

SELECCIÓN DE CEPAS DE LEVADURA PARA LA PRODUCCIÓN DE ALCOHOL EN VINO BASE

Jesús Abreu*, Tania María Guzmán e Hilda Cobo

Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria, Carretera al Guatao, km 3 1/2,
C.P. 19 200, La Habana, Cuba.

E-mail: jabreu@iiaa.edu.cu

RESUMEN

Se evaluaron 30 cepas de levadura del género *Saccharomyces* pertenecientes a una colección, con vista a seleccionar las de mejores características para el proceso de obtención de vino seco. Se caracterizó el comportamiento de las mejores cepas de levadura en el proceso de producción de vino base, a escala de laboratorio, atendiendo a la producción de alcohol en el medio, temperatura, crecimiento celular, Brix aparente y residual y acidez total. Se seleccionaron las cepas de levadura, *Saccharomyces sake* 21.50.1 y *S. cerevisiae* S.C. # 17 en cuanto a la producción de alcohol (10,5 y 10 °G. L, respectivamente) y eficiencia fermentativa (91,30 y 86,96 %, respectivamente) durante cinco días de fermentación.

Palabras clave: selección, cepas de levadura, fermentación, producción de alcohol, vino base.

ABSTRACT

Selection of yeast strains for alcohol production in base wine

Thirty yeast strains of the kind *Saccharomyces* belonging to a collection were evaluated, with conference to select those of better characteristic for the process of wine obtainment dry. It was characterized the behavior of the better yeast strains in the process of wine production base, to laboratory scale, attending to the alcohol production in the means, temperature, cellular growth, residual and apparent Brix and total acidity. The yeast strains, *Saccharomyces sake* 21.50.1 and *S. cerevisiae* S.C. # 17 were selected concerning the alcohol production (10.5 and 10 °G. L, respectively) and fermentative efficiency (91.30 and 86.96%, respectively) during five fermentation days.

Key words: selection, yeast strains, fermentation, alcohol production, base wine.

INTRODUCCIÓN

La tendencia actual del proceso de fermentación alcohólica se dirige hacia la obtención de concentraciones más altas de alcohol en el mosto fermentado, lo que mejoraría considerablemente la economía del proceso. Dicha tendencia tiene como base la búsqueda y desarrollo de nuevas cepas de levadura que sean capaces de trabajar eficientemente en medios con alta graduación alcohólica (1-3).

***Jesús Abreu Mirabal:** Licenciado en Microbiología (U. H., 1979). Investigador Agregado. Jefe del Laboratorio de Levaduras perteneciente al Departamento de Microbiología Industrial y Sanitaria. Trabaja actualmente en la investigación de propiedades tecnológicas de las levaduras, la producción de inóculos para las industrias panaderas y cervecera y el mantenimiento del Banco de Cepas del IIAA.

La producción de alcohol por fermentación varía con la cepa de levadura, su tolerancia a concentraciones de alcohol y azúcar, resistencia a la temperatura y acidez, características estables y rapidez de fermentación (2-5). Las levaduras utilizadas en la producción de vinos pertenecen al género *Saccharomyces* e incluyen entre ellas las especies *Saccharomyces cerevisiae* var. *Ellipsoideus*, *Saccharomyces Oviform*, *Saccharomyces sake* y *Saccharomyces vini* (4, 6, 7).

Los criterios de selección y caracterización de una cepa de levadura deben incluir necesariamente la producción de alcohol en las condiciones imperantes en la industria (4, 5). La resistencia a la temperatura de fermentación es un factor importante, dado que generalmente en las fábricas de vino de nuestro país, las temperaturas aumentan gradualmente en el medio desde 28 a 34 °C, aunque la norma permite hasta 36 °C como máximo (8). La fermentación se realiza de forma incrementada

a partir de un fermentador hasta llegar a cinco en un período aproximado de cinco días con las consiguientes especificaciones de calidad que deben cumplirse en cada etapa (6, 8). Por tanto, un programa a escala de laboratorio que simule las condiciones y efectos sobre el complejo microorganismo-sustrato serían adecuadas para una verdadera evaluación.

Por otra parte, la concentración de azúcar en la producción de vinos suele ser satisfactoria entre 17 y 19 %, cuando se emplean concentraciones superiores, éstas actúan adversamente sobre la levadura; pues el alcohol producido inhibe su acción, prolongándose el tiempo de fermentación y en consecuencia parte del azúcar queda sin transformar (6, 8-10).

En las fábricas cubanas de vinos por no tener las condiciones necesarias, se emplea levadura panadera húmeda, la cual presenta la desventaja de un mayor contenido de agua, poca durabilidad, las células mueren y las levaduras se contaminan con microorganismos que se multiplican fuertemente (11). Otro punto crítico radica en la insuficiencia de fermentación, si se aumenta la concentración de azúcar para obtener mayores rendimientos alcohólicos, la cantidad de alcohol permanecerá constantemente menor que la cantidad teórica esperada (11). El contenido alcohólico en la industria oscila entre 8 y 8,5 °G.L., para una eficiencia fermentativa de 78 %, aceptado como mínimo en la norma (1, 9). Este resultado implica la adición en el proceso de estabilización de aproximadamente 2,5 % de alcohol para cumplimentar la norma de $11 \pm 0,5$ G.L., requerido para vino seco (8). Por lo tanto, la utilización de una cepa de levadura selecta de vino representaría una alternativa tecnológica y económica importante a considerar desde el punto de vista de su propagación a partir de un cultivo puro o en forma de levadura seca activa.

El presente trabajo tuvo como objetivo la selección de cultivos puros de levadura para vino base, atendiendo a las propiedades de importancia técnica requerida en la industria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon las cepas de levadura panadera *Saccharomyces cerevisiae* L-3 (patrón), levadura húmeda prensada Leviatan procedente de la fábrica «Héroes de Bolivia» utilizada en la industria vinatera, y

cepas de levadura vinatera y destilera del género *Saccharomyces*, pertenecientes al Banco de Cepas del Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria, las cuales se relacionan a continuación: *S. cerevisiae* Sta. Cruz, Sta. Cruz, 21.4.52, Termorr. LSAI, LSAT-80, E-87, Uvaferm, VI var. *ellipsoideus*, XIII, XV, XVI, XVII, XIX, XX, XXI, XXII, *S. oviformis* LVII, LVIII, LX, *S. sake*, 21.50.1, *S. vini* 8, 12, 13, 14, 16, 18 y 21.

Las cepas de levadura estaban conservadas en cuñas de cultivo cubiertas con aceite mineral estéril a temperaturas de 8 ± 1 °C.

La capacidad de producción de alcohol de las levaduras se determinó previamente mediante la técnica del Poder fermentativo (4). Para ello se ajustó la concentración celular inicial a 20×10^6 células/mL en 40 mL de medio vino base (mosto), contenido en frascos erlenmeyers de 100 mL de capacidad, ajustándose el tapón con la válvula de Müller y procediendo a su pesada inicial; se incubó a 30 °C y se repitieron las pesadas a las 24, 48, 72, 96, 108 y 120 h, respectivamente (6). Para la conversión del CO₂ desprendido a porcentaje de alcohol producido se utilizó la fórmula siguiente:

Alcohol (%) = $\frac{1,3 P}{V} 100$ donde 1,3 = Factor

$$V \quad P = p_i - p_f$$

$$V = 40 \text{ mL}$$

Las cepas de levadura se propagaron a escala de 50 y 500 mL de medio estéril de melaza y vino base respectivamente. Para ello se añadió el contenido de biomasa de una cuña de cultivo en la etapa de 50 mL, se agitó en zaranda a 180 rev/min durante 12 h a temperatura de 30 °C (4), posteriormente se centrifugó y lavó el medio fermentado, se ajustó la biomasa de levadura a una concentración celular de 20×10^6 cél/mL en 500 mL de medio vino base, propagándose en las mismas condiciones antes descritas.

El mosto fermentado se repartió a la mitad en dos frascos de 1 L, se añadió mosto fresco hasta completar el volumen inicial de cada uno (etapa 1), se colocaron en baño termostático y se aumentó la temperatura a razón de 1 °C/24 h hasta alcanzar 34 °C, al término de este tiempo se dividió a la mitad y se obtuvieron cuatro recipientes, los cuales se completaron con mosto fresco y se dejaron fermentar con el mismo aumento de

temperatura durante 24 h más (etapa 2), transcurrido este tiempo se extrajo ¼ de cada frasco, se agregaron a otro frasco y se obtuvieron cinco fermentaciones, se completaron con mosto fresco y se dejaron fermentar con incremento de temperatura hasta 36 °C (etapa 3). Se dio por terminado este proceso cuando la medida del Brix aparente se hizo igual a cero o cuando se llegó a la fermentación completa determinada por la repetición de la medida del Brix residual.

En todo el proceso se realizaron en el principio y final de cada etapa los análisis correspondientes a Masa Seca Volumétrica (MSV) (4), sólidos solubles expresados en Brix aparente y residual (2), acidez total (10), contenido alcohólico (10) y eficiencia fermentativa (4).

$$\text{Eficiencia fermentativa} = \frac{\text{Etanol recobrado en mL}}{\text{Recobrado teórico en mL}} \times 100$$

Se realizaron ocho réplicas por cada cultivo de levadura. Los resultados de alcohol producido se procesaron mediante análisis de varianza de clasificación simple y prueba de rangos múltiples de Duncan para aquellas cepas que alcanzaron o sobrepasaron 78 % de eficiencia fermentativa (1).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 1 refleja las siete primeras cepas, las cuales lograron un contenido alcohólico en el medio superior a 8,9 % que a la vez se corresponde con una eficiencia fermentativa igual o mayor a 78 %, norma fijada en las destilerías cubanas como límite mínimo permisible para dar por terminada la fermentación. El tiempo de cinco días de fermentación requerido para obtener este resultado se determinó tomando como patrón los datos de cumplimiento de la levadura panadera L-3, utilizada en las fábricas de vinos, teniéndose en cuenta además que la rapidez de fermentación es uno de los factores de más interés en esta producción.

El hecho de que 60 % de las levaduras no cumplieran con el límite mínimo establecido se explicaría en primer lugar por la menor capacidad de producción y tolerancia al azúcar o el alcohol e imputables además a cuestiones intrínsecas de las cepas en cuanto a su menor rapidez de fermentación lo cual las invalida para utilizarlas en este proceso.

La Tabla 2 muestra que en cuanto al análisis estadístico la cepa de levadura 21.50.1 y S.C. # 17 de mayores rendimientos alcohólicos no difieren significativamente entre ambas, pero sí la primera con respecto a las demás, debido a su mayor producción de alcohol, 10,5 °GL, resultado que coincide además con el valor mínimo de contenido alcohólico que registra la norma de vino seco, $11 \pm 0,5$ °GL (8), lo que demuestra que la cepa 20.50.1 tolera y produce con buena rapidez fermentativa concentraciones altas de alcohol con eficiencia fermentativa de 91,30 %, valor práctico reconocido en la literatura especializada (1) para una cepa de buena calidad productiva, que además presenta una estabilidad aceptable (C.V=5,4).

En sentido general las cepas que difieren en su producción de alcohol se encuentran afectadas principalmente por la inhibición que provoca el incremento de la concentración de alcohol y la temperatura (4,5), conversión de azúcar en otros productos y fermentación incompleta (1).

La Tabla 3 muestra las posibilidades de alcanzar resultados satisfactorios con incremento de la concentración de azúcar y tiempo, sobre todo por el criterio del productor de vinos de terminar la fermentación cuando el Brix aparente alcanzó el valor cero (8, 9, 11), se puede obtener un valor de 10,2 °GL con la cepa 21.50.1 a 19 °Brix inicial y cinco días de fermentación, no así las demás cepas las cuales necesitan más tiempo o podrían inhibir su función por la concentración de alcohol con la temperatura de 34 °C impuesta como condición.

Al graficar el comportamiento de los parámetros fermentativos de las cepas 21.50.1 y L-3 patrón durante el proceso de obtención del vino base (Figs. 1 y 2), se observa en la etapa de propagación que la cepa 21.50.1 incrementa su biomasa en 25 % con relación a cepa L-3, resultado favorable pues la primera muestra una mejor compatibilidad con el sustrato de fermentación y que se mantiene constantemente más alta durante las etapas de fermentación.

Todos los demás parámetros permanecen dentro de la norma y sus comportamientos son similares para ambas cepas durante la propagación y en las etapas 1 y 2 de fermentación.

Tabla 1. Capacidad de producción de alcohol de las cepas de levadura de la colección durante cinco días de fermentación

Cepa de levadura	Contenido alcohólico (°GL)	Eficiencia fermentativa (%)
21.50.1	9,6	83,9
S.C # 17	9,2	80,1
XVI	9,1	79,3
L-3	9,0	78,2
Uvaferm.	8,9	78,1
Sta. Cruz	8,9	78,0
16	8,9	78,0
XXI	8,7	75,9
14	8,6	74,9
XIII	8,6	74,7
XX	8,5	74,0
12	8,3	72,5
XIX	8,2	72,1
21	8,1	71,0
Termorr.	8,1	70,4
VI	8,0	70,3
LX	8,1	70,2
LSAT	7,9	69,3
21.4.52	7,8	68,6
8	7,8	68,1
LSAT-80	7,7	67,3
13	7,7	67,3
XV	7,6	66,3
Sake	7,3	64,1
XXII	7,3	63,4
XVII	7,2	62,7
LVII	7,1	62,1
LVIII	7,1	61,5
18	6,8	59,4
E-87	6,8	59,1

Tabla 2. Comportamiento de las cepas de levadura durante el proceso de obtención del vino

Cepa de levadura	Alcohol producido (°GL)	Índice de eficiencia (%)	Brix residual (°Brix)	Acidez total (%)
21.50.1	10,5 a (5,38)	91,30	2,2	0,59
S.C. # 17	10,0 ab (5,20)	86,96	2,8	0,54
L-3 (Patrón)	9,4 bc (5,71)	81,74	2,75	0,56
L-3 H.P.	9,3 bc (5,63)	80,87	2,73	0,57
Sta. Cruz	9,2 bc (5,65)	80,0	2,90	0,59
Uvaferm.	9,0 bc (5,89)	78,26	3,20	0,56
XVI	8,8 c (8,43)	76,52	3,45	0,57
16	8,9 c (7,26)	77,39	3,50	0,62

Letras distintas indican diferencias significativas para $P \leq 0,05$.

Las cifras entre paréntesis corresponden al coeficiente de variación.

Tabla 3. Producción de alcohol a dos concentraciones de azúcar y tiempo

Cepa de levadura	Brix inicial	Brix aparente	Alcohol (°GL)	Tiempo (días)	Brix residual	Alcohol (°GL)	Tiempo (días)
21.50.1	18	0,0	9,7	4,5	2,2	10,5	5,0
	19	0,0	10,2	5,0	2,8	11,0	5,5
S.C. # 17	18	0,4	9,1	4,5	2,8	10,0	5,0
	19	0,7	9,5	5,0	3,5	10,3	5,5
L-3 patrón	18	0,2	8,9	4,5	2,8	9,3	5,0
	19	0,6	9,1	5,0	3,8	9,7	5,5

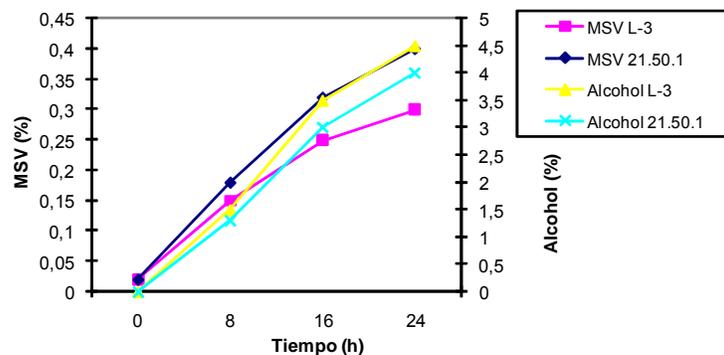


Fig. 1. Producción de biomasa y alcohol de las cepas de levadura L-3 y 21.50.1 durante la etapa de propagación.

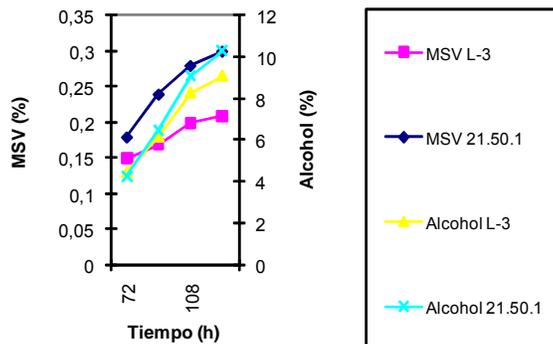


Fig. 2. Producción de biomasa y alcohol de las cepas de levadura L-3 y 21.50.1 durante la etapa final de fermentación.

En la última y tercera etapa de fermentación se manifiesta una mayor eficiencia fermentativa, dada por una mayor producción de biomasa, lo que representa un mejor aprovechamiento del sustrato para la producción de alcohol de ambas cepas y éstas alcanzan valores superiores y cercanos a 9 °GL, cuando el Brix aparente se hace igual a cero, lo que acentúa más la diferencia hasta la fermentación completa y en la cual la cepa 21.50.1 llegó a valores de 10,5 °GL y la L-3 alcanza 9,4 °GL. En este corto período la producción de alcohol se retarda, sobre todo para la cepa L-3, debido a la disminución de la concentración de azúcar y al efecto inhibitorio del alcohol y la temperatura (4, 5).

CONCLUSIONES

De los 30 cultivos de levaduras evaluados para la producción de vino base, se seleccionaron en orden de prioridad la *S. sake* 21.50.1 y *S. cerevisiae* SC # 17, obteniéndose rendimientos alcohólicos de 10,5 y 10 °GL, respectivamente y una eficiencia fermentativa de 91,30 y 86,96 %, respectivamente.

Para obtener en el vino base contenidos alcohólicos superiores a 10 % con Brix aparente igual a cero, requerido en la norma, se necesita la cepa 21.50.1, una concentración de azúcar de 19 % y cinco días de fermentación en las condiciones experimentadas.

Se estableció el procedimiento a escala de laboratorio para la evaluación de cepas de levadura en la producción de vino base.

REFERENCIAS

1. Hernández, M.; Seis, T. y Sánchez, O. Microbiología de la producción azucarera. Producciones microbianas derivadas. La fermentación alcohólica. Universidad de Las Villas, 1986, pp. 130-179.
2. Contreras, R.; Delgado, T. y Roura, G. *Cienc. Biol.* 13 (2): 305-312, 1982.
3. Stupiello, J. Progresos recientes en la fermentación de etanol a partir de caña de azúcar y sus productos derivados. *Boletín GEPLACEA III*, México D.F. 1986, II: 1-9.
4. Abreu, J.; Delgado, R. y Jaqueman, F. *Cienc. Tecnol. Alim.* 3: 48, 1993.
5. Delgado, R.; Contreras, R. y Fernández, D. *Ciencia Biológicas.* 14 (1): 27-34, 1983.
6. Prescott, S. y Dunn, C. *Microbiología Industrial*. Madrid, Aguilar, 1962.
7. Ribereau, D. y Gayan, P. *Am. J. Enol. Vitic.* 15:121, 1985.
8. NEIAL- 1663-023. *Bebidas de Fermentación. Vino Seco. Proceso Tecnológico*. E.B.L. Habana, 1985.
9. NEIAL- 1679. 010. *Vino fruta bomba. «LA AVILEÑA» Proceso Tecnológico*. 1982.
10. NC 8205-2, 3 y 4-1984. *Determinación del Brix residual, Acidez total y Grado alcohólico*, M.E.
11. Rose, A. y Harrison, J. *The yeasts. Yeast in wino-Marking*. Vol. 3, London, Academic Press, 1970.