

# EVALUACION DE LEVADURAS CRIOTOLERANTES PATAGONICAS PARA LA ELABORACION DE UNA BEBIDA FERMENTADA A BASE DE PERA

Melisa González Flores<sup>1,2</sup>, María Eugenia Rodríguez<sup>1,3</sup>, Leonardo Bajda<sup>1</sup> y Christian A. Lopes<sup>1,2</sup>

1- PROBIEN (CONICET-UNCo), Neuquén, Argentina

2- Fac. Cs. Agrarias (UNCo), Río Negro, Argentina

3- Fac. Cs. Médicas (UNCo), Río Negro, Argentina

Email: [clopes@conicet.gov.ar](mailto:clopes@conicet.gov.ar)

## RESUMEN

La bebida resultante de la fermentación del jugo de pera, realizada de manera espontánea o conducida por levaduras y conocida internacionalmente con el nombre de *Perry*, ha sido principalmente explotada en Estados Unidos, Irlanda, Reino Unido y Nueva Zelanda.

En este trabajo se utilizaron dos cepas de *S. uvarum*, una aislada de chicha de manzana (NPCC1314) y otra de sidra (NPCC1420), ambas seleccionadas por sus características de interés para la elaboración de sidras. Se realizaron fermentaciones de mosto de pera no estéril a escala semipiloto utilizando bajas temperaturas de fermentación.

Por lo analizado, la cepa NPCC1314 reúne una combinación de características interesantes para ser utilizada como iniciador en fermentaciones de mosto de pera, permitiendo obtener bebidas con características químicas y sensoriales destacadas e identidad patagónica.

## 1. Introducción

La elaboración de bebidas fermentadas a base de manzanas (sidra) y peras (perry) en el mundo se encuentra estrechamente ligada a las regiones productoras de frutas de pepita. Países como Reino Unido, Irlanda, Francia, España y Estados Unidos presentan la mayor producción y consumo de estas bebidas (Merwin et al., 2008). En Argentina, esta actividad productiva se concentra principalmente en la región Patagónica, donde se produce 75% de la sidra del país (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2016), pero principalmente a base de mosto de manzana. La producción de fermentado de pera es una actividad poco explotada a nivel nacional, aunque el bajo costo de la fruta hizo que recientemente muchos pequeños productores visualicen a la elaboración de este tipo de bebidas como una herramienta para el agregado de valor a la materia prima.

El aumento en la producción de estas nuevas bebidas requiere del desarrollo de tecnologías específicas, entre las que se encuentra la selección de levaduras con características particulares. En este sentido, la Patagonia ofrece una gran diversidad de levaduras tanto en ambientes naturales como en procesos tradicionales e industriales de producción de sidras o chichas. Una de interés de muchas de estas levaduras, como las que presenta la especie *Saccharomyces uvarum* (*Su*) es su capacidad de fermentar a bajas temperaturas, típico de los procesos de elaboración de sidras (Rodríguez et al., 2014; 2017). *S. uvarum* presenta, además, características que la diferencian de *Saccharomyces cerevisiae*, levadura fermentativa por excelencia, como una mejor capacidad fructofílica, menor producción de acidez volátil y mayor producción de compuestos aromáticos como el 2-feniletanol que aportan aromas florales a las bebidas (Gamero et al., 2013; Gonzalez et al., 2006; Tosi et al., 2009; Masneuf et al., 2002).

En este trabajo se evaluó el efecto comparado a nivel cinético, aromático y sensorial de dos cepas patagónicas de la especie *S. uvarum*, seleccionadas previamente por su capacidad de

producir sidras con características aromáticas y organolépticas superiores (Gonzalez et al., 2017; en prensa), para elaborar productos fermentados a base de pera.

## **2. Materiales y métodos**

### **2.1. Levaduras**

Se utilizaron dos levaduras de la especie *S. uvarum*, la cepa NPCC1314 aislada de chicha de manzana (Rodríguez et al., 2017) y la cepa NPCC1420 aislada de sidra de manzana (González Flores et al, en prensa), ambas en la región Patagónica.

### **2.2. Fermentaciones a escala semipiloto**

Se llevaron a cabo en bidones de 10 L conteniendo 8 L de mosto de pera bivarietal Packams/D'anjou (29,5 g/L glucosa; 83,4 g/L fructosa; 51,9 g/L sorbitol; 0,04 g/L ácido acético; 0,21 g/L ácido láctico; 2,97 g/L ácido málico, pH 4,2) cosecha 2018 y sin esterilizar. Al mosto además se le adicionaron 200 mg/L de  $K_2S_2O_5$ . Las fermentaciones se inocularon individualmente con cada levadura, por duplicado, y se incubaron a 13°C. La evolución se siguió por medición diaria de °Brix hasta valor constante y luego por medición de azúcares reductores totales por el método de DNS. El proceso se consideró finalizado cuando la concentración de azúcares residuales fue menor a 2 g/L.

### **2.3. Parámetros fisicoquímicos en sidras**

Los azúcares, alcoholes (etanol y glicerol, metanol), y ácidos orgánicos (ácido acético, ácido málico, ácido láctico) y acetaldehído se determinaron por cromatografía líquida HPLC (en el laboratorio de Cromatografía del PROBIEN, CONICET-UNCo) utilizando el equipo Agilent 1260 (Quat Pump VL, ALS, TCC) siguiendo la metodología propuesta en Gonzalez Flores et al. (2017).

El  $SO_2$  libre y total se midió siguiendo la metodología propuesta por Ribereau-Gayon et al. (2006). El  $SO_2$  libre se determinó mediante titulación directa con yodo y el  $SO_2$  total se determinó mediante tratamiento de muestra con KOH (1 N) seguido por valoración con yodo. Los ésteres, alcoholes superiores, terpenos y fenoles volátiles se cuantificaron mediante cromatografía gaseosa en un equipo GC 7890 (HS-GC-FID) siguiendo la metodología de Gonzalez Flores et al. (2017).

### **2.4. Cinéticas de fermentaciones**

Los datos obtenidos de °Brix en estas fermentaciones se modelaron utilizando la ecuación exponencial de decaimiento (Arroyo-López, et al., 2009):  $Y=D+S*e^{(-K*t)}$

Donde: Y es el porcentaje de glucosa, fructosa o grados Brix presente en el medio, t es el tiempo en horas, D es el valor específico cuyo t tiende a infinito, S es el valor estimado de cambio y K es la constante cinética o tasa de consumo de sustrato ( $h^{-1}$ ).

### **2.5. Análisis estadísticos**

Se realizaron comparaciones entre medias para los datos fisicoquímicos utilizando el método de Análisis de la Varianza de una vía (ANOVA) y Test de Tukey de diferencia significativa honesta (HSD), utilizando un  $\alpha$ : 0,05 utilizando el software STATISTICA 7.0 Stat Soft Inc.

## **3. Resultados y discusión**

### **3.1. Fermentaciones a escala semipiloto**

En las fermentaciones con mosto de pera inoculadas con ambas levaduras se llegó a sequedad a los 15 días, sin embargo, se observaron diferencias significativas en los parámetros cinéticos. La cepa de sidra (NPCC1420) requirió un menor tiempo para consumir el 50% de los azúcares (parámetro M) y, además, presentó una tasa de consumo de sustrato mayor a la cepa de chicha NPCC1314 (Figura 1 y Tabla 1). Este comportamiento podría estar

relacionado a una mayor adaptación en los procesos fermentativos de tipo industrial en la cepa NPCC1420.

En todas las fermentaciones se observó una muy buena implantación en el estadio final para las dos cepas inoculadas, siendo de 100% para la cepa NPCC1314 y 95% para NPCC1420.

### **3.2. Propiedades fisicoquímicas y perfil aromático de las sidras**

Las propiedades fisicoquímicas se evaluaron sobre el caldo base. Aquellos fermentados con la cepa NPCC1420 (aislada de sidra) presentaron mayor concentración de glicerol, ácido málico y ácido acético en relación a los inoculados con la cepa NPCC1314 (aislada de chicha de manzana). Además, la concentración de estos tres compuestos fue mayor a la determinada en el mosto de pera indicando que fueron sintetizados durante la fermentación. Los caldos base fermentados con la cepa NPCC1314 evidenciaron concentraciones ínfimas de ácido málico y cantidades de ácido láctico significativamente superiores en comparación al mosto y a los caldos obtenidos con la cepa NPCC1420 (Tabla 2). Esta diferencia en la concentración de ácidos málico y láctico pudo deberse al desarrollo de fermentación maloláctica (FML) en los mostos fermentados con la cepa de chicha NPCC1314, proceso llevado a cabo por bacterias del ácido láctico que transforman el ácido málico en láctico, reduciendo la acidez total de los productos (Picinelli et al., 2000). Esta bebida fermentada con la cepa NPCC1314 presentó además concentraciones más elevadas de lactato de etilo (más de 100 veces más elevado que en la fermentación con *S. uvarum* NPCC1420) y pH más elevado. Interesantemente, los productos fermentados con la cepa de sidra *S. uvarum* NPCC1420, presentaron los valores más elevados del éster octanoato de etilo; este compuesto producido por las levaduras se encuentra directamente relacionado a las elevadas concentraciones de ácido octanoico, que inhibe la FML (Caridi y Corte, 1997). Además, el pH final de los caldos fermentados con NPCC1420, significativamente inferior al observado en el mosto de pera y en los productos fermentados en los que sí se desarrolló la FML, posiblemente potenció el efecto del SO<sub>2</sub> como antimicrobiano sobre las BAL (Divol et al., 2012).

Las concentraciones elevadas y significativas de 2-feniletanol, alcohol isoamílico e isobutílico, así como de acetato de isoamilo, acetato de 2-feniletilo, octanoato de etilo y succinato de dietilo caracterizaron el perfil aromático de los caldos obtenidos con la cepa NPCC1420; todos estos compuestos están relacionados con notas frutales y florales, deseadas en este tipo de bebidas fermentadas (Lambrechts y Pretorius, 2000). Por otro lado, los caldos fermentados con la cepa NPCC1314 se caracterizaron por tener elevadas cantidades de terpenos y fenoles totales destacándose en esos grupos el geraniol y el 4-etilfenol, respectivamente. La elevada concentración de terpenos, quizá esté relacionada con una mayor actividad glicosidasa de esta cepa en relación a la cepa aislada de sidra, como se observó en forma semicuantitativa en un trabajo previo (Gonzalez Flores et al., 2017). Los terpenos provienen de varios precursores glicosídicos (glicoconjugados) presentes en el mosto y se liberan como terpenos libres en el mosto debido a la actividad de las enzimas glicosidasas presentes en numerosas levaduras (Zoecklein et al., 1997). Por ello es que la actividad glicosidasa es una propiedad de las levaduras buscada a nivel industrial, ya que tiene un impacto organoléptico favorable en las bebidas permitiendo potenciar el aroma primario (Ganga et al., 1999). Otro parámetro que caracterizó los productos obtenidos con la cepa NPCC1314 fue la elevada concentración de metanol en relación a los productos de la cepa NPCC1420 (Tabla 2). Estos valores elevados probablemente estén relacionados con la gran cantidad de pectinas que tiene la pera (Hulme, 1958).

La actividad pectinasa de las levaduras libera residuos metilo de las pectinas produciendo metanol, que es un compuesto tóxico cuando supera concentraciones de 200 mg/L (Blanco

Gomis y Mangas Alonso, 2010). Las levaduras utilizadas en este trabajo presentaron actividad pectinasa lo publicado recientemente de forma semicuantitativa (González Flores et al., 2017; en prensa).

### 3.3. Análisis sensorial de las sidras

El público no entrenado (formado por 56 comensales) escogió preferentemente a los productos finales obtenidos con la cepa NPCC1314 (72% vs 28%). Por su parte, el panel entrenado evidenció perfiles sensoriales muy diferentes en las bebidas fermentadas con las dos cepas.

En los productos obtenidos con la cepa NPCC1314 se observó mayor complejidad aromática con aromas frutales, florales y metálicos. Además, en cuanto a las propiedades gustativas estos productos mostraron además mayor cuerpo, untuosidad e intensidad de sabor. Por otro lado, los productos obtenidos con la cepa NPCC1420 presentaron mayor acidez y amargor y un leve defecto gustativo.

## 4. Conclusiones

Las sidras de pera fermentadas con la cepa aislada de chicha de manzana (NPCC1314) presentaron una combinación de características en donde la implantación, aromas e impacto sensorial fueron mejores, a las sidras obtenidas con la cepa NPCC1420 aislada de sidra. Nuestros resultados representan el primer estudio a escala piloto utilizando levaduras de la especie *S. uvarum* patagónicas en esta bebida en todo el país y ofrecen una alternativa biotecnológica con importante potencial para ser utilizada en la mejora de la calidad de las sidras de pera de nuestra región.

## AGRADECIMIENTOS

Mencionar estudiantes de la Facultad y Proyectos de Investigación o de Extensión de la Facultad.

## 5. Referencias

- Arroyo-López, F.N., Querol, A., Barrio, E., 2009. Application of a substrate inhibition model to estimate the effect of fructose concentration on the growth of diverse *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 663–669.
- Bieleski, R. L., 1982. Sugar alcohols, In *Encyclopedia of Plant Physiology – Intracellular Carbohydrates*, Vol. Gamero, A., Tronchoni, J., Querol, A., Belloch, C., 2013. Production of aroma compounds by cryotolerant *Saccharomyces* species and hybrids at low and moderate fermentation temperatures. *J. Appl. Microbiol.* 114, 1405–1414.
- Ganga, M.A., Piñaga, F., Vallés, S., Ramón, D., Querol, A., 1999. Aroma improving in microvinification processes by the use of a recombinant wine yeast strain expressing the *Aspergillus nidulans* xlnA gene. *Int. J. Food Microbiol.* 47, 171–178.
- González Flores, M., Rodríguez, M. E., Origone, A.C., Oteiza, J. M., Querol A., Lopes, C. A. En prensa. *Saccharomyces uvarum* isolated from patagonian ciders shows excellent fermentative performance for low temperature cidermaking. *Food Res. Int.* submitted 8-8-2019.
- González Flores, M., Rodríguez, M. E., Oteiza, J. M., Barbagelata, R., Lopes, C. A. 2017. Physiological characterization of *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces eubayanus* from Patagonia and their potential for cidermaking. *Int. J. Food Microbiol.* 249, 9–17.
- Gonzalez, S.S., Barrio, E., Gafner, J., Querol, A., 2006. Natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae* *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces kudriavzevii* in wine fermentations. *FEMS Yeast Res.* 6, 1221- 1234.
- Jordan, P., Choe, J., Boles, E., Oreb, M., 2016. Hxt13, Hx15, Hx16 and Hxt17 from *Saccharomyces cerevisiae* represent a novel type of polyol transporters. *Sci. Rep.* 6,1–10.

Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S., 2000. Yeast and its Importance to Wine Aroma – A Review. South African J. Enol. Vitic. 21, 97–129.

---

**Pie de Figura:**

Figura 1. Xxxxxx

Figura 2. VBBBBBB