos de que crezca en esas condiciones.

5.3 PROCESO DE VINIFICACION

En lo referente a las vinificaciones podemos decir que la levadura se adaptó mejor al mosto proveniente uvas tintas, ya que aunque tenía metabisulfito de potasio, consumió los azúcares desde el primer día, y en el caso del mosto de uvas blancas fue después del cuarto día.

El consumo de azúcares fermentables se observó más pronunciado en el mosto de uvas tintas pero con una menor eficiencia en la producción de etanol. Esto puede deberse a que como se deja en contacto el hollejo con el mosto y aunque se pasteurice, existen otros microorganismos que consumen los azúcares, lo cual no se da en los mostos de uvas blancas.

El metabisulfito de potasio tuvo mayor influencia en los mostos que contenían el pie de cuba así como los microorganismos asociados al mosto de uvas blancas, esto no se observó en el mosto obtenido de uvas tintas con microorganismos asociados.

Un resultado importante es que en el caso del mosto de uvas blancas, aunque se le adicionó sacarosa después de agotarse el azúcar que provenía de la uva, no hubo mayor concentración de levaduras, de hecho no se encontraron levaduras viables, lo que sí se observó en el mosto de uvas tintas, y que sirvió como un indicio de qué tanto etanol producía y toleraba la levadura.

5.4 DETERMINACION DE LA CALIDAD FISICOQUIMICA DE LOS VINOS ELABORADOS DE ACUERDO A LA NOM

5.4.1 Determinación de etanol

Como se puede observar los vinos tintos A y B no se encuentran dentro de lo que estipula la Norma Oficial Mexicana, ya que éstos vinos se utilizaron para conocer la producción de etanol de la levadura, por lo que en este caso se adicionó más sacarosa. En los vinos blancos encontramos que ambos se encuentran dentro de la Norma Oficial Mexicana.

5.4.2 Determinación de acidez total

Con relación a acidez total se observa que todos los vinos se encuentran dentro de la norma, y en el caso de los vinos blancos sólo el vino 4 se encuentra por encima de ella, lo cual lo hará un vino no aceptable en acidez para el consumidor.

5.4.3 Determinación de acidez volátil

En cuanto a la acidez volátil observamos que todos los vinos se encuentran dentro de lo que establece la norma.

5.4.4 Determinación de azúcares reductores directos

Sólo se encontraron azúcares reductores directos en las muestras de vino tinto denominadas como A y B, ya que a ambas, como se había mencionado anteriormente, se les adicionó más azúcar para lograr la mayor concentración de etanol que pudiera producir la levadura en estudio.

5.5 EVALUACION SENSORIAL

Para los atributos que se definieron en los vinos blancos se encontró que el único atributo que no era significativamente diferente entre muestras fue amargo, pero en los demás atributos sí se encontró diferencias significativas entre ellas y además que el vino 4 era más intenso que en el vino 5 en todos los atributos en que hubo diferencia; estas diferencias se esperaban ya que las muestras provienen de vinos con tratamientos diferentes.

Los tratamientos a los que fue expuesto el vino 4 fueron:

1. El vino no fue sulfitado, esto implica que algunos microorganismos pudieron desarrollarse (como del género *Apiculata*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Hansenula* (Reyes, et al, 1992), por mencionar algunas) además del inóculo y de los microorganismos que regularmente permanecen en la fermentación después de sulfitarse (como los del género *Saccharomyces*); este aumento en la población microbiana puede dar origen a la producción de un número mayor de compuestos que en su conjunto modifican el sabor y aroma del vino.
2. Este vino contenía el microorganismo de estudio, lo que posiblemente contribuyó a las diferencias encontradas entre estos dos vinos blancos.

En el caso de los vinos tintos se contaba con la contraparte del vino que contiene al microorganismo de estudio y todos los demás tratamientos tradicionales en una vinificación, y el vino e es un vino con vinificación tradicional, (tradicional significa la vinificación que se realiza en la Compañía Vinícola que proporcionó sus instalaciones para el estudio).

De aquí que el análisis resulte de gran importancia entre estas dos muestras más que con la del vino d cuya única diferencia es de que no fue sulfitado.

Se observó que hubo diferencia significativa entre las muestras c y e en los siguientes atributos:

Alcohol: el análisis de rango múltiple nos muestra que este atributo es más intenso en el vino e, lo cual no corresponde con los análisis químicos reportados anteriormente, los cuales muestran que el vino c contenía 13.3 °G.L. de etanol y para el vino e era de 13.0 °G.L.; como se observa se contraponen los valores, esto puede deberse a que posiblemente se evaporó el etanol de la muestra c, o a que como la diferencia de graduación alcohólica es de solo 0.3 °G.L., exista una saturación por parte de los jueces y no detecten esta diferencia, además como el vino se prueba sin diluir la combinación de compuestos puede provocar en la lengua una sensación de alcohol más fuerte en una muestra que no contenga la más alta concentración de etanol.

Uva: este atributo fue más intenso en el vino e que en el vino c, esto puede deberse a que los compuestos que dan el sabor que se relaciona con uva se encuentren en mayor proporción; lo que lo determinaría sería el conocer primero cuales son los compuestos responsables y después determinarlos químicamente.

Sólo se encontró que en estos dos atributos existe diferencia significativa entre nuestras muestras de interés, aunque existe duda en el atributo alcohol, ya que difieren con los resultados fisicoquímicos.

5.6 CROMATOGRAFIA DE GASES Y ESPECTROMETRIA DE MASAS.

En el capítulo correspondiente al análisis sensorial se observó que el vino C y el vino E no diferían mucho sensorialmente; un aspecto interesante es que muchos de los atributos que se describieron en el análisis sensorial, por ejemplo la acidez (constituida por el ácido hexanoico), se identificó en el espectrómetro de masas.

Se menciona en la introducción que en el caso de vinos elaborados con levaduras activas, es decir, utilizando un inóculo, encontramos en mayor concentración el 3-metil-1-butanol, que efectivamente se observa en los resultados. Así también se mencionaba que en general entre los compuestos más importantes que son producidos por los microorganismos están los ésteres, los ácidos grasos y los alcoholes superiores, y en este estudio pudimos constatar que se encontraron algunos de estos compuestos responsables del metabolismo microbiano y que se produjeron tanto en el caso del vino que contenía a nuestro microorganismo de estudio como en el caso donde sólo se encontraban los microorganismos asociados a las uvas.

capítulo VI

CONCLUSIONES

Como lo demuestran los resultados se puede concluir que la cepa *Saccharomyces cerevisiae* var. *chevalieri*, fue resistente a la mayoría de las levaduras zimocidas que se probaron, específicamente son importantes las levaduras zimocidas que cuentan con el factor zimocidas K_2 y K_3 , que son las que normalmente podrían contaminar el proceso de vinificación.

Dado que las vinificaciones se llevan a cabo utilizando la flora asociada a la uva habría muchas posibilidades de encontrar cepas zimocidas de diferentes tipos, aunque en los trabajos reportados solo mencionan a K_2 y K_3 .

En cuanto a la producción de etanol se puede decir que la cepa en estudio se encuentra dentro del rango reportado por Castelli (Farkâs, 1988) para cepas de esta especie; como puede observarse en la Tabla 1 la producción de etanol es comparable a las concentraciones máximas reportadas para especies utilizadas en vinificación como *S. bayanus* y *S. Ellipsoideus*; ésta última se usa en cultivos puros.

Cuando se adicionó SO_2 a los mostos de uvas, se observó en el caso de los vinos blancos que retardó su crecimiento pero no fue letal para la cepa de estudio, y eso se observó también con los microorganismos normalmente asociados a las uva. En el vino tinto pudo resistir la concentración adicionada de SO_2 perfectamente, lo cual se concluye que también tolera el SO_2 en las concentraciones utilizadas en la vinificación.

En forma general se puede decir que la cepa en estudio podría utilizarse para la elaboración de vinos en cuanto a que puede producir el etanol necesario para la elaboración de este producto y podría sobrevivir en el caso de que hubiese una contaminación por levaduras zimocidas.

Se puede observar que la levadura cuenta con todas las características que se pueden exigir en una cepa que se use para elaborar vinos: primero esta cepa utiliza los azúcares en las concentraciones que se encuentran normalmente en los mostos, resiste las concentraciones de metabisulfito de sodio usadas que están entre 100-150 ppm, crece a la temperatura usada en la elaboración de vinos y al pH del mosto.

Además resiste las toxinas provenientes de levaduras zimocidas fundamentalmente las toxinas K_2 y K_3 que pueden contaminar los mostos de uvas.

Cómo se puede observar en todos los análisis químicos realizados, los vinos utilizados para comparar la levadura en estudio, en el caso de los vinos tintos las muestras C y D, se encuentran bajo lo que especifica la Norma Oficial Mexicana. Desgraciadamente se tuvo que desechar la contraparte de la muestra en vino blanco (muestra 3), pero los vinos que no sufrieron contaminación, se encuentran dentro de la norma, excepto el vino 4 que presenta una acidez total de 11.4

De acuerdo a las hipótesis presentadas se puede concluir que no todos los atributos sensoriales entre los vinos 4 y 5 y los vinos tintos C,D y E difieren, esto significa que existen diferencias entre los vinos pero existen atributos que no son significativamente diferentes.

De los resultados obtenidos de la evaluación sensorial no podemos concluir que la cepa no contribuya a sabores extraños o muy diferentes a los que se producen en una vinificación.

En cuanto a los perfiles cromatográficos obtenidos se pudo constatar que tanto los perfiles obtenidos en el Cromatógrafo de Gases como los del Espectrómetro de Masas, presentan gran similitud entre el vino elaborado con el inóculo de estudio y con el vino elaborado con los microorganismos asociados a la uva, por lo que se puede decir que el inóculo tiene un potencial enológico ya que no se aleja o no confiere compuestos diferentes a los que se esperan en una vinificación tradicional; lo único que se ha observado es que se produce el mismo tipo de compuestos pero en diferente concentración.

Un aspecto interesante es que muchos de los atributos que se describieron en el análisis sensorial por ejemplo la acidez (constituida por el ácido hexanoico), se identificó en el espectrómetro de masas.

En forma general con base en todos los trabajos que se han realizado la levadura *Saccharomyces cerevisiae* var. *chevalieri*, se concluye que puede ser utilizada como inóculo puro para fermentaciones vínicas, y que además cuenta con resistencia a levaduras aniquilantes y cumple con todos los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos que contribuyen a la elaboración de un vino de calidad.

BIBLIOGRAFIA

1. Amerine, M., (1976), ANALISIS DE VINOS Y MOSTOS, Ed. Acribia, Zaragoza España.
2. Acree T. y Cottrell H., (1985), CHEMICAL INDICES OF WINE QUALITY, En: Alcoholic Beverages, Ed. Birch and Lindley Elsevier Applied Science Publisher, Inglaterra.
3. Bevan, E.A. y Makower M., (1963), THE PHYSIOLOGICAL BASIS OF THE KILLER CHARACTER IN YEAST. En: Genetics Today, XIth Int. Congr. Genet., Vol.1 S.J: Geerts (Ed.), Pergamos Press, Oxford.
4. Boone, C., Bussey H., Greene, D., Thomas, D.Y. y Vernet, T., (1986), YEAST KILLER TOXIN: SITE DIRECTED MUTATIONS IMPLICATE THE PRECURSOR PROTEIN AS THE IMMUNITY COMPONENT, Cell 46, 105-13.
5. Bussey, H., y Skipper, N., (1975), MEMBRANE MEDIATED KILLING OF *Saccharomyces cerevisiae* BY GLYCOPROTEINS FROM *Torulopsis glabrata*, J. Bacteriol., 113, 1193.
6. Bussey, H., (1981), PHYSIOLOGY OF KILLER FACTOR IN YEAST, Adv. Microbial Physiol. 22, 93-112.
7. Cansado, J., Longo, E., Calo, P., Sieiro, C., Velázquez, J. y Villa, T., (1991), Appl. Microbiol. Biotechnol., 34, 643-7.
8. Carrau, F., (1993), STUCK WINE FERMENTATIONS: EFFECT OF KILLER/SENSITIVE YEAST INTERACTIONS, J. Ferment. Bioeng., 76, 67-9.
9. De la Peña, P., Barros, F., Gascón, S., Lazo, P. y Ramos, S., (1981), EFFECT OF YEASTS KILLER TOXIN ON SENSITIVE CELLS OF *Saccharomyces cerevisiae*, J. Biol. Chem., 256, 10420-5.
10. Estrada, A., (1996), TESIS: AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LEVADURAS CON FACTOR ZIMOCIDA DEL PULQUE Y AGUAMIEL, Facultad de Química, UNAM, México.
11. Extremera, A. Y Montoya, E., (1980), THE PARTIAL PURIFICATION, SEPARATION AND PROPERTIES OF YEASTS KILLER TOXINS, Microbios, 27, 33-40.
12. Falqué, E., Darriet, P., Fernández, E. y Dubourdieu, D.(1996), COMPUESTOS AROMATICOS DE UN VINO POR ACOPLAMIENTO C.G.-E.M. "SNIFFONG", Alimentaria, 96, 81-4

13. Farkás, J., (1988), TECHNOLOGY AND BIOCHEMISTRY OF WINE, Gordon and Breach Science Publishers, Czechoslovakia.
14. García-Garibay, M., Quintero, R. y López-Munguía, A., (1993), BIOTECNOLOGIA ALIMENTARIA, Edit. Limusa, México.
15. Guadagni, D., Buttery, R. y Okano, S., (1963), ODOUR THRESHOLD OF SOME ORGANIC COMPOUNDS ASSOCIATED WITH FOOD FLAVOURS, J. Sci Food Agric. 14, 761-5.
16. Heard, G.M. y Fleet, G.H., (1987), OCCURRENCE AND GROWTH OF KILLER YEASTS DURING WINE FERMENTATIONS, Appl. Environ. Microbiol. 51, 539-45.
17. Hooper, J., Bostian, K., Rowe, L. y Tipper, D., (1977), J. Biol Chem, 252, 9010.
18. Jellinek, G., (1985), SENSORY EVALUATION OF FOOD, Edit. VCH, USA.
19. Jones, R., Pamment, N., y Greenfield, P., (1981), ALCOHOL FERMENTATION BY YEASTS- THE EFFECT OF ENVIRONMENTAL AND OTHER VARIABLES, Process. Biochem, 16, 42-9.
20. Kitano, K., Sato, M., Shimazaki, T., Hara, S., (1984), OCCURRENCE OF WILD KILLER YEASTS IN JAPANESE WINERIES AND THEIR CHARACTERISTICS, J. Ferment. Technol., 62, 1-6.
21. Kurzweilová, H. y Sigler, K., (1993), FACTORS AFFECTING THE SUSCEPTIBILITY OF SENSITIVE YEAST CELLS TO KILLER TOXIN K1, Folia Microbiol., 38, 524-6.
22. Lorenzo, M., (1996), ESTUDIO DE LOS COMPONENTES VOLATILES RESPONSABLES DEL AROMA EN EL VINO, Tesis Facultad de Química UNAM México.
23. Margalith, P., (1981), FLAVOR MICROBIOLOGY, Charles C. Thomas Publisher, Springfield Illinois, EU.
24. Marquina, D., Peres, C., Caldas, F., Marques, J., Peinado, J. Y Spender-Martins, I., (1992), CHARACTERIZATION OF THE YEASTS POPULATION IN OLIVE BRINES, Lett. Appl Microbiol., 14, 279-83.
25. Mercedy, J., (1974), SENSORY PROFILING OF BEER, Food Technol., 28, 36-41.

26. Michalcáková, S., Suló, P., Hapalová, J. y Minárik, E., (1991),
OCURENCE AND PROPERTIES OF KILLER STRAINS AMONG
CZECHOSLOVAKIAN WINE YEASTS, *Vitic. Enol. Sci.*, 46, 123-6.
27. Norma Oficial Mexicana NOM-V-12-1986 de Bebidas Alcohólicas-
Vinos.
28. Oreglia, F., (1978), ENOLOGIA TEORICO-PRACTICA, Ediciones Instituto
Salesiano de Artes Gráficas, Buenos Aires Argentina.
29. Palacios, A., Vila, J., Calderón, F., Callejo, M., Colomo, B. y Suárez, J.,
(1996), FRACCION AROMATICA DE VINOS TINTOS CON CRIANZA
BIOLOGICA. II. ALDEHÍDOS, ESTERES Y COMPONENTES ACETOINICOS,
Alimentaria, 95, 67-79.
30. Palfree, R. y Bussey, H., (1979), YEAST KILLER TOXIN: PURIFICATION AND
CHARACTERIZATION OF THE PROTEIN TOXIN FROM *Saccharomyces*
cerevisiae, *Eur. J. Biochem.*, 93, 487-93.
31. Pfeiffer, P. y Radler, F., COMPARISON OF THE KILLER TOXIN OF SEVERAL YEASTS AND
THE PURIFICATION OF A TOXIN OF TYPR K₂, *Arch. Microbiol.*, 137, 357-61.
32. Pfeiffer, P., Radler, F., Caspritz, G., Hanel, H., (1988), EFFECT OF A KILLER
TOXIN OF YEAST ON EUCARIOTIC SISTEMES, *Appl. Envirom. Microbiol.*,
54, 1068-9.
33. Philliskirk, G. y Young, T., (1975), THE OCURENCE OF KILLER
CHARACTER IN YEASTS OF VARIUS GENERA, *Antonie van*
Leeuwenhoek, 41, 147-51.
34. Radler, F., Schmitt, M., (1987), KILLER TOXINS OF YEASTS INHIBITORS OF
FERMENTATION AND THEIR ADSORPTION, *J. Food Prot.*, 50, 234-8.
35. Reyes, A., Escamilla y M., Verde, R., (1992), ELABORACION DE LOS
VINOS DE MESA, *Manuales de Prácticas de UAM-I*, México.
36. Ribéreau-Gayon, P., (1985), NEW DEVELOPMENTS IN WINE
MICROBIOLOGY, *Am. J. Enol. Vitic.*, 36, 1-10.
37. Rogers, D., y Bevan, A., (1978), GROUP CLASSIFICATION OF KILLER
YEASTS BASED ON CROSS REACTIONS BETWEEN STRAINS OF DIFFERENT
SPECIES AND ORIGIN, *J. Gen. Microbiol.*, 105, 199-202.
38. Rose, A.H., (1987), HIGH TEMPERATURE, En *The Yeasts Vol. 2*, 2a.
edición, Academic Press London.

39. Santillán, M., (1995), DESARROLLO DE UNA PRUEBA SENSORIAL DESCRIPTIVA PARA LA TIPIFICACION DEL VINO MEXICANO, Tesis UNAM Facultad de Química.
40. Skipper, N., y Bussey, H., (1977), MODE OF ACTION OF YEAST TOXINS: ENERGY REQUIREMENTS FOR *Saccharomyces cerevisiae* KILLER TOXIN, J. Bacteriol., 129, 668-77.
41. Stone, H., Sidel, J., Oliver, S., Woolsey, A. Y Singleton, R., (1974), SENSORY EVALUATION BY QUANTITATIVE DESCRIPTIVE ANALYSIS, Food Technol., 28, 24-34.
42. Tipper, D. y Bostian, K., (1984), DOUBLE-STRANDED RIBONUCLEIC ACID KILLER SYSTEMS IN YEASTS, Microbiol. Rev., 48, 125-56.
43. Vadkertiová, R. y Sláviková, E., (1995), KILLER ACTIVITY OF YEASTS ISOLATED FROM WATER ENVIRONMENT, Can. J. Microbiol. 41, 759-66.
44. Van Vuuren, H y Jacobs, C., (1992), KILLER YEASTS IN THE WINE INDUSTRY: A REVIEW, Am J. Enol. Vitic., 43, 119-28.
45. Vázquez, F., y Toro, M., (1994), OCURRENCE OF KILLER YEASTS IN ARGENTINE WINERIES, World J. Microbiol. Biotechnol., 10, 358-9.
46. Watson, K., (1987), ANTIMICROBIAL COMPOUNDS, en The Yeasts Vol. 2, 2a. edición, Academic Press London.
47. Woods, D., y Bevan, E., (1968), STUDIES ON THE NATURE OF THE KILLER FACTOR PRODUCED BY *Saccharomyces cerevisiae*, J. Gen. Microbiol., 51, 115-26.
48. Young, T. y Yagiu, M., (1978), A COMPARISON OF THE KILLER CHARACTER IN DIFFERENT YEASTS AND ITS CLASSIFICATION, Antonie van Leeuwenhoek, 44, 59-77.
49. Young, T., (1987), KILLER YEASTS, en The Yeasts Vol. 2, 2a. edición, Academic Press Londres.
50. Zook, K., (1977), THE SELECTION AND USE OF JUDGE, Food Technol., 31, 56-61.