

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CENTRO DEL PERÚ
Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias



TESIS

SELECCIÓN DE LEVADURAS NATIVAS *Saccharomyces cerevisiae* AISLADAS DE CHICHA DE JORA DEL VALLE DEL MANTARO

Presentada por los bachilleres:

DAVID DANY GARCÍA VENTOCILLA
GLORIA MARÍA MAMANI GAMARRA

Para optar el título profesional de Ingeniero en Industrias
Alimentarias

HUANCAYO – PERÚ

2008

AGRADECIMIENTOS

Un sincero agradecimiento a la Dra Maritza Calderón del Laboratorio de Enfermedades Infecciosas, Dermatológicas y Tropicales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por su apoyo incondicional y sugerencias en la realización del presente proyecto, muchas gracias Doctora por introducirnos en el maravilloso campo de la Biología Molecular.

Al Dr. Pablo Ramírez del Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por sus sabias sugerencias y facilidades brindadas en cuanto al uso de equipos y materiales para el buen desarrollo de la parte molecular del presente trabajo.

Al Biólogo Michael Jaramillo Bobadilla por su apoyo desinteresado en la realización de la PCR y temas de Bioinformática. Gracias Maicol.

Al Ing. Nicolás Román Cabello por su incondicional apoyo y confianza en cuanto al uso de los laboratorios del Instituto de Biotecnología e Ingeniería Genética de la Universidad Nacional del Centro del Perú.

A nuestro asesor el Ing. Luis Artica Mallqui.

A las ingenieras Jackie Huamán y Yesenia Ugarte.

Y por supuesto, a nuestros padres por el incansable apoyo para la culminación de este proyecto de investigación.

A nuestros padres:

INDICE

RESUMEN	1
I INTRODUCCIÓN	2
II REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Chicha de Jora.....	3
2.1.1 Aspectos generales	3
2.1.2 Elaboración.....	4
(a) Malteado del maíz.....	4
(b) Molienda	5
(c) Cocción	5
(d) Filtración	5
(e) Fermentación.....	5
2.1.3 Flora microbiana de la chicha de jora	6
2.1.4 Composición bromatológica de la chicha de jora.....	6
2.2 El Valle del Mantaro	9
2.3 Levaduras	11
2.3.1 Aspectos generales	11
2.3.2 Clasificación.....	11
2.3.3 Ecología.....	12
2.3.4 Necesidades nutricionales	14
2.3.5 Reproducción.....	14
2.4 La especie <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
2.4.1 Aspectos generales	15
2.4.2 Ciclo biológico.....	20
2.5 Bioquímica de la fermentación alcohólica	23

2.5.1 Aspectos generales	23
(a) Respiración	24
(b) Fermentación	24
2.5.2 Fermentación alcohólica	24
2.5.3 Crecimiento de las levaduras durante la fermentación alcohólica	27
2.5.4 Factores que afectan al desarrollo de la fermentación alcohólica	28
2.5.4.1 Composición del mosto	29
(a) Concentración de azúcares	29
(b) Contenido en materia nitrogenada	29
(c) Factores de crecimiento	30
2.6 Selección de levaduras.....	31
2.6.1 Aspectos generales	31
2.6.2 Ventajas de la utilización de levaduras seleccionadas	32
2.6.3 Criterios de selección.....	32
2.6.3.1 Criterios de selección de levaduras para la producción de vinos	32
(a) Fenotipo killer	33
2.6.3.2 Criterios de selección de levaduras para la industria cervecera	35
(a) Fermentación rápida	35
(b) Tolerancia de cambios físicos – mecánicos	35
(c) Floculación	35
(d) Atenuación	36
(e) Componente del Sabor	36
(e.1) Esteres.....	36
(e.2) Diacetilo	36
(e.3) Ácidos Grasos	37
(f) Alcoholes Superiores	37
(g) Compuestos de Nitrógeno.....	37
(h) Estabilidad genética	38

2.7 Identificación molecular de levaduras.....	38
2.7.1 Aspectos generales	38
2.7.2 Métodos moleculares para la identificación de levaduras	
a nivel de especie.	39
2.7.2.1 Métodos basados en el análisis de regiones	
ribosómicas	39
(a) Secuenciación de regiones ribosómicas.	41
(b) Análisis de restricción de regiones ribosómicas	
(PCR-RFLP del rDNA).....	42
2.7.3. Métodos moleculares para la diferenciación a nivel de cepa.....	43
2.7.3.1 Análisis de restricción del DNA mitocondrial	43
2.7.3.2 Métodos basados en la técnica de PCR	44
(a) RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).....	44
(b) PCR de zonas repetitivas del genoma	
(microsatélites y minisatélites).	45
(c) AFLP (Polimorfismo de la longitud de de los	
fragmentos amplificados).....	46
III MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
3.1 Lugar de Ejecución	47
3.2 Materiales.....	47
3.2.1 Cepas de levadura.....	47
(a) Cepas silvestres.....	47
(b) Cepas patrón	48
3.2.2 Medios de cultivo	48
(a) YPD (Yeast Peptona Dextrosa)	48
(b) Agar mosto de jora.....	48
(c) YPD tamponado a pH 4,2	49
3.2.3 Mosto de jora	49
3.2.4 Técnicas moleculares	50
3.2.4.1 Aislamiento de DNA genómico de levaduras	50
3.2.4.2 Amplificación de la región ITS del rDNA (PCR).....	50
(a) Oligonucleótidos (primers o cebadores).....	50

(b) DNA polimerasa	50
3.2.4.3 Análisis de los perfiles de restricción (RFLP) del rDNA...	51
3.2.4.4 Visualización de bandas.....	51
(a) Agarosa Ultra Pure.....	51
(b) Marcadores de peso molecular	51
3.2.5 Reactivos y equipos de laboratorio.....	52
3.2.5.1 Reactivos.....	52
3.2.5.2 Equipos	52
3.3. Métodos.....	54
3.3.1 Muestreo.....	54
3.3.2 Análisis fisicoquímicos	55
3.3.2.1 Análisis fisicoquímicos de las muestras de chicha de Jora	55
3.3.2.2 Análisis químico proximal de la jora y malta empleada en el presente trabajo.....	55
3.3.2.3 Análisis calidad maltera.....	55
3.3.3 Aislamiento de levaduras.....	56
3.3.4 Identificación presuntiva de la especie <i>S. cerevisiae</i>	56
3.3.5 Pre selección de levaduras mediante fermentaciones masivas....	59
3.3.6 Evaluación de las aptitudes fermentativas de las cepas preseleccionadas.....	62
(a) Tolerancia al etanol	63
(b) Tolerancia a altas concentraciones de azúcares.....	63
(c) Velocidad fermentativa	63
(c) Cinética de crecimiento a 15°C, 25°C y 35°C.....	64
(d) Análisis de los productos de la fermentación 15°C, 25°C y 35°C	64
3.3.7 Selección final de cepas de levadura.....	65
3.3.8 Análisis sensorial	65
3.3.9 Identificación molecular de las cepas seleccionadas.....	66
3.3.9.1 Aislamiento del DNA genómico de levaduras.....	66
3.3.9.2 Amplificación de la región ITS del rDNA mediante PCR.....	69

3.3.9.3 Análisis de los perfiles de restricción (RFLP) del DNA ribosomal (rDNA)	71
3.3.9.4 Análisis de los perfiles de restricción (RFLP) del DNA mitocondrial (mtDNA).....	74
IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	76
4.1 Muestreo	76
4.2 Análisis fisicoquímicos.....	76
4.2.1 Análisis fisicoquímicos realizados a las muestras de chicha de jora recolectadas del muestreo.....	76
4.2.2 Análisis químico proximal de jora y malta	80
4.2.3 Análisis de la calidad maltera	80
4.3 Aislamiento de levaduras	81
4.4 Identificación presuntiva de la especie <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ...	82
4.5 Pre selección de levaduras mediante fermentaciones masivas	85
4.5.1 Fase I: Fermentaciones masivas	85
4.5.2. Fase II: Detección de clones.....	85
4.6 Evaluación de las aptitudes fermentativas de las cepas preseleccionadas	88
(a) Tolerancia al etanol	88
(b) Tolerancia a altas concentraciones de azúcar	90
(c) Velocidad fermentativa	90
(d) Cinética de crecimiento a 15°C, 25°C y 35°C.....	92
(e) Análisis físico químicos de los productos finales.....	93
4.7 Selección de cepas de levadura en función a sus aptitudes fermentativas.....	97
4.8 Análisis sensorial.....	98

4.9 Identificación molecular de las cepas seleccionadas.....	99
4.9.1 Aislamiento del DNA genómico de levaduras	99
4.9.2 Amplificación de la región ITS mediante PCR	100
4.9.3 Análisis de los perfiles de restricción (RFLP) del DNA ribosomal.....	101
 V CONCLUSIONES	105
VI RECOMENDACIONES.....	106
VII REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	107

ABREVIATURAS

A	Adenina
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphic Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados
C	Citosina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNS	Ácido 3,5 dinitrosalicílico
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DO₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
EDTA	Sal disódica del ácido etilen diamino tetraacético
g	Gramo
G	Guanina
h	Hora
IGS	Inter genic spacer
ITS	Secuencias Internas Transcritas
K⁺R⁺	Fenotipo killer
kb	Kilobases o Kilo pares de bases de DNA
K⁻R⁻	Fenotipo killer sensible
K⁻R⁺	Fenotipo killer neutro
M	Molar
mM	mili Molar
µg	microgramo
min	Minuto
µL	Microlitro
mL	Mililitro
mtDNA	DNA mitocondrial
nm	Nanometro
NCBI	Nacional Center for Biotechnology Information
NFA	Nitrógeno fácilmente asimilable
°C	Grados centígrados

ORF	Open Reading Frame (Marcos de lectura abiertos)
p/v	Relación directa del peso con el volumen
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rDNA	DNA ribosomal
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphic Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción
RNA	Ácido ribonucleico
RNAsa	Ribonucleasa
s	Segundos
S	Medida de sedimentación en unidades sverdberg
T	Tiamina
TAE	Tris Acetato EDTA
v/v	Relación directa de volumen con el volumen
YPD	Yeast Extract Peptona Dextrosa

INDICE DE TABLAS

Tabla 2.1: Especies de levaduras identificadas en chicha de jora.....	6
Tabla 2.2: Especies de bacterias identificadas en chicha de jora.....	7
Tabla 2.3: Composición química de chicha de jora según tabla de la composición de alimentos peruanos.	7
Tabla 2.4: Composición química promedio de 9 muestras de chicha de jora elaborada en Catacaos y Sullana.	8
Tabla 2.5: Composición química promedio de 9 muestras de chicha de jora elaborada en Catacaos y Sullana.	9
Tabla 2.6: Características morfológicas y fisiológicas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
Tabla 2.7: Algunas de las características deseables y no deseables en la selección de levaduras para la producción de vinos de calidad.	33
Tabla 3.1: Primers utilizados para la amplificación de la región ITS del rDNA.	50
Tabla 3.2: Compuestos químicos utilizados en el trabajo.....	53
Tabla 3.3: Diseño experimental aleatorizado con un solo factor con 5 niveles seguido en la detección de clones.....	62
Tabla 3.4: Formato que fue considerado para la prueba sensorial.....	66
Tabla 3.5: Reactivos con sus respectivas concentraciones que fueron utilizadas para la Reacción en Cadena de la Polimerasa.	71

Tabla 3.6: Digestión con la enzima Hae III.	73
Tabla 3.7: Digestión con la enzima Hha I.	73
Tabla 3.8: Digestión con la enzima Hinf I.	73
Tabla 3.9: Digestión del DNA de las cepas de levadura mediante la enzima Hinf I.	74
Tabla 4.1: Procedencia de las muestras de chicha de jora de donde fueron aislados las cepas de levaduras en estudio.	77
Tabla 4.2: Análisis fisicoquímicos realizadas a las chicha de jora Recolectadas.....	79
Tabla 4.3 Análisis químico proximal de jora y malta utilizada en el trabajo por cada 100g de muestra.....	80
Tabla 4.4 Análisis de la calidad maltera de jora y malta empleada en el trabajo.....	81
Tabla 4.5: Distribución de cepas de levadura aisladas de chicha de jora tolerantes al etanol por encima de 7,5% v/v.	84
Tabla 4.6: distribución de cepas tolerantes al etanol por encima del 7,5% (v/v) que se inocularon en los matraces 1 ^a , 2B, 3C para realizar las fermentaciones masivas	85
Tabla 4.7: Fermentación individual de las cepas seleccionadas.	87
Tabla 4.8: Velocidad fermentativa de las cepas seleccionadas.....	91

Tabla 4.9: Productos finales que dejó la cepa 1A-1 en la fermentación de mosto de jora.	95
Tabla 4.10: Productos finales que dejó la cepa 2B-1 en la fermentación de mosto de jora.	95
Tabla 4.11: Productos finales que dejó la cepa 2B-3 en la fermentación de mosto de jora.	92
Tabla 4.11: Productos finales que dejó la cepa 3C-5 en la fermentación de mosto de jora.	96
Tabla 4.12: Puntuación de las cepas en función a sus aptitudes fermentativas.	97
Tabla 4.13: Resultados del análisis sensorial entre las cepas 2B-3 y 3C-5.	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1: El Valle del Mantaro	10
Figura 2.2: Clasificación de las levaduras	12
Figura 2.3: Ciclo vegetativo de <i>S. cerevisiae</i>	22
Figura 2.4: Ciclo biológico de <i>S. cerevisiae</i>	23
Figura 2.5: Glucólisis	25
Figura 2.6: Fermentación alcohólica y gliceropirúvica.....	26
Figura 2.7: Formación de los compuestos aromáticos en las levaduras	28
Figura 2.8: Crecimiento de las levaduras durante la fermentación alcohólica	28
Figura 2.9: Conformación de los ribosomas	40
Figura 2.10: Transcripción y procesamiento de los RNA ribosómicas principales en los eucariotes	40
Figura 2.11: Esquema de la organización de los genes ribosomales.....	41
Figura 3.1: Esquema general del proceso de selección de levaduras <i>S. cerevisiae</i> asiladas de chicha de jora del Valle del Mantaro.....	54
Figura 3.2: Diagrama de flujo del aislamiento de levaduras de chichas de jora.....	57
Figura 3.3: Identificación presuntiva de la especie <i>S. cerevisiae</i>	58

Figura 3.4: Fases que comprende la preselección de levaduras mediante fermentaciones masivas.	61
Figura 3.5: Fases que comprende la extracción de DNA genómico de levaduras.	68
Figura 3.6: Fases que comprende la Amplificación de la región ITS del rDNA mediante PCR.	70
Figura 3.7: Fases que comprende el análisis de los perfiles de restricción (RFLP) del DNA ribosomal (rDNA).	72
Figura 3.8: Fases que comprende el Análisis de los Perfiles de Restricción (RFLP) del DNA mitocondrial (mtDNA).	75
Figura 4.1: Trayectoria seguida en el muestreo de chicha de jora elaborada en el Valle del Mantaro.	78
Figura 4.2: Morfología de algunas colonias de levadura presentes en chicha de jora.	82
Figura 4.3: Porcentaje de las cepas de levadura aisladas de chicha de jora tolerantes al etanol.	83
Figura 4.4 Evaluación del fenotipo killer de las cepas seleccionadas en césped sensible <i>Saccharomyces cerevisiae</i> IBIG-17 (K ⁻ R ⁻)	88
Figura 4.5: Resultados de la tolerancia al etanol de las cepas seleccionadas.	89
Figura 4.6: Resultados de la tolerancia a altas concentraciones de azúcar de las cepas seleccionadas.	91
Figura 4.7: Velocidad fermentativa de las cepas seleccionadas	92

Figura 4.8: Resultados de la cinética de crecimiento a 15°C, 25°C y 35°C.....	94
Figura 4.9: DNA genómico de cepas silvestres de levaduras aisladas de chicha de jora del Valle del Mantaro visto en electroforesis en gel de agarosa al 0,8%.	99
Figura 4.10: Productos de PCR de la Región ITS del rDNA..	100
Figura 4.11: Región ITS de la especie <i>Saccharomyces cerevisia</i> incluyendo parte de los genes 18S rRNA y 26S rRNA.....	101
Figura 4.12: Perfil de restricción de la región amplificada ITS del rDNA generados por las enzimas A) Hinf I, B) Hae III y C) Hha I en gel de agarosa al 2,8%.	102
Figura 4.13: Perfiles de corte producidos por el software “Tcag” con los enzimas de restricción: <i>Hinf I</i> , <i>Hae III</i> y <i>Hha I</i>	103

RESUMEN

El presente trabajo consistió en seleccionar cepas de levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae* las que fueron caracterizadas mediante perfiles de restricción del DNA ribosomal. Se lograron aislar un total de 150 cepas a partir de 15 productores con antigüedad y continuidad de producción mayor a dos años. Estas cepas se sometieron a una identificación presuntiva mediante el criterio de tolerancia al etanol en donde las cepas que presentaban tolerancia al etanol por encima de 7,5%v/v se consideraban cepas presumiblemente *S. cerevisiae* encontrando que 33 cepas presentaban esta característica las que luego fueron sometidas a fermentaciones masivas a 30°C en mosto de jora con 200g/L de azúcar para aislar a las cepas que se imponen a estas condiciones muy restrictivas. De estas fermentaciones masivas se lograron preseleccionar 4 cepas las que fueron evaluadas en sus aptitudes fermentativas tales como tolerancia al etanol, tolerancia a altas concentraciones de azúcar, acidez volátil, fenotipo killer, rendimiento de etanol y además el comportamiento de estas cepas a diferentes temperaturas de fermentación obteniéndose dos cepas 2B-3 y 3C-5 las que presentaron mejores aptitudes fermentativas. En la identificación molecular de las cuatro cepas que fueron aisladas de las fermentaciones masivas se utilizó la técnica molecular del RFLP del DNA ribosomal en la que utilizó tres enzimas de restricción Hinf I, Hae III y Hha I con los que se pudo corroborar que estas cepas pertenecían a la especie *S. cerevisiae* ya que presentaron un perfil de corte similar para cada enzima empleada, además estos perfiles de corte se compararon con los cortes simulados mediante el software "Taccg" a partir de la secuencia de nucleótidos encontradas en la base de datos del NCBI para *S. cerevisiae* encontrándose un mismo perfil de corte con lo que se demostró una vez más que se trataban de cepas pertenecientes a la especie *S. cerevisiae*.

I INTRODUCCIÓN

En nuestro país existe una gran variedad de bebidas autóctonas que perduran a medida que transcurre el tiempo. Una de estas bebidas es nuestra chicha de jora que es una bebida alcohólica obtenida por la fermentación de la materia azucarada contenida en el mosto de malta del maíz, cuyas características singulares le ha permitido ser la bebida principal de las fiestas y ritos religiosos de los incas el cual ha ido transcurriendo hasta el día de hoy e inclusive traspasando fronteras a países de América del Sur. Pero en las fermentaciones espontáneas para obtener este producto, encontramos una gran diversidad de levaduras que participan en dicha fermentación, dentro de los cuales las que predominan son de la especie *Saccharomyces cerevisiae* de las cuales sólo algunas de estas cepas son las que están mejor adaptadas al sustrato y a las condiciones climáticas y sólo algunas de estas son las que poseen excelentes aptitudes fermentativas y organolépticas siendo estas propiedades opacadas por la gran cantidad y diversidad de microorganismos que participan en la fermentación, produciendo en algunos casos, metabolitos secundarios y sustancias tóxicas que alteran las características finales del producto.

La selección de levaduras para uso industrial es en la actualidad uno de los retos para obtener productos diferenciados y de calidad, es así que el presente trabajo se abocó a seleccionar las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* de la chicha de jora para emplearlas en la fermentación de esta bebida además de otras bebidas fermentadas y obtener productos de calidad y con repetitibilidad para lo cual se planteó los siguientes objetivos:

- Aislamiento e identificación presuntiva de las levaduras responsables de la fermentación de la chicha de jora.
- Preselección mediante fermentaciones masivas.
- Estudio de las aptitudes fermentativas de las cepas preseleccionadas.
- Identificación a nivel género, especie y cepa por la técnica molecular RFLP del DNA ribosomal y DNA mitocondrial.

II REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Chicha de Jora

2.1.1 Aspectos generales

La chicha de jora es una bebida alcohólica obtenida por fermentación de la materia azucarada contenida en el mosto del maíz germinado [1]. Esta bebida es oriunda del Perú y en la actualidad se consume en otros países de América del Sur.

La palabra chicha, con que los españoles designaron a la primitiva bebida, proviene de dos voces quechuas: “**chil** = con” y “**chal** = gargajo”, significando literalmente “con gargajo”. Éste significado lo daban ya que en un inicio para la elaboración de esta bebida se acostumbraba a masticar el maíz para ayudar a la fermentación [2].

Desde que tuvo origen esta bebida los antiguos peruanos la introdujeron en su religiosidad y vida diaria, principalmente en los acontecimientos importantes ocurridos en una familia, en el pueblo, o en todo el imperio, en donde había que celebrarlos bebiendo abundante chicha, hombres, mujeres y niños, hasta embriagarse. Así se bebía por el comienzo de la siembra o de la cosecha, y por el término de ellas, por el comienzo y la conclusión de una casa, por el nacimiento de los hijos, por el primer corte de pelo o por el primer diente que le salía, por el primer menstruado de las hijas, por la paz y por la guerra, en fin por los infortunios y por las justas alegrías [3].

Actualmente la palabra “chicha” se ha convertido en una voz genérica de muchas bebidas fermentadas o no, así se dice chicha morada, chicha de maní, chicha de quinua, etc. Además es común encontrar esta bebida en ferias, restaurantes y chicherías especializadas en donde poco a poco va perdiendo esa misticidad que la dieron nuestros ancestros para convertirse en una simple bebida refrescante y es así como la expenden y claro que siempre va de la mano con un pequeño marketing de ser la panacea de todos los males, que hasta cierto punto lo es.

2.1.2 Elaboración

Revisando la historia encontramos que el proceso de elaboración de la chicha ha atravesado por tres periodos en la que en un inicio se pulverizaba el maíz “sin germinar”, se hervía y se le abandonaba para su fermentación. En un segundo periodo empezaron a emplear “maíz germinado” reducido a papilla la cual disolvían en agua para su fermentación, este era ya una bebida alcohólica que llamaron “*wiñapu*” o “*sora*”. En el tercer periodo introdujeron la práctica de mascar el maíz que luego dejaban fermentar esta masa diluida en agua [4].

En la actualidad se elabora la chicha siguiendo las dos primeras técnicas indicadas quedando muy rezagada la última. Además la elaboración de esta bebida varía con las localidades y costumbres de cada lugar, dando a esta bebida características realmente ligadas con la etnografía local [4], pero para todos los casos el flujo de procesamiento es similar, comprendiendo 5 operaciones fundamentales que se describe a continuación.

(a) Malteado del maíz

Esta operación consiste en la germinación del maíz y secado de los granos para dar lugar al producto final llamado “*jora*”, palabra derivada de “*sora*” mencionada anteriormente. Este proceso tiene por objeto degradar el endospermo por las enzimas propias del maíz

que será bien aprovechado por los microorganismos responsables de la fermentación [5].

Actualmente los productores de esta bebida ya no realizan un malteo propio del maíz, en lugar de ello prefieren conseguir la jora ya preparada en los mercados y molineras, quienes son los encargados de distribuir este producto que proviene generalmente del norte del país.

La jora que se expende proviene del maíz alazán cuyas características de poseer una elevada porción amilácea y poco germen le han valido ser el preferido para este objeto [6].

(b) Molienda

La molienda tiene por objeto triturar la jora para que las partículas del mismo se hidraten de modo que liberen fácilmente sus sustratos y así producir el mosto de jora. El tamaño de la partícula deberá sopesar entre la facilidad de liberación del extracto y la facilidad de recuperar el mosto [5].

(c) Cocción

Esta operación tiene por objeto extraer al máximo los compuestos solubles de la jora y para ello se realiza una cocción que va de 6 a 24 horas. Se utiliza de 3 L a 10 L de agua por cada kg de jora [1].

(d) Filtración

Esta operación tiene por objeto de separar el bagazo del mosto. Se realiza por lo general empleando un cedazo [1].

(e) Fermentación

Para la fermentación se deja el mosto en cantaros de arcilla en donde se produce la inoculación de microorganismos de manera natural ya que estos microorganismos se encuentran en las

porosidades de estos recipientes y son los responsables de transformar el mosto jora en la chicha de jora [7].

2.1.3 Flora microbiana de la chicha de jora

En la fermentación de la chicha de jora intervienen diversas especies de bacterias lácticas y levaduras que generalmente pertenecen al género *Saccharomyces*, en donde la especie *Saccharomyces cerevisiae* constituye la principal especie responsable de la fermentación de esta bebida [7]. Las especies de levaduras y bacterias identificadas en la chicha de jora se muestran en las tablas 2.1 y 2.2.

Tabla 2.1: Especies de levaduras identificadas en chicha de jora.

Especies	%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	53
<i>Saccharomyces pasteurianus</i>	11
<i>Brettanomyces anomalus</i>	7
<i>Saccharomyces tropicales</i>	6
<i>Saccharomyces hanseii</i>	5
<i>Saccharomyces elegans</i>	4
<i>Torulaspora famata</i>	4
<i>Saccharomyces fructum</i>	4
<i>Candida solani</i>	3
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	1
<i>Saccharomyces exigius</i>	1
<i>Saccharomyces heterogenes</i>	1

Fuente: Manrique [7]

2.1.4 Composición bromatológica de la chicha de jora

La chicha contiene como componentes esenciales, además del agua, alcohol y CO₂, una cantidad apreciable de sustancias disueltas, tales como azúcares, dextrinas, proteínas, fosfatos, cloruros, ácidos orgánicos

etc. que da un elevado valor nutricional a esta bebida [4]. Estos compuestos se muestran en las tablas 2.3 y 2.4.

Tabla 2.2: Especies de bacterias identificadas en chicha de jora.

Especies	%
<i>Lactobacillus pasteurianus</i>	35
<i>Lactobacillus delbruekii</i>	26
<i>Bacillus subtilis</i>	18
<i>Escherichia coli</i>	8
<i>Bacillus cereus</i>	5
<i>Enterobacter aerogenes</i>	5
<i>Micrococcus spp.</i>	3

Fuente: Manrique [7].

Tabla 2.3: Composición química de chicha de jora según tabla de la composición de alimentos peruanos.

Composición por 100g de parte comestible	
Energía (kcal)	28
Agua (g)	93.2
Proteína (g)	0.4
Grasa (g)	0.3
Carbohidratos (g)	5.8
Fibra (g)	0.2
Ceniza (g)	0.3
Calcio (mg)	22
Fósforo (mg)	18
Hierro (mg)	1.8
Tiamina (mg)	0.02
Riboflavina (mg)	0.1
Niacina (mg)	0.2
Ac. Ascórbico reducido (mg)	2.4

Fuente: Collazos [8].

Tabla 2.4: Composición química promedio de 9 muestras de chicha de jora elaborada en Catacaos y Sullana.

Composición	
pH	3.28
Densidad (g/mL)	1.0055
Grado alcohólico (g/100 mL)	6.64
Acidez total (g/L Ac. sulfúrico)	5.25
Acidez fija (g/L Ac. sulfúrico)	4.62
Acidez volátil (g/L Ac. acético)	0.5640
Residuo seco (g/100 mL)	5.00
Humedad (g/100mL)	95.00
Extracto etéreo (g/100 mL)	0.34
Proteína (g/100 mL)	0.31
Fibra (g/100 mL)	0.18
Carbohidratos (g/100 mL)	3.97
Azúcares reductores directos (g/100 mL)	0.319
Azúcares totales (g/100 mL)	1.390
Cenizas totales (g/100 mL)	0.196
Cenizas solubles (g/100 mL)	0.173
Cenizas insolubles (g/100 mL)	0.017
Cloruros (g/100 mL)	0.080
Fósforo (mg/L)	229.63
Calcio (mg/L)	154.00
Hierro (mg/L)	8.63
Magnesio (mg/L)	241.11
Potasio (mg/L)	350.00
Sodio (mg/L)	216.67
Acido ascórbico (mg/100 mL)	4.22
Valor calórico (kcal/100 mL)	20.07

Fuente: Gonzáles [3].

2.2 El Valle del Mantaro

El Valle del Mantaro es denominado así por que está irrigado por el majestuoso río Mantaro la cual divide al Valle en dos márgenes: derecha e izquierda. Este valle esta lleno de pueblos y comunidades campesinas a lo largo de su superficie, pero además se desarrollan ciudades a paso acelerado teniendo como representantes a la ciudad Huancayo, en la que se encuentra el manejo político y económico del Valle [9,10].

2.2.1 Ubicación geográfica [9,10]

- Ubicada entre la Cordillera de los Andes Peruanos.
- Dimensiones: 53km de largo, la parte más angosta de 4 km. y de 21km., la parte más ancha.
- Altura sobre el nivel del mar: 3,330 m (promedio).
- Población: 506,275 habitantes.
- Clima: Templado y seco.
- Humedad relativa: 62,2%.
- Temperaturas promedios: día: 13°C, noche: 8°C.
- Precipitación de lluvias anual 760 mm (aproximadamente): de mayo a setiembre estación seca, de octubre a abril estación lluviosa.
- Topografía: Accidentado.
- Hidrografía: Ríos: Mantaro, Florido, Chilca, Schullcas, Cunas.
- Economía: agricultura y comercio
- Provincias: Huancayo, Jauja, Concepción, Chupaca.

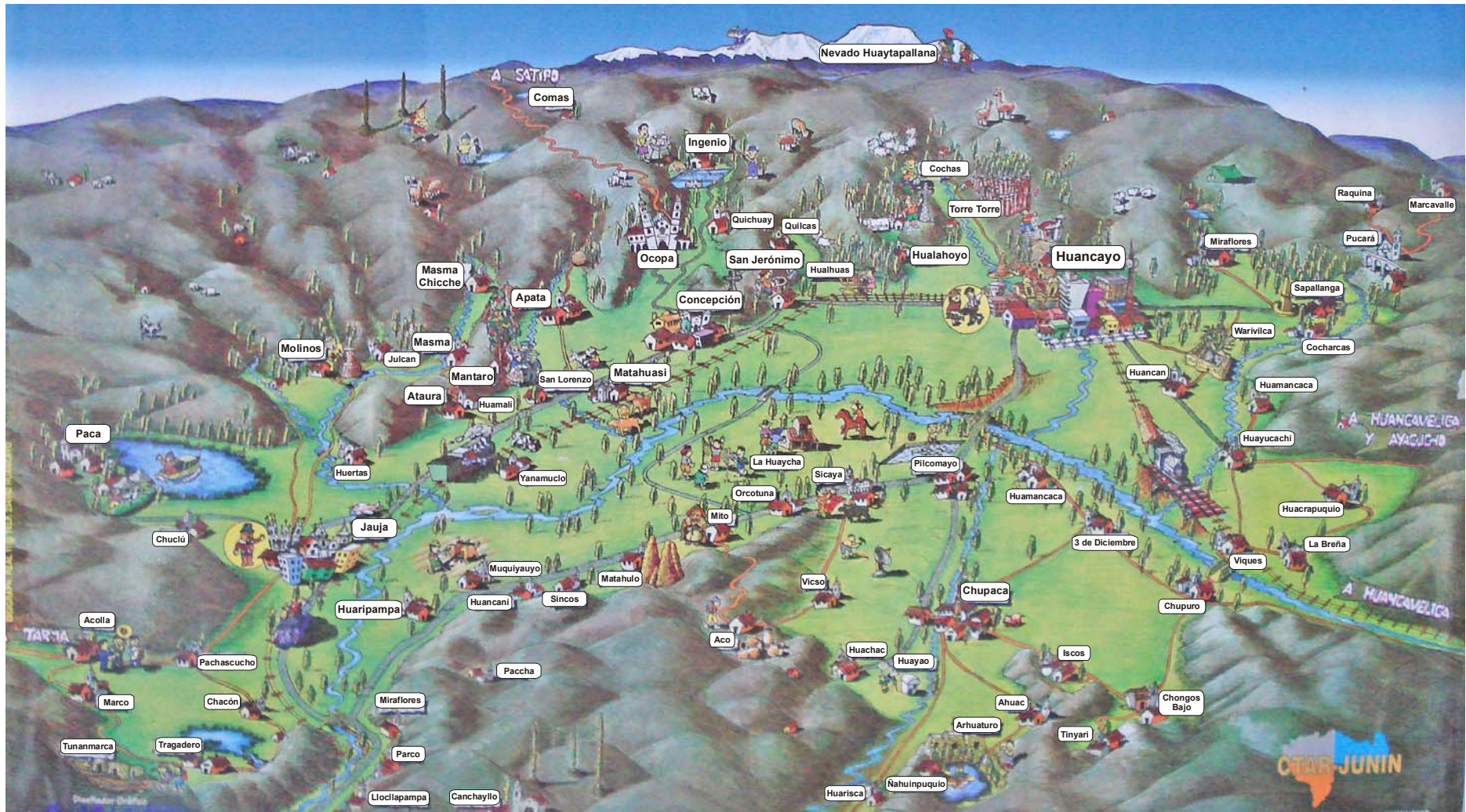


Figura 2.1: El Valle del Mantaro – CTAR Junín – Perú.

2.3 Levaduras

2.3.1 Aspectos generales

El término levadura no tiene significado taxonómico y sólo es utilizado para describir el estado morfológico de un hongo. Así el término de levadura se emplea para denominar a los hongos unicelulares [11], cuyo crecimiento vegetativo se produce en su mayoría a partir de la gemación o fisión binaria y cuyas esporas sexuales no se forman en el interior de cuerpos fructíferos [12].

Por lo que respecta a la morfología, pueden presentar forma redondeada, ovoidea o elongada los que varían de 3 a 15 μm de diámetro, siendo relativamente constante para la misma especie. Macroscópicamente, las levaduras producen colonias pastosas y opacas en medios sólidos y que generalmente llegan a 0,5 a 3 mm de diámetro. Unas pocas especies son característicamente pigmentadas, pero muchas son de color crema [13].

2.3.2 Clasificación

Las levaduras pertenecen al reino Fungi y dentro de él a la división Eumicota que agrupa a los denominados hongos verdaderos. Dentro de esta división las levaduras se incluyen en 2 de las 5 subdivisiones de los Eumicetos. La Ascomycota representada por las levaduras capaces de producir ascosporas, llamadas por ello esporógenas, y la Deuteromycotina representada por las levaduras incapaces de formar esporas llamadas por ello asporógenas o no esporógenas. Los géneros de levaduras esporógenas, englobados todos ellos en la familia Saccharomycetaceae se distribuyen en 3 subfamilias. Las levaduras no esporógenas constituyen la familia Cryptococcaceae [14]. Esta clasificación se muestra en la figura 2.2.

Reino	Fungi		
División	Eumycota		
Subdivisión	Ascomycotina	Basidiomycotina	Deuteromycotina
Clase	Hemiascomycetales		Blastomyces
Orden	Endomycetales		
Familia	Saccharomycetaceae		Cryptococaceae
Subfamilia	Saccharomycetoideae	Nadsonioideae	Schizosaccharomycetoideae
Géneros	<i>Debaryomyces</i>	<i>Hanseniaspora</i>	<i>Schizosaccharomyces</i>
	<i>Dekkera</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Brettanomyces</i>
	<i>Hansenula</i>		<i>Candida</i>
	<i>Kluyveromyces</i>		<i>Cryptococcus</i>
	<i>Pichia</i>		<i>Kloeckera</i>
	<i>Saccharomyces</i>		<i>Rhodotorula</i>
	<i>Torulaspora</i>		
	<i>Zygosaccharomyces</i>		

Figura 2.2: Clasificación de las levaduras [15].

2.3.3 Ecología

Las levaduras que incluyen tanto formas aerobias como anaerobias facultativas, están ampliamente distribuidas en la naturaleza. Así, se encuentran sobre las hojas, frutas, carnes en salazón tales como el tocino y en el jamón, en el néctar de las flores, en el suelo, y sobre nuestros cuerpos como miembros de las microbiota habitual [14].

La vasta mayoría de las levaduras son mesófilas que pueden desarrollarse a temperaturas de 0 a 48°C, también están las psicrófilas cuya temperatura máxima de crecimiento se sitúa en 20°C o menos y finalmente tenemos a la levaduras termófilas cuya temperatura mínima de crecimiento es de 20°C, siendo la temperatura máxima de desarrollo hacia 48 – 50°C. En general, las levaduras no son termorresistentes ya que su termodestrucción empieza a darse a 52°C. Estas diferencias en la temperatura de crecimiento influyen en la composición en ácidos grasos de las membranas plasmáticas: cuanto más baja es la temperatura de crecimiento, la tasa de ácidos grasos insaturados aumenta [17].

En cuanto a la actividad de agua, algunas levaduras que alteran los alimentos pueden crecer en el rango de 0,90 - 0,95 mientras las demás en el rango de 0,912 - 0,876, y unas muy pocas que crecen a presiones osmóticas más elevadas correspondientes a una actividad de agua de 0,62 como es el caso de *Zygosaccharomyces rouxii* [18], que acumula polioles en su interior para minimizar la diferencia de presión osmótica entre la célula y el medio [17].

La mayoría de las levaduras toleran un rango amplio de pH que va de 3 a 10. Para su crecimiento prefieren medios ligeramente ácidos con un pH de 4,5 a 6,5. [18]

Todas las levaduras son capaces de desarrollarse en presencia de oxígeno: no se ha reportado células anaerobias estrictas y aunque unas especies son fermentadoras otras no lo son como por ejemplo los géneros *Cryptococcus* y *Rhodotorula*. *Saccharomyces* y unos pocos géneros más, son fermentadores enérgicos de los azúcares pero pronto detienen su crecimiento y multiplicación por falta de oxígeno. *Dekkera* y su anamorfo *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces bailii* y algunas otras, fermentan glucosa más rápidamente bajo condiciones aerobias que anaerobias [18].

En cuanto al etanol no todas las levaduras presentan la misma sensibilidad al etanol. Las más resistentes son las *Saccharomyces* que se utilizan en los procesos de fermentación alcohólica para la elaboración de bebidas o en la producción industrial de etanol. Esta tolerancia depende de la composición en ácidos grasos de las membranas citoplasmáticas. Según las cepas y el estado fisiológico del cultivo, el etanol es tóxico en concentraciones de 8 a 18% (p/v) [17].

En cuanto a la resistencia a los antibióticos, el cloranfenicol inhibe la síntesis de las proteínas mitocondriales sin afectar a la síntesis de las proteínas citoplasmáticas, por lo que en presencia de cloranfenicol, únicamente se pueden desarrollar las levaduras capaces de fermentar, en presencia de un sustrato fermentable [17]. Respecto a la cicloheximida o

actidiona, todas las levaduras presentan sensibilidad a este antibiótico a concentraciones distintas, lo que ha permitido distinguir 3 grupos de levaduras en función a esta sensibilidad [17] y que son mencionados a continuación.

- Levaduras tolerantes hasta 1 $\mu\text{g/mL}$, las *Saccharomyces* forman parte de este grupo.
- Levaduras tolerantes hasta 25 $\mu\text{g/mL}$; es el caso de las *Schizosaccharomyces*.
- Levaduras tolerantes hasta 1 mg/mL ; es el caso de *Zygosaccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera* y *Kluyveromyces marxianus*.

2.3.4 Necesidades nutricionales

Las levaduras utilizan los compuestos carbonados como fuente de energía y como fuente de carbono. Solo unos pocos glúcidos, principalmente hexosas, los disacáridos y trisacáridos pueden ser fermentados por estos microorganismos, pero el rango de compuestos que pueden asimilar es mucho más amplio incluyendo pentosas, alcoholes, ácidos orgánicos, aminoácidos y glucósidos [18].

Las fuentes comunes de nitrógeno utilizadas por las levaduras son amonio, urea y aminoácidos. Muchas especies sintetizan todas las vitaminas necesarias pero otras requieren biotina y otros compuestos como tiamina y adenina [18].

También requieren fósforo, azufre, potasio, magnesio, zinc, calcio entre otros componentes. El fósforo en forma de iones fosfato (PO_4^{-3}) regula la síntesis de los lípidos y los glúcidos. El potasio estimula la fermentación y la respiración a pH ácido consumiendo dos veces más de potasio en la fermentación que en la respiración. El magnesio y zinc actúan como cofactor de enzimas. El calcio mantiene la integridad celular a nivel de las membranas en entornos hostiles [17].

2.3.5 Reproducción

Las levaduras pueden reproducirse asexualmente y sexualmente, en la primera lo hacen mediante gemación que es el proceso de división celular acoplado a la mitosis y en la segunda ocurre por conjugación entre dos células de tipo sexual opuesto (a , α) con formación de un cigoto diploide. En condiciones carenciales de nutrientes tales como nitrógeno, las levaduras pueden sufrir un proceso de esporulación con una división reduccional (meiosis) que conduce a la formación de ascas o basioesporas [19].

Las levaduras retienen una cicatriz característica en el sitio de la pared celular donde alguna vez estuvo unido un brote [13]. La formación de estas yemas está en función a la fase de crecimiento, encontrando que en la fase estacionaria la formación de yemas es baja y en la fase de crecimiento, donde las condiciones son favorables para el crecimiento, pueden formar hasta 43 yemas [20].

2.4 La especie *Saccharomyces cerevisiae*

2.4.1 Aspectos generales

Saccharomyces cerevisiae, levadura perteneciente a la clase Ascomycetes, orden Endomycetales y familia Saccharomycetaceae es quizás la levadura más importante para la humanidad, ya sea por su utilización desde hace miles de años en la producción de pan y bebidas alcohólicas por fermentación, o por ser uno de los organismos eucarióticos modelo más intensamente estudiados a nivel de su biología celular y molecular para el desarrollo de la biología molecular y genética. Esto condujo a que fuera el primer genoma eucariota completamente secuenciado cuyo análisis del mismo reveló un tamaño de unas 13 000 kb y unos 6 275 genes. El 72% de las secuencias corresponden a secuencias codificantes siendo el tamaño promedio de los genes de 1,45 kb y solamente el 3,8% de los ORFs (marcos de lectura abiertos) contienen

intrones además estudios comparativos de las secuencias permitieron estimar que el 23% de su genoma era similar al de nosotros. [21].

Si *Escherichia coli* ha sido el material más empleado en investigaciones dentro del mundo procariota, *Saccharomyces cerevisiae* es su equivalente como modelo de célula eucariota [19].

La taxonomía clásica de las levaduras que se basa en características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas ha dado lugar a que el género *Saccharomyces* se divida en diferentes especies con relación a fermentaciones alcohólicas, dentro de las que destacan: *S. cerevisiae*, *S. diastaticus*, *S. carlsbergensis*, *S. bayanus*, *S. ellipsoideus*, *S. chevalieri*, *S. oviformis*, *S. italicus*, *S. capensis*, *S. vini*, *S. sake*, etc. Pero la biología molecular ha permitido percatarse de que a pesar de la gran diversidad de formas, funciones y características bioquímicas, todas estas especies mencionadas no son sino diferentes cepas de una sola especie: *Saccharomyces cerevisiae*. Todas estas cepas presentan diferencias funcionales de gran importancia tecnológica para los procesos de producción de bebidas alcohólicas; estas diferencias, aunque aparentemente son muy significativas, no son sino el resultado de pequeñas mutaciones en el material genético, incluso muchas veces fácilmente inducibles, que no contribuyen en forma importante al grado de diferencia en la homología del ADN, es decir, si comparamos el material genético de estas cepas entre ellas y con las cepas plenamente identificadas encontraremos que es similar en proporciones cercanas al 100% [22].

Además la biología molecular ha permitido establecer que *S. bayanus* y *S. pastorianus* (sin. *S. carlsbergensis*, *S. uvarum*) son especies distintas [22].

La forma de las células de *S. cerevisiae* puede ser esférica, elipsoidal, cilíndrica o sumamente alargada, en agrupaciones de dos cadenas cortas de racimos o bien sin agruparse; pueden formar o no

pseudomicelio. La apariencia de las colonias es muy diversa: de color crema a ligeramente café, de lisas a rugosas, en ocasiones sectorizadas, brillantes u opacas. Esporulan formando de una a cuatro ascosporas de forma redonda a ligeramente elipsoidal. Fermentan y asimilan la glucosa y normalmente también la sacarosa, maltosa y galactosa, no así la lactosa, (tabla 2.6) son incapaces de utilizar las pentosas y no fermenta las dextrinas liberadas en el mosto de cerveza por la acción de la malta a excepción de *S. diastaticus* quien posee una amiloglucosidasa capaz de hidrolizar totalmente las dextrinas lo cual ha despertado el interés de clonar el gen de la amiloglucosidasa en cepas de cervecera [17].

Tabla 2.6: Características morfológicas y fisiológicas de la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

Características morfológicas y fisiológicas	
Crecimiento a 37°C	+
Seudohifas verdaderas	-*
Clamidiosporas	-
Tubos germinales	-
Cápsulas	-
Asimilaciones	
Glucosa	+
Maltosa	+
Sacarosa	+
Lactosa	-
Galactosa	+
Melibiosa	-
Celobiosa	-
Xilosa	-
Rafinosa	+
Trehalosa	+*
Fermentaciones	
Glucosa	F
Maltosa	F
Sacarosa	F
Lactosa	-
Galactosa	F

* : Variación de cepa

+: Crecimiento o presencia de estructura.

-: Ni crecimiento en el control ni fermentación.

F: Fermentación con producción de gas

Fuente: Zinsser [13].

La capacidad de crecer en medios libres de vitaminas es variable, lo cual implica que algunas cepas presentan auxotrofias y otras no; sin embargo, aun cuando no existan requerimientos absolutos por ellas, las vitaminas en el medio estimulan el crecimiento e incrementan la productividad. La auxotrofia más común es por biotina, y algunas cepas presentan también por ácido pantoténico, ácido nicotínico, tiamina, inositol, etc. Existen un requerimiento absoluto por ergosterol y otros esteroides, ácidos grasos insaturados y ácido nicotínico en *S. cerevisiae* cuando se crece en condiciones estrictamente anaerobias; estos requerimientos no se manifiestan cuando la levadura crece en condiciones aerobias o microaerófilas, ya que con la presencia de oxígeno en concentraciones de por lo menos 1 ppm el microorganismo es capaz de sintetizar estos nutrimentos. La anaerobiosis absoluta en ausencia de estos compuestos se manifiesta en baja productividad de alcohol, pobre viabilidad, y finalmente en imposibilidad de seguir creciendo [22].

Al crecer en medio líquidos algunas flocculan y otra no; el sedimento puede irse al fondo del fermentador o a la superficie, y la tendencia de floccular puede presentarse al final de la fermentación o en etapas tempranas. Esta variedad de comportamientos tienen un gran significado práctico, ya que la tendencia a floccular facilita la operación de separación de la levadura, pero es muy importante que la sedimentación se presente hasta el final de la fermentación, ya que de otra manera se dificulta mantener el cultivo homogéneo y la asimilación de nutrimentos por la levadura puede fácilmente dejar de ser completa y por, lo tanto, disminuir los rendimientos de la fermentación. Este fenómeno de flocculación se debe a un cambio en la composición de la pared celular de la levadura, donde tienen particular relevancia las proteínas y carbohidratos de la superficie, provocando la agregación de las células mediante la formación de puentes de calcio o de magnesio [22].

La capacidad de producción de alcohol y la tolerancia al mismo son dos características relacionadas desde el punto de vista funcional ya que la segunda puede limitar a la primera; sin embargo, son independientes en su

origen fisiológico, es decir, la habilidad de una levadura de producir alcohol a partir de un carbohidrato no necesariamente implica que ésta tenga alta tolerancia y viceversa. La producción de alcohol es un fenómeno complejo cuyo rendimiento depende de diversos factores, por ejemplo las características intrínsecas de la cepa, las condiciones de aeración, las concentración del inóculo, la composición del medio, las condiciones de fermentación, etc. [22].

La concentración de oxígeno en el medio tiene una relación inversamente proporcional a la productividad específica de etanol, lo cual se conoce como efecto Pasteur. No obstante concentraciones muy bajas de oxígeno son indispensables para la síntesis de los lípidos, los cuales son componentes fundamentales de la membrana celular. Por otra parte, en medios muy bien oxigenados pero con altas concentraciones de azúcares fermentables se reprime la síntesis y actividad de las enzimas respiratorias y se produce etanol; a este fenómeno se le conoce como efecto Crabtree [22].

Por otra parte, la tolerancia al alcohol es una resultante compleja que involucra fenómenos bioquímicos, fisicoquímicos y metabólicos; de hecho no existe una definición universal de tolerancia al alcohol; este término puede referirse a la concentración de alcohol que inhibe el crecimiento (la cual es la definición más común) o bien a la inhibición sobre la velocidad específica de fermentación o al efecto sobre las viabilidad. La tolerancia al alcohol depende, además de las características genéticas de la cepa, de diversos factores ambientales como: concentración de azúcares en el medio desde el inicio de la fermentación y en fases posteriores, estado metabólico de las células, temperatura, pH, y de manera importante la concentración del etanol en las diferentes etapas de la fermentación. El efecto inhibitorio del etanol tiene de hecho dos modos de acción: uno no específico, que se debe a la reducción de la actividad de agua en el medio, y el otro específico, donde el solvente actúa en contra de algunos componentes celulares; por ejemplo algunas enzimas. Los esteroides y ácidos grasos insaturados sintetizados en presencia de oxígeno, tienen

también un papel fundamental en el incremento de la tolerancia al etanol. La suplementación del medio con vitaminas y proteínas también mejora la tolerancia al alcohol [22].

El efecto de inhibición por alcohol y el de inhibición por una alta osmolaridad en el medio son sinérgicos, por lo tanto, altas concentraciones de azúcares reducen la capacidad de tolerar alcohol [22].

Los términos “levadura alta” o “fermentación alta” y “levadura baja” o “fermentación baja” se refieren a la propiedad de muchas de las cepas de levaduras utilizadas en cervecería a flocular y flotar formando una nata hacia el final de la fermentación en el primer caso a flocular y hundirse en el fermentador en el segundo, una vez terminada la fermentación. Tradicionalmente las cervezas tipo **ale** se han elaborado con la levadura alta, compuesta de cepas que siempre se han considerado de la especie *S. carlbergensis* considerada ahora *S. pastorianus* (Sinónimos *S. carlbergensis*, *S. uvarum*), mientras que las cervezas tipo **lager** se han elaborado con levaduras bajas, pertenecientes a la especie *S. cerevisiae* [22, 23].

El uso de *S. cerevisiae* no solo está limitado a la producción de bebidas alcohólicas sino que actualmente esta especie es utilizada en la industria biotecnológica esta especie es utilizada como agente para la obtención de proteínas, vitaminas del complejo B, pigmentos, cofactores, proteínas de organismos unicelulares, biomasa y otros productos con valor añadido [24].

2.4.2 Ciclo biológico

El ciclo celular es una sucesión ordenada de procesos mediante los cuales una célula crece y se divide en dos. Históricamente el ciclo celular se le ha dividido en cuatro fases: la fase S (síntesis) durante la cual se replica el DNA, la fase M (mitosis) en la que se segregan los cromosomas y se dividen las células, y dos fases G1 y G2 (*gap*) que separan el final de la

mitosis del inicio de la replicación (G1) y el final de la replicación del inicio de la mitosis (G2) [25].

Durante el ciclo vegetativo, *S. cerevisiae* se divide por gemación. A partir de una célula madre se desarrolla una célula hija o yema que crece hasta un tamaño similar al de la madre, teniendo lugar en este momento la citoquinesis, septación y separación de las células. Este ciclo se puede dividir en dos grandes etapas: la primera de ellas es la mitosis, en la que tiene lugar la separación del material genético, en sus cuatro etapas: profase, metafase, anafase y telofase, y que concluye con la formación del tabique o septo entre las dos células; la otra gran etapa del ciclo es la interfase, que englobaría el resto de procesos entre dos mitosis sucesivas. En la interfase se distinguen dos fases de aparente transición, G1 y G2, separadas por la fase S o de síntesis de nuevo DNA. En las fases G1 y G2 suceden procesos esenciales para la célula (crecimiento en tamaño, generación de maquinaria subcelular, etc.). Entre ellos se encuentra, al final de G1, la llegada al punto conocido como START (figura 2.3) en la que se coordina el crecimiento con la división celular: la célula solo entrará en un nuevo ciclo celular si ha alcanzado un tamaño crítico y las condiciones medioambientales son apropiadas. Además, en este punto de control de la fase G1 la célula decide su destino entre las diferentes opciones de desarrollo: 1) ejecutar START y comprometerse con una nueva ronda de división; 2) parar el ciclo celular en G1, dando lugar a la entrada en fase G0, o la esporulación (figura 2.4), dependiendo del tipo celular y de la severidad de la limitación de nutrientes; 3) en el caso de las células haploides responder a la presencia de feromonas parando el ciclo celular y activando el proceso de conjugación [25]. Una vez superado este punto de control del ciclo, la mitosis es un proceso irreversible. En ese momento se duplica el cuerpo polar del huso y se inicia la emergencia de la yema, que crecerá durante el resto de G1 y S hasta la mitosis.

Cuando una célula de *S. cerevisiae*, tipo sexual α o α , detecta la presencia de la feromona secretada por el tipo sexual opuesto (factor a o factor α), el ciclo vegetativo se detiene en G1 antes de llegar a START, y

comienza el ciclo sexual: la célula sufre una serie de modificaciones morfológicas que la llevan a formar una proyección dirigida hacia la fuente de feromona (la morfología de estas células se denomina “shmoo”). La célula de tipo sexual opuesto sufre los mismos cambios, y todo ello conduce a la conjugación de ambas células [26].

El ciclo biológico de la especie *S. cerevisiae* consta de dos fases: haploide y diploide. Las células haploides presentan dos posibilidades en su ciclo biológico: un ciclo de reproducción vegetativo, por el que la célula se divide para dar dos células iguales; y un ciclo sexual, en el que dos células de tipo sexual opuesto se fusionan para dar lugar a una célula diploide, que entra de nuevo en un ciclo de división vegetativo. En condiciones determinadas, como la limitación en la fuente de carbono, la célula diploide sufre una meiosis que genera cuatro esporas haploides, las cuales, al germinar, iniciarán un nuevo ciclo vegetativo. Además se ha observado en algunas cepas diploides, bajo condiciones de ayuno de nitrógeno en medio sólido pueden desarrollar una transición dimórfica y mostrar un patrón de crecimiento pseudohifal. En cepas haploides, el fenómeno paralelo se manifiesta como crecimiento invasivo con penetración en el agar [25].

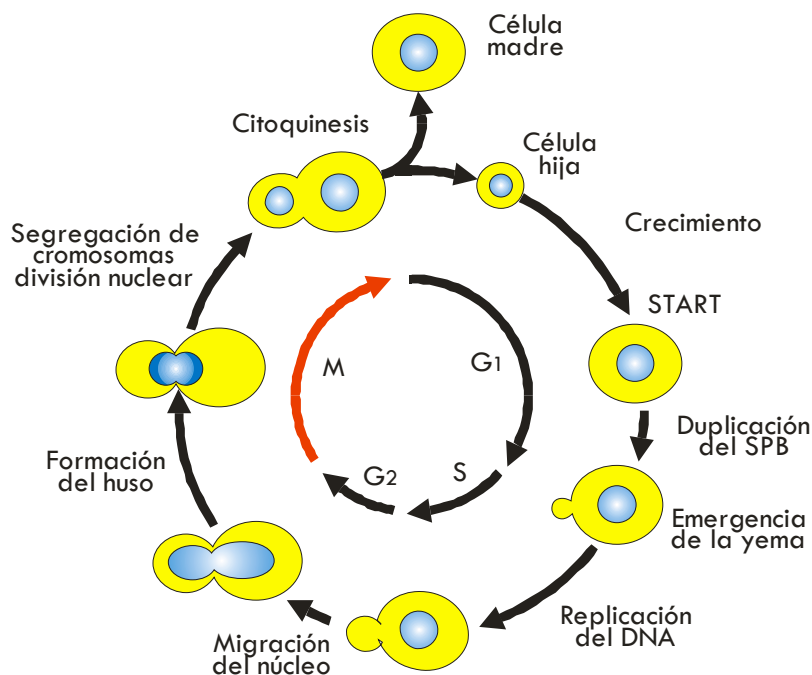


Figura 2.3: Ciclo vegetativo de *S. cerevisiae* [25]

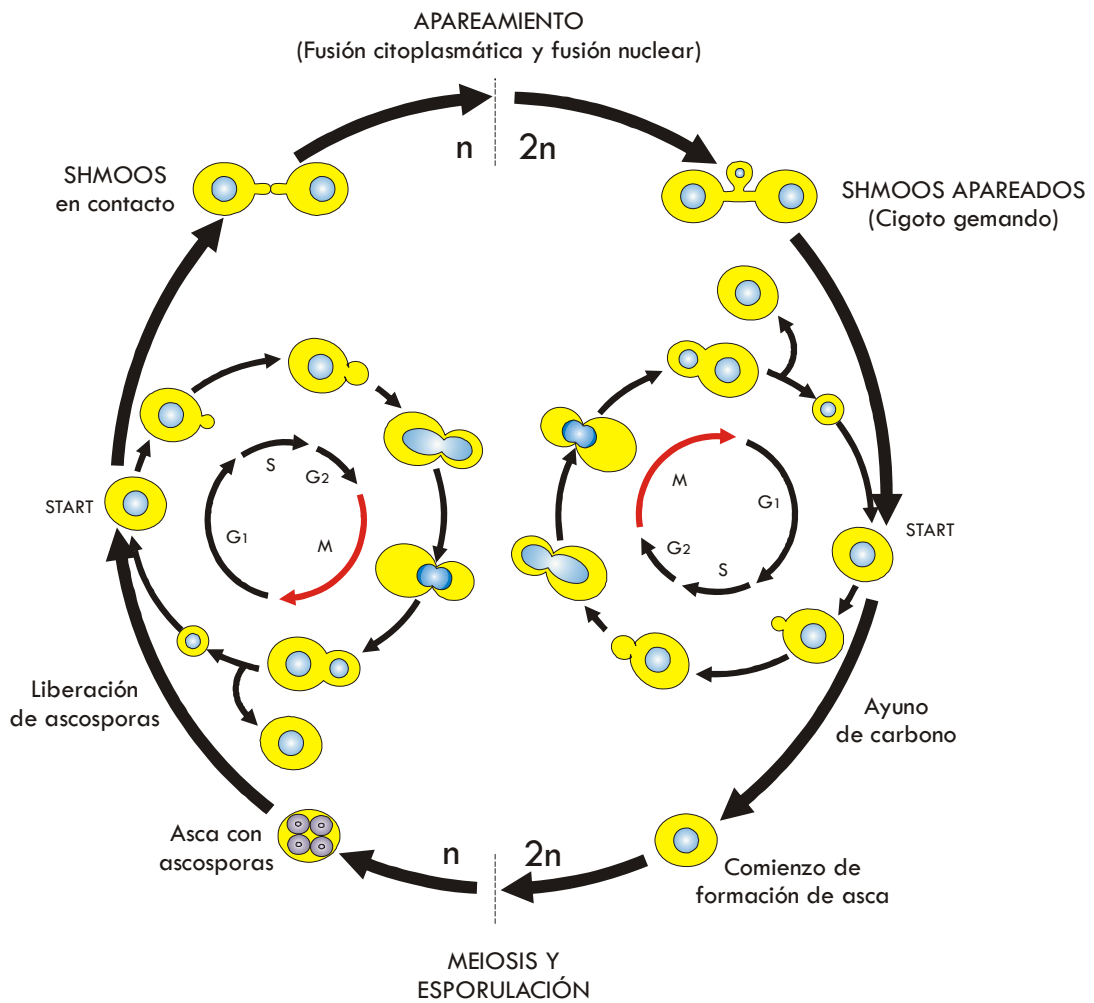


Figura 2.4: Ciclo biológico de *S. cerevisiae* [19].

2.5 Bioquímica de la fermentación alcohólica

2.5.1 Aspectos generales

Todos los heterótrofos obtienen fundamentalmente su energía de las reacciones de oxidación - reducción, es decir, aquellas en las que los electrones son transferidos desde un compuesto, el dador electrónico, o agente reductor, a un aceptor electrónico, el agente oxidante [27].

La fermentación es una de las diversas rutas catabólicas mediante las cuales muchos organismos obtienen energía química de varios

combustibles orgánicos en ausencia de oxígeno molecular o, de una manera más general, cualquier compuesto inorgánico oxidado [27, 28].

Las levaduras pueden obtener la energía que les es necesaria para vivir, siguiendo dos vías en la transformación de los azúcares del mosto, la respiración y la fermentación [29].

La Respiración es la vía oxidativa de los combustibles orgánicos por el oxígeno molecular; el oxígeno actúa, por tanto, como el aceptor electrónico final en la respiración [27].



En la Fermentación ocurre una degradación incompleta de los azúcares hasta CO_2 y etanol. Los electrones pasan desde un intermediario orgánico producido en la degradación del azúcar, el dador electrónico, hasta otro intermediario orgánico, que actúa como aceptor electrónico [27]. Este proceso libera muy poca energía; por ello, las levaduras al utilizar esta vía deben transformar mucho azúcar en alcohol para cubrir sus necesidades energéticas [29].



Independientemente de la vía utilizada, la principal ruta bioquímica en la degradación de los azúcares es la glucólisis, a través de la cual la glucosa se transforma en ácido pirúvico, figura 2.5 [29].



2.5.2 Fermentación alcohólica

En la fermentación alcohólica se pueden distinguir dos etapas. En una primera etapa las levaduras degradan algunas moléculas de azúcar

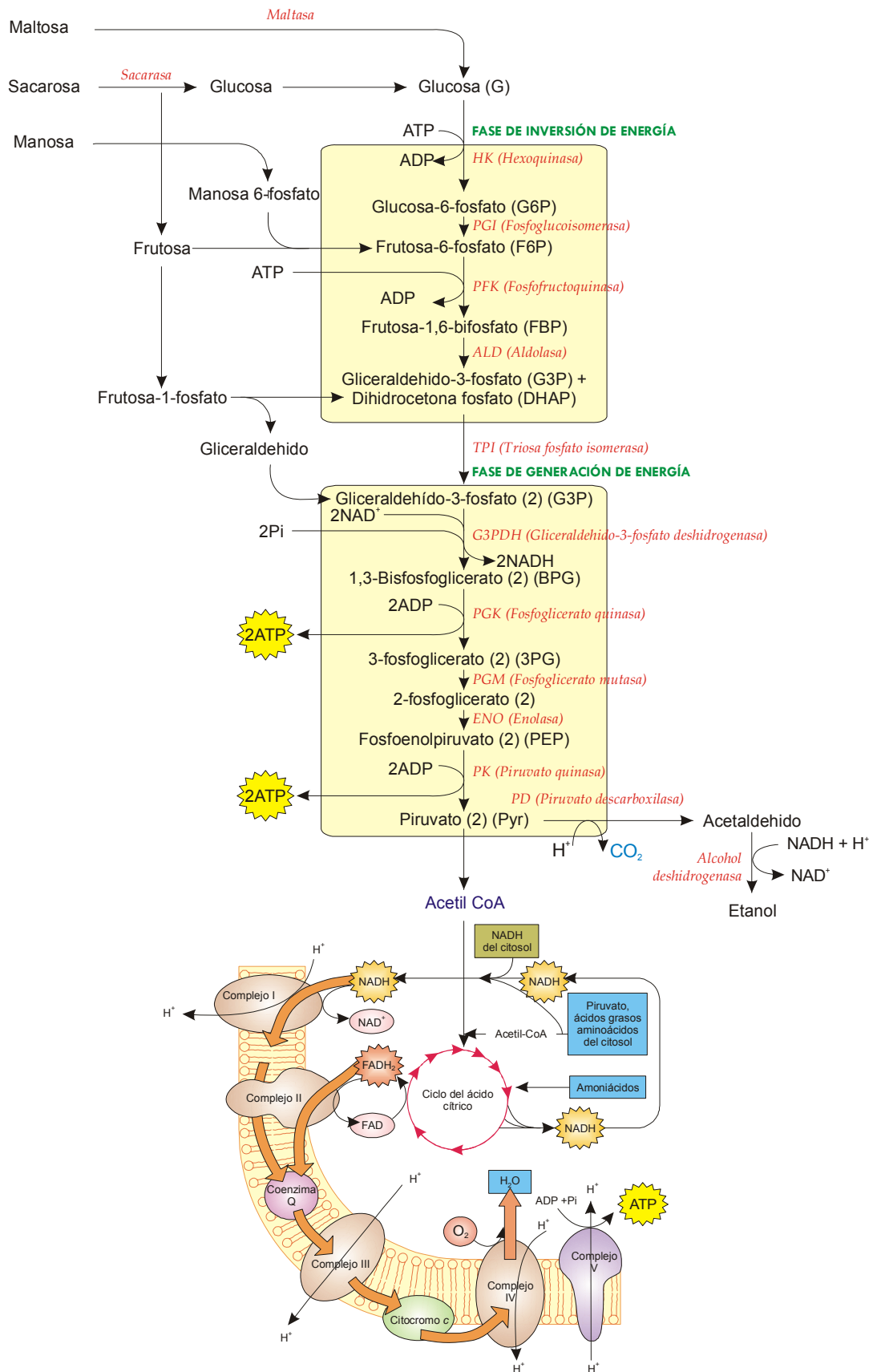


Figura 2.5: Glucólisis, fermentación alcohólica y respiración [27, 37].

por vía respiratoria: el metabolismo sigue la ruta de la glicólisis, pasando el ácido pirúvico formado al ciclo de Krebs con una elevada producción de energía, que permite una rápida multiplicación de las levaduras alcanzando una gran biomasa. Esta etapa se mantiene hasta agotar el oxígeno disuelto en el mosto. Una vez agotado el oxígeno, las levaduras comienzan a seguir la vía fermentativa. En la ruta fermentativa, el ácido pirúvico formado en la glicólisis se descarboxila a acetaldehído y éste a su vez, se reduce posteriormente, a etanol [29]. Pero no todas las moléculas de azúcares del mosto van a seguir la ruta de la glucólisis hasta la obtención de etanol y anhídrido carbónico, sino que dependiendo del propio metabolismo de las levaduras, una parte de los azúcares son degradados mediante la fermentación gliceropirúvica (figura 2.6), en la que además de glicerina se forma ácido pirúvico: este compuesto será el origen de los diferentes productos secundarios de la fermentación alcohólica tales como: ácido succínico, ácido acético, ácido láctico, los metabolitos del ciclo diacetilo - acetoínico, etc. [29].

En la fase tumultuosa no existe fermentación alcohólica pura, estando los mecanismos bioquímicos de la fermentación alcohólica y la fermentación gliceropirúvica estrechamente relacionados [29].

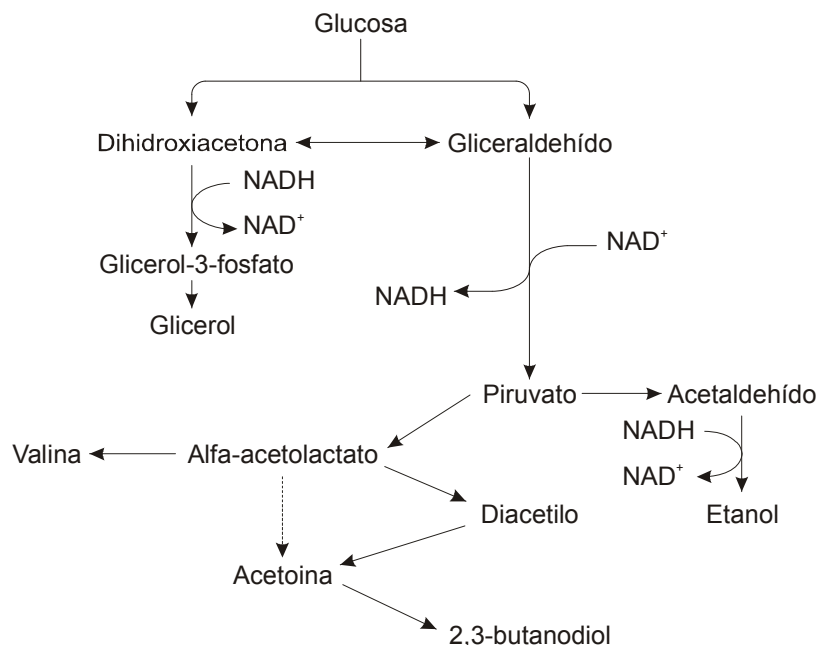


Figura 2.6: Fermentación alcohólica y gliceropirúvica [29].

Simultáneamente y de forma asociada a esta degradación de los azúcares se produce la transformación de otros compuestos, fundamentalmente materia nitrogenada y compuestos azufrados, necesarios para el mantenimiento de las estructuras celulares y la multiplicación de las levaduras. Los principales productos del metabolismo nitrogenado de las levaduras en los productos fermentados son los alcoholes superiores como el isobutanol, los alcoholes amílicos o el 2-feniletanol, que junto con sus ésteres contribuyen a la calidad organoléptica de los productos fermentados como el vino (figura 2.7), aunque alguno de estos alcoholes superiores provenga como el caso del n-propanol del metabolismo glucídico [29].

Los compuestos azufrados se utilizan en los procesos de biosíntesis de aminoácidos, proteínas y vitaminas necesarios para la multiplicación de las levaduras. Este metabolismo azufrado puede producir compuestos como el ácido sulfhídrico o los mercaptanos que afectan negativamente a las características organolépticas de los productos fermentados, y cuya formación va ligada a la necesidad de la levadura de sintetizar aminoácidos azufrados. Todos estos procesos bioquímicos quedarían englobados en lo que denominamos fermentación alcohólica [29].

2.5.3 Crecimiento de las levaduras durante la fermentación alcohólica

Crecimiento y fermentación alcohólica están íntimamente relacionados, ya que durante la fermentación se da un paralelismo entre la desaparición del azúcar y la evolución de la población de levaduras en el tiempo. La pauta de crecimiento de las levaduras durante la fermentación alcohólica es similar al ciclo de crecimiento clásico de microorganismos, pero prácticamente se reduce a tres fases (figura 2.8): fase de crecimiento con multiplicación activa de las levaduras, fase estacionaria, donde se mantiene la viabilidad de las levaduras presentes pero no hay multiplicación y fase de declive, donde comienza la mortandad celular y avanza paulatinamente. Las poblaciones pasan de niveles iniciales en

torno a 10^4 ufc/mL, a poblaciones máximas de aproximadamente 10^8 ufc/mL, durante la fermentación tumultuosa [29].

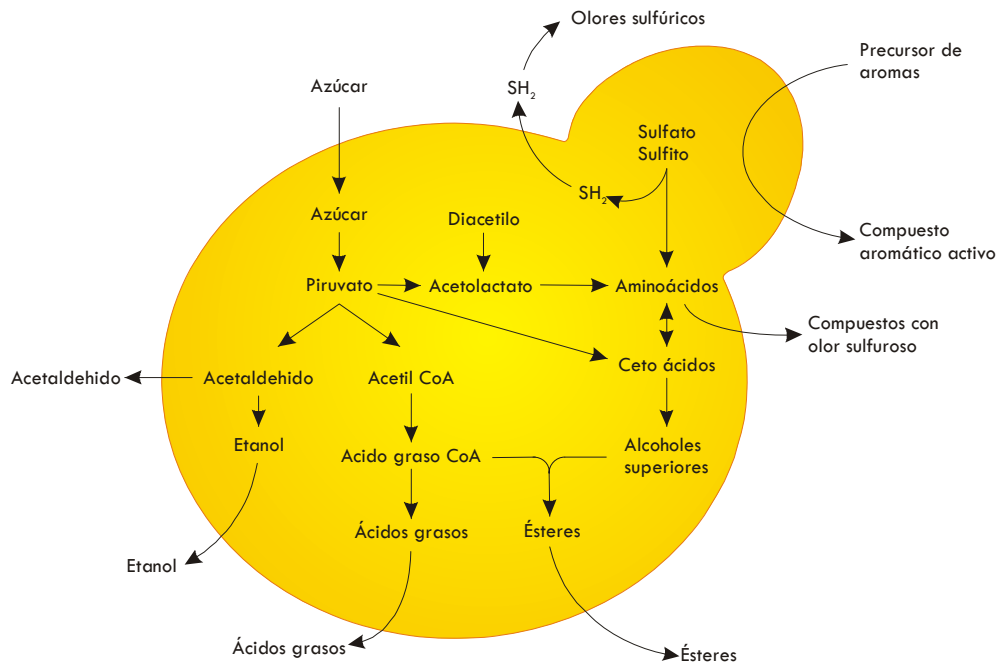


Figura 2.7: Formación de los compuestos aromáticos en las levaduras [29].

2.5.4 Factores que afectan al desarrollo de la fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica del mosto es el resultado de un conjunto de variables que pueden integrarse en tres categorías: composición del mosto, microflora asociada al proceso y tecnología de procesamiento [29].

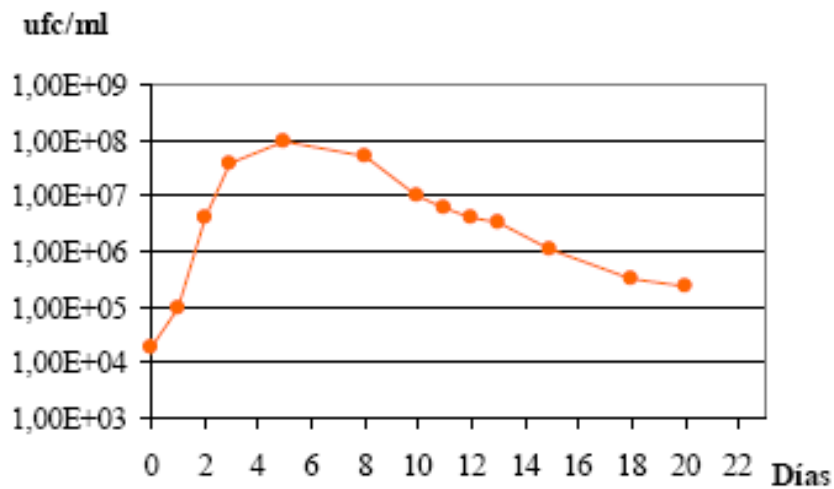


Figura 2.8: Crecimiento de las levaduras durante la fermentación alcohólica [29].

2.5.4.1 Composición del mosto

La composición química del mosto influye en el desarrollo de la fermentación alcohólica de distintas maneras:

(a) Concentración de azúcares

La concentración de azúcar va a ser la que determine fundamentalmente la duración de la fase de multiplicación celular, de la fase estacionaria y de la fase de declive. Para que las fermentaciones se desarrollen en las mejores condiciones, y así se adquiriera un grado alcohólico deseado, es conveniente que los azúcares sean degradados durante las fases de multiplicación y estacionaria, en las cuales la casi totalidad de la población es viable y muy activa, lo que suele ocurrir sin dificultad cuando la concentración de azúcares no sobrepasa los 200 g/L. Concentraciones más elevadas obligan a las levaduras a metabolizar los azúcares durante la fase de declive, con poblaciones en situación de supervivencia y una actividad metabólica reducida, lo que puede dar lugar a fermentaciones largas y en muchos casos, incompletas [29].

(b) Contenido en materia nitrogenada

Como la inmensa mayoría de los organismos vivos, las levaduras necesitan cierta cantidad de materia nitrogenada para formar sus estructuradas celulares y reproducirse. Por orden de preferencia están: el nitrógeno amoniacal (ión amonio), los aminoácidos, entre los que existe también un orden de preferencia: los polipéptidos y proteínas, que deben ser hidrolizados hasta aminoácidos consumiendo mucha energía [29].

A la suma del ión amonio y los aminoácidos, a excepción de la prolina, se le denomina nitrógeno fácilmente asimilable (NFA), y constituye la principal fuente de materia nitrogenada utilizada por las levaduras. Los péptidos y las proteínas sólo son metabolizados excepcionalmente. La desaparición del ión amonio y la mayor parte del NFA se produce rápidamente, durante los primeros días de la fermentación [29].

Este rápido agotamiento no se debe sólo a su metabolización por parte de las levaduras, sino a que además las levaduras almacenan el NFA en vacuolas para su utilización posterior, cuando las alteraciones en la membrana plasmática debidas al incremento de la concentración de etanol, impidan su captación. Las necesidades de nitrógeno fácilmente asimilable se incrementan con el aumento de la concentración de azúcares en el mosto y puede variar significativamente en función de la cepa de levadura. La deficiencia en NFA puede conducir a la disminución de la velocidad de la fermentación y paradas precoces de la misma, ya que el nitrógeno se utiliza en la biosíntesis de las proteínas que participan en el sistema de transporte de los azúcares. La falta de NFA también se relaciona con la producción de ácido sulfhídrico (SH_2) incidiendo negativamente en la composición aromática del producto final [29].

(c) Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento son sustancias requeridas en pequeñísimas cantidades y que desempeñan el papel de metabolitos esenciales, siendo indispensables para la multiplicación y la actividad celular de los microorganismos. Para las levaduras, los principales factores de crecimiento se encuentran entre las vitaminas, principalmente: biotina

(vitamina H), piridoxina (vitamina B6), ácido pantoténico, mesoinositol, nicotinamida, ácido p-aminobenzoico, riboflavina (vitamina B2 o lactoflavina) y tiamina (vitamina B1 o aneurina). Destaca la vitamina B1 o tiamina, requerida para muchas de las descarboxilaciones, siendo un factor determinante en el metabolismo de los glúcidos (paso de ácido pirúvico a etanal, formación de butanodiol-2,3). Las levaduras consumen gran cantidad de esta vitamina en la fase de multiplicación celular y su adición puede aumentar las poblaciones hasta en un 30%, mejorando el rendimiento de la transformación de azúcares, y reduciendo la producción de ácidos cetónicos que se pueden combinar con el anhídrido sulfuroso haciendo que pierda su eficacia [29].

2.6 Selección de levaduras

2.6.1 Aspectos generales

La idea de usar cultivos puros de levaduras seleccionadas comenzó con Pasteur y Hansen, aplicándose inicialmente sólo a la fabricación de cerveza. En los inicios del siglo XX, se comienza a usar cultivos puros de levaduras en la elaboración de vino en Europa y Sudáfrica distribuyéndose cultivos líquidos de levaduras en depósitos de unos 30 litros para preparar inóculos de 200 L - 300 L de mosto sin sulfitar que luego se utilizaba para inocular los grandes depósitos de fermentación [30].

En los años 60 se introducen en Estados Unidos las levaduras secas activas (LSA) con gran éxito, lo cual suponía una considerable mejora tecnológica, facilitándose enormemente el uso de levaduras así como su conservación. Al principio se utilizaron fundamentalmente dos cepas de levaduras seleccionadas de origen francés, "Montrachet" y "Pasteur Champagne", que se pretendió utilizarlas como cepas para todo tipo de propósitos, sin que realmente dieran buenos resultados. A partir de esto, los expertos se dieron cuenta de que era imposible obtener una cepa que

fuera la solución universal para cualquier tipo de fermentación por lo que empezaron a aislar cepas de distintos lugares con el fin de obtener cepas autóctonas (locales) adaptadas a determinadas características climáticas y substratos y que además pudiesen implantarse como agente biológico más importante responsable de la fermentación alcohólica aún en presencia de las levaduras silvestres que se encuentran en los mostos no estériles [30].

En la actualidad esta idea de seleccionar levaduras esta más fundamentada ya que no solamente la levadura seleccionada ofrece imposición en la fermentación si no que también es el responsable directo de las características organolépticas [30].

2.6.2 Ventajas de la utilización de levaduras seleccionadas

La utilización de levaduras seleccionadas en procesos fermentativos presenta básicamente cinco ventajas frente a fermentaciones espontáneas.

- Mayor velocidad de fermentación.
- Máximo consumo de los azúcares.
- Mayor reproducibilidad.
- Reducción de los problemas causados por levaduras extrañas silvestres contaminantes.
- Mayor flexibilidad en el control de la calidad sensorial [30].

2.6.3 Criterios de selección

2.6.3.1 Criterios de selección de levaduras para la producción de vinos

Hay diferentes criterios de selección que se pueden dividir en: favorables (tolerancia al etanol, buen rendimiento en la transformación de los azúcares en etanol, capacidad de crecer en altas concentraciones de azúcar, etc.) y desfavorables (como la

producción de H₂S o acidez volátil). No obstante, hay algunos aspectos que habitualmente se han considerado propiedades favorables como el carácter *killer* o la degradación de ácido málico y que se pueden englobar en un tercer grupo denominado neutros [31]. Tabla 2.7.

Tabla 2.7: Algunas de las características deseables y no deseables en la selección de levaduras para la producción de vinos de calidad.

Características deseables	Características no deseables
Alta tolerancia al etanol	Producción de SO ₂
Total degradación de los azúcares fermentables	Producción de H ₂ S
Resistencia al SO ₂	Producción de acidez volátil
Capacidad fermentativa a bajas temperaturas	Producción de acidez volátil
Máxima reducción de la fase de latencia	Producción de acetaldehído y piruvato
Degradación del ácido málico	Producción de espuma
Capacidad fermentativa a altas presiones	Formación de precursores del carbamato de etilo
Producción de glicerol	Producción de polifenol oxidasa
Producción de β-glucosidasa	
Fenotipo killer	

Fuente: Torija [31].

(a) Fenotipo killer

Las cepas de levadura con fenotipo killer (K⁺R⁺) producen una toxina de carácter proteico a la que ellas mismas son inmunes y que es letal para las cepas de fenotipo sensible (K⁻R⁻) quienes no producen la toxina. También existe cepas neutras (K⁻R⁺) quienes tampoco la producen pero son inmunes a ella [32].

Este fenómeno se observó en *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Candida* y *Cryptococcus* [18].

Las levaduras de fenotipo killer y con buenas características fermentativas han sido seleccionadas como iniciadores para la fermentación de diferentes productos con el objeto de prevenir la contaminación por cepas de levadura salvajes sensibles [18].

La toxina producida por las levaduras de fenotipo killer se fija sobre los receptores glucídicos de la pared celular de la cepa killer – sensible, interfiriendo en el gradiente electroquímico de la membrana citoplasmática, lo que implica la muerte celular [32].

En *S. cerevisiae* la capacidad tanto de producir la toxina como de resistir a su acción están determinadas genéticamente por partículas de tipo viral (RNA2c) existentes en el citoplasma y algunos genes nucleares. La naturaleza de esta toxina permite distinguir cinco tipos de actividad killer entre las cepas de esta especie: K1, K2, K3, KT28 y “K3”. La más importante es la K2 ya que la producción y estabilidad de esta toxina se da en valores de pH de 2.9 a 4.9, entre los que se encuentran diferentes tipos de mostos [29].

En los programas de selección de estas levaduras, el fenotipo killer de las cepas se considera un criterio imprescindible para asegurar el éxito de la inoculación. Sin embargo, trabajos recientes hacen suponer que en la concurrencia entre cepas en el medio fermentativo prevalece la mayor habilidad y eficacia en la adaptación a las condiciones de cada vinificación, independientemente del factor killer que posean las cepas llegando incluso a dominar las fermentaciones las cepas sensibles coexistiendo con cepas killer con lo que ha permitido restar cierta importancia a la influencia del factor

killer en la concurrencia entre cepas en el desarrollo de la fermentación, y a desdramatizar la utilización de levaduras killer como inóculo. La gran diversidad de factores que pueden influir en la actividad killer, sumado al hecho de que el poseer fenotipo killer no está relacionado con mejores características enológicas o mayor calidad del vino obtenido, induce a plantearse que la presencia del factor killer en cultivos seleccionados para producir vino puede ser considerada adicional, pero no es una característica indispensable para un buen pie de cuba, que debe responder inicialmente a otros criterios enológicos [29].

2.6.3.2 Criterios de selección de levaduras para la industria cervecera

En la industria cervecera se suelen utilizar los siguientes criterios de selección:

(a) Fermentación rápida: Una fermentación rápida sin crecimiento excesivo de la levadura es importante, pues el objetivo es producir una cerveza con el contenido máximo alcanzable de etanol [33].

(b) Tolerancia de cambios físicos - mecánicos: La cepa de levadura debe ser tolerante al alcohol, al choque osmótico, y a la temperatura de trabajo que se le asignara y al trabajo mecánico que se da en la separación (centrifugación) y transferencia (bombeo) a través de la planta cervecera [33].

(c) Floculación: Las propiedades de floculación de un determinado cultivo de levadura cervecera es uno de los factores más importantes a considerar durante la fermentación del mosto. La selección de una cepa para su uso en cervecería está determinada en gran parte por estas

características ya que ésta propiedad facilita la extracción de la levadura al finalizar la fermentación [33].

(d) Atenuación: La atenuación se refiere al porcentaje de los azúcares convertidos en dióxido de carbono y etanol. Alcanzar la conversión eficiente de azúcares al etanol (buena atenuación) requiere que la levadura sea capaz de utilizar totalmente la maltosa y la maltotriosa o también llamada maltotetraosa (producto que la enzima sintetiza en maltooligosacáridos). El grado de atenuación obtenible ejerce una gran influencia en las características organolépticas de la cerveza resultante y, por lo tanto, es uno de los factores determinantes en el proceso de la selección de la levadura [33].

(e) Componente del Sabor: No solamente el agua, la malta, el lúpulo, le dan el sabor a la cerveza, también le dan sabor, los subproductos de la levadura en la fermentación y en la maduración [33]. Los más notables de estos subproductos son por supuesto el bióxido de carbono y el etanol. Pero además, una gran cantidad de otros compuestos de sabor también se producen como los enunciados a continuación:

(e.1) Esteres: Los esteres se consideran los compuestos aromáticos más importantes de la cerveza. Hacen que se forme la familia más grande de compuestos aromáticos de la cerveza y en general imparten una característica típica "afrutada" o "con sabor a fruta" a la cerveza. La mayoría de los esteres se forman durante la fermentación primaria, y una cierta formación del esteres se producen durante la maduración [33].

(e.2) Diacetilo: El diacetilo contribuye a dar una lubricidad en la boca, llamada "slipperiness" que se puede traducir, como una buena sensación que da la cerveza o el vino en la boca. Un sabor "mantecoso" o de "caramelo" indica generalmente la presencia de una gran concentración de diacetilo [33].

(e.3) Ácidos Grasos: Los ácidos grasos son los componentes de menor importancia del mosto y aumentan su concentración durante la fermentación y la maduración. Dan lugar a sabores jabonosos, o grasos y a sabores "goaty`s" este es un olor y sabor que se caracteriza como al de "queso de cabra", los mismos se le reconocen como características comunes del sabor en las cervezas ALE´s y LAGER´s. Pero son más frecuentes en las cervezas LAGER´s debido a la tendencia de algunas cepas de levadura de las cervezas LAGER´s a producir mayores cantidades de ácidos grasos que las cepas de levadura de las cervezas ALE´s [33].

(f) Alcoholes Superiores: Contribuyen directamente al sabor de la cerveza pero son también importantes debido a su implicación en la formación de los ésteres. Los alcoholes superiores tienen sabores fuertes, produciendo un sabor "alcohólico" y un aroma "como a solvente". Su sabor deja un efecto, como "de que se calienta en el paladar". Cerca de un 80% de los alcoholes superiores se forman durante la fermentación primaria [33].

(g) Compuestos de Nitrógeno La levadura también excreta algunos compuestos del nitrógeno durante la fermentación y maduración como los aminoácidos y péptidos, que contribuyen al redondeo del gusto, con un aumento de

plenitud en el paladar. El retiro de la levadura demasiado pronto del fermentador, puede por lo tanto producir cervezas que sean vacías de gusto, o secas al paladar, incluso esto sucede cuando son guardadas posteriormente durante mucho tiempo. El principio de "autólisis" se puede detectar por un aumento excesivo en el contenido de aminoácidos. Así como en las cervezas industriales, el exceso de maduración es perjudicial para el sabor, lo mismo lo es para las cervezas artesanales, por eso la cerveza de mejor sabor, es la cerveza joven, al contrario del vino que necesita de la maduración de sus sabores, y del envejecimiento del mismo [33].

(h) Estabilidad genética: Esto tiene que ver con la capacidad de la cepa para mantener sus aptitudes fermentativas por la que fue seleccionada [33].

2.7 Identificación molecular de levaduras

2.7.1 Aspectos generales

De forma convencional, la identificación de levaduras se ha basado en criterios morfológicos y fisiológicos [34]. En las pruebas morfológicas se estudia la morfología del estado asexual y sexual, presencia de homo y heterotalismo, entre otras características que solo permiten la identificación hasta el nivel de género. En las pruebas fisiológicas se estudian principalmente la fermentación y asimilación de fuentes de carbono, asimilación de compuestos nitrogenados, requerimientos vitamínicos, resistencia a cicloheximida y termotolerancia, características que no siempre son estables ni reproducibles, debido a que las fuentes de carbono y nitrógeno pueden metabolizarse por rutas comunes y en ocasiones su metabolismo es controlado por varios genes, además todas estas pruebas resultan largas y tediosas de modo que su uso rutinario es inapropiado [35].

Actualmente, los métodos moleculares basados en el polimorfismo de los ácidos nucleicos constituyen la mejor alternativa a los métodos tradicionales, ya que al no depender del estado fisiológico de la célula, son más reproducibles. Además, poseen otras ventajas como la elevada precisión y discriminación, así como rapidez y sencillez en la realización de la técnica, permitiendo incluso la identificación hasta el nivel cepa [34].

2.7.2 Métodos moleculares para la identificación de levaduras a nivel de especie.

2.7.2.1 Métodos basados en el análisis de regiones ribosómicas.

Como todos los eucariotas, las levaduras tienen un subcompartimiento en el núcleo dedicado a la síntesis y ensamblaje de los ribosomas, que son la maquinaria transcripcional de la célula. Estos ribosomas están compuestos de RNA y proteínas. Su tamaño se mide por unidades S (svedberg), que corresponde a medidas de sedimentación de las partículas en una centrífuga. [36]

Los eucariotas producen ribosomas de 80 S los que están compuestos por dos subunidades de 40 S y 60 S. La subunidad de 40 S está formada por 23 proteínas y un RNA ribosómico de 18 S (18 S rRNA). La subunidad de 60S consiste de 49 proteínas y 3 tipos de moléculas de rRNA: 5 S, 5,8 S y 28 S (5 S rRNA, 5,8 S rRNA y 28 S rRNA) [36]. Ver figura 2.9.

La secuencia de DNA donde se ubican los genes que codifican por los rRNA's se denominan como rDNA. Este rDNA está organizado como una unidad que se repite una tras otra (en tándem), formando unidades de transcripción que se repiten en el genoma entre 50 y 200 veces. Cada unidad incluye tres genes de rRNA: el gen que codifica para el 18 S, el gen para 5,8S rRNA y el gen para 28 S rRNA [36]. Ver figura 2.10.

En cada unidad de transcripción existen dos regiones, las secuencias internas transcritas, espaciadores internos (ITS) y los espaciadores externos (ETS), que se transcriben pero son procesadas juntos a los genes rRNA y no forman parte de la molécula de rRNA final. A su vez, las unidades codificantes están separadas por los espaciadores intergénicos (Intergenic spacer, IGS también llamados NTS). El gen 5 S rRNA puede o no estar incluido en la unidad de transcripción previamente descrita pero aparece adyacente en la misma unidad (figura 2.11) de repetición en el caso de las levaduras [34].

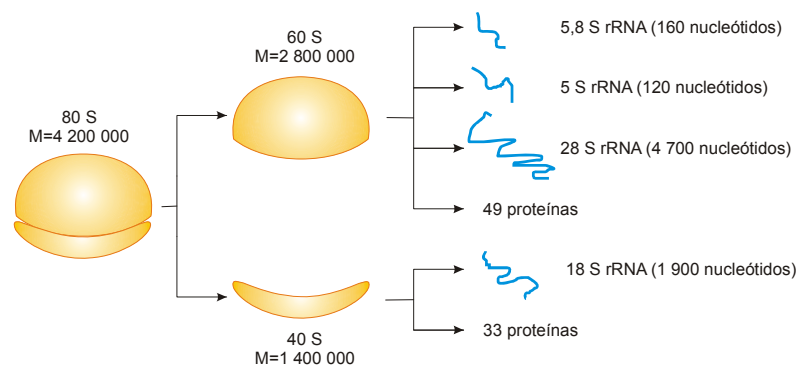


Figura 2.9: Conformación de los ribosomas [36].

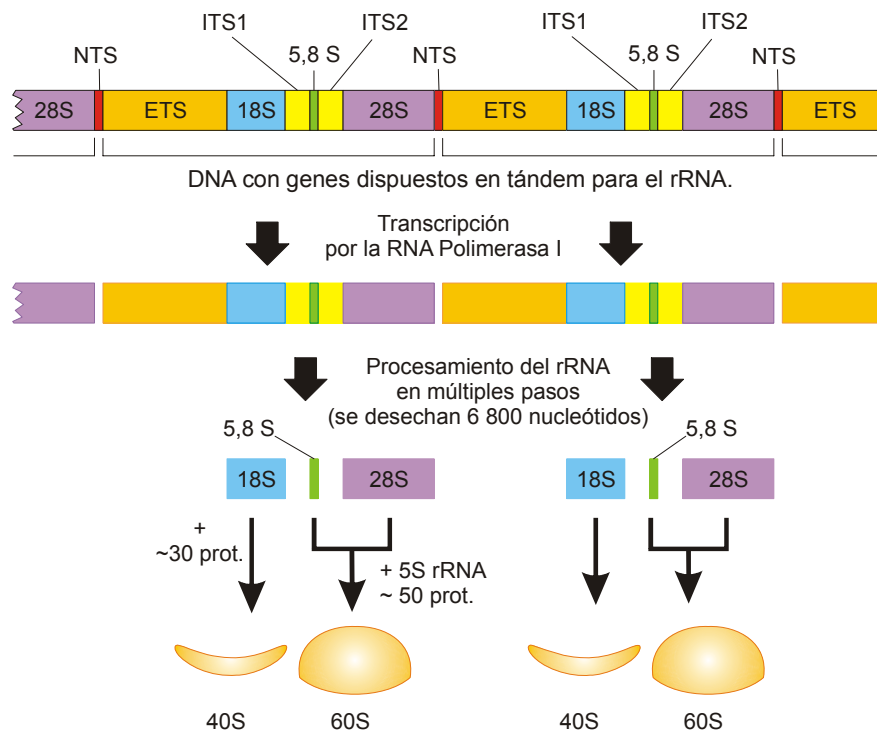


Figura 2.10: Transcripción y procesamiento de los RNA ribosómicos principales en los eucariotes [37].

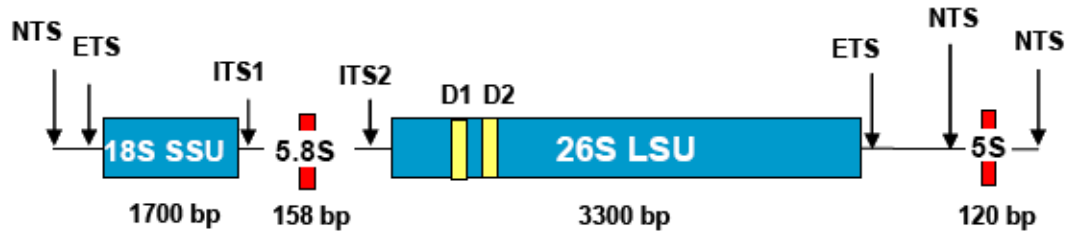


Figura 2.11: Esquema de la organización de los genes ribosomales [34].

Los genes ribosómicos 5,8 S; 18 S; y 26 S se encuentran extraordinariamente conservados entre especies e incluso entre géneros, familias y órdenes diferentes, lo contrario a esto lo presentan los espaciadores ITS y NTS que son zonas muy poco conservadas. Ambos casos constituyen poderosas herramientas para el establecimiento de las relaciones filogenéticas y la identificación de especies por contener secuencias conservadas, así como una evolución concertada [34,36].

Usando la información de estas regiones descritas anteriormente se han desarrollado distintos métodos para la identificación de especies de levaduras como veremos a continuación.

(a) Secuenciación de regiones ribosómicas.

Se basa en la determinación y comparación de secuencias nucleóticas principalmente de ciertas regiones de los genes ribosómicos. Las dos regiones más utilizadas son las correspondientes a los dominios D1 y D2 situados en el extremo 5' del gen 26 S y el gen 18 S (figura 2.11). La disponibilidad de las secuencias en bases de datos, sobre todo en el caso de la región D1/D2 del gen 26 S, hacen que esta técnica sea muy útil para asignar una levadura desconocida a una especie concreta cuando el porcentaje de homología de sus secuencias es superior o igual a 99% [34].

(b) Análisis de restricción de regiones ribosómicas (PCR-RFLP del rDNA)

Esta técnica se caracteriza por su fácil manipulación y su reproducibilidad basado en la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de las regiones del rDNA y posterior restricción de los amplificados que se visualizan en geles de agarosa al 1,4%, existiendo tamaños de amplificado específicos de especie que nos van a permitir la identificación y diferenciación de las mismas. Aunque lo habitual es usar DNA como molde en la reacción de amplificación, en numerosos trabajos se ha utilizado como molde una pequeña cantidad de colonia aislada, acortando el proceso. Cuando los amplificados son del mismo tamaño no siempre corresponden a la misma especie y es necesario recurrir a la digestión de estos fragmentos para llegar a la definitiva identificación [34].

La región ribosómica muy útil para diferenciar a nivel de especie es la que incluye el gen 5,8 S y las regiones intergénicas adyacentes ITS1 e ITS2 que se amplifica mediante los cebadores ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') descritos por White *et al* [38].

También se ha usado el análisis de restricción de otras regiones ribosómicas para la identificación de especies de levaduras. Es el caso de la región denominada NTS, el gen 18 S junto al NTS adyacente y distintos dominios del gen 26 S. Sin embargo, la no disponibilidad de una base de datos para estas regiones, hace que no se puedan usar de forma generalizada para la identificación de levaduras [34].

2.7.3. Métodos moleculares para la diferenciación a nivel de cepa

La caracterización a nivel de cepa es necesaria para poder patentar levaduras de interés industrial, para el seguimiento de las levaduras en procesos industriales, así como para determinar el origen de contaminación en alimentos alterados [34]. A continuación se mencionan algunas de estas técnicas.

2.7.3.1 Análisis de restricción del DNA mitocondrial (RFLP – mtDNA)

La mitocondria la fábrica energética de los eucariotas contiene como un relicto de su origen procariota una molécula de DNA circular, que en la levadura tiene unos 75 kb [39].

Esta molécula presenta gran variabilidad de secuencias cuyo análisis de polimorfismos mediante restricción del DNA mitocondrial (mtDNA), ha sido ampliamente utilizado como método de caracterización de cepas estrechamente relacionadas de origen vínico y cervecero (*S. cerevisiae*). Se han desarrollado varios métodos para el aislamiento del mtDNA de levadura. Sin embargo, Querol [40] desarrollaron un método de análisis del mtDNA que evita la utilización de gradientes en cloruro de cesio y el uso de una ultracentrífuga, factor limitante para su utilización en la industria. La simplificación de la técnica se basa en el hecho de que los enzimas del tipo GCAT utilizados para digerir el DNA total, no reconocen las secuencias ricas en GC ni ricas en AT del mtDNA. Por tanto, dado el bajo número de puntos de corte en el mtDNA, este da lugar a fragmentos de mayor tamaño que se puede visualizar claramente como bandas definidas, por encima de los fragmentos degradados del DNA nuclear. No todos los enzimas revelan el mismo grado de polimorfismo y es muy dependiente de la especie. En el caso concreto de *S. cerevisiae* los enzimas más apropiados para diferenciar a nivel de cepa son *HinfI* y *HaeIII* [41].

La utilización del análisis de restricción no queda restringida a *Saccharomyces*, ya que ha sido aplicada con gran éxito a otras especies de levaduras: *C. zeylanoides* y *D. hansenii*, *Dekkera/Brettanomyces*, *Kluyveromyces* y *Zygosaccharomyces*. Esta técnica rápida permite el análisis de un mayor número de cepas en menos tiempo, y resulta ideal para la utilización en la industria por su rapidez, seguridad y economía y por no requerir material sofisticado, ni personal muy especializado [34].

2.7.3.2 Métodos basados en la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las técnicas moleculares más rápidas son las basadas en la técnica de PCR y han sido utilizadas para discriminar cepas dentro de una especie de levadura. El desarrollo de algunas variantes en la técnica de PCR básica, puede ser aprovechado para detectar polimorfismos de fragmentos de DNA sin necesidad de utilizar enzimas de restricción. Las técnicas más utilizadas para la diferenciación de levaduras a nivel de cepa son RAPD y microsatélites. Otras técnicas, como la amplificación de secuencias δ , han sido desarrolladas específicamente para la diferenciación de cepas vínicas de la especie *S. cerevisiae* [34].

(a) RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

La técnica de RAPD se caracteriza porque utiliza un único cebador el cual presenta como características especiales una corta longitud (aproximadamente de 10 nucleótidos) y una secuencia arbitraria. La reacción de RAPDs- PCR también se caracteriza por la baja temperatura de hibridación utilizada (37°C). La corta y arbitraria secuencia del oligonucleótido, junto con la baja temperatura empleada, determinan el apareamiento entre oligonucleótido y el DNA, iniciándose la amplificación de diversos fragmentos de DNA

distribuidos a lo largo de todo el genoma. El resultado es un patrón de productos amplificados de diferente peso molecular, que puede ser característico de la especie o bien de las diferentes cepas o aislados de una misma especie [34].

La principal ventaja del método es que no se necesita información previa sobre la secuencia para el diseño del cebador. Además, la técnica permite analizar la variabilidad a lo largo de todo el genoma revelando más polimorfismo que otras técnicas que analizan zonas concretas. Sin embargo, debido a la baja temperatura de hibridación utilizada (37°C) los perfiles de amplificación obtenidos son poco reproducibles siendo necesario llevar a cabo varias repeticiones para cada muestra partiendo de distintas extracciones de DNA. Sólo se tendrán en cuenta las bandas presentes en todas las repeticiones, por lo que es recomendable combinar los resultados de la amplificación con varios oligonucleótidos para conseguir un buen poder de resolución [34].

(b) PCR de zonas repetitivas del genoma (microsatélites y minisatélites).

Existen zonas repetidas en el genoma que representan dianas potenciales para la identificación molecular a nivel de cepa por mostrar mucha variabilidad. Estas zonas son los microsatélites y los minisatélites, de longitud muy variable que se repiten en tándem y al azar a lo largo del genoma. Los microsatélites tienen una longitud normalmente inferior a 10 pb mientras que los minisatélites tienen una longitud entre 10 y 100 pb. Los productos de amplificación generados presentan tamaños comprendidos entre 700 y 3500 pb aproximadamente, por lo que se pueden visualizar en geles de agarosa [34].

La variabilidad presentada por estas zonas puede determinarse mediante amplificación por PCR usando oligonucleótidos específicos como (GTG)₅, (GAG)₅, (GACA)₄ o M13 logrando la caracterización a nivel de cepa [34].

(c) AFLP (Polimorfismo de la longitud de de los fragmentos amplificados)

AFLP es una técnica basada en la amplificación selectiva por PCR de fragmentos de restricción de una digestión total de DNA. La digestión se realiza con dos enzimas de restricción, una de corte muy frecuente, y otra de corte poco frecuente. A los fragmentos se les ligan oligonucleótidos de extremos compatibles con las enzimas usadas para su posterior amplificación [34, 42].

Los fragmentos son separados en geles de acrilamida visualizados por auto-radiografía o en equipos de secuenciación automáticos [34].

Al igual que en el caso de RAPDs, no se necesita información previa sobre la secuencia para el diseño del cebador, es muy reproducible y aporta muchos marcadores moleculares en una sola reacción [34, 42].

AFLP es una técnica útil para discriminar levaduras a nivel de cepa; sin embargo presenta el inconveniente de ser una técnica muy laboriosa, ya que requiere secuenciadores automáticos y material muy sofisticado, y difícil interpretación de los datos. Aunque la técnica ha sido muy utilizada para el estudio de bacterias, plantas y animales, en el caso de las levaduras son pocos los trabajos al respecto [34].

III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de Ejecución

3.1.1 Universidad Nacional del Centro del Perú

- Laboratorio del Instituto de Biotecnología.
- Laboratorio de Análisis Instrumental y Microbiología de Alimentos de la Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias.

3.1.2 Universidad Nacional Mayor de San Marcos

- Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas.

3.1.3 Universidad Peruana Cayetano Heredia

- Laboratorio de Enfermedades Infecciosas, Dermatológicas y Tropicales.

3.2 Materiales

3.2.1 Cepas de levadura

(a) Cepas silvestres

Saccharomyces cerevisiae aislados de 15 productores de chicha de jora del Valle del Mantaro.

(b) Cepas patrón

Las cepas patrón fueron adquiridas del Instituto de Biotecnología de la UNCP.

- *Saccharomyces cerevisiae* IBIG-15
- *Candida tropicalis* IBIG-16 (K⁺R⁺)
- *Saccharomyces cerevisiae* IBIG-17 (K⁻R⁻)

3.2.2 Medios de cultivo

(a) YPD (Yeast Extract Peptona Dextrosa)

Composición

Extracto de levadura	10 g
Peptona	20 g
Glucosa	20 g
Cloranfenicol	0,2 g
Agua destilada	1000 mL

Para la preparación del medio sólido se agrega agar a una proporción de 20 g/L. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

(b) Agar mosto de jora

Composición

Mosto de jora	1000 mL
Agar	20 g
Cloranfenicol	0,2 g

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min. La preparación del mosto de jora se indica en la sección 3.2.3

(c) YPD tamponado a pH 4,2

Medio para la determinación del fenotipo killer.

Composición

Extracto de levadura	10 g
Peptona	20 g
Glucosa	20 g
Agar	20 g
Cloranfenicol	0,2 g
Solución tampón pH 4,2 *	1000 mL

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

* *Solución tampón (pH 4,2) para 100 mL*

Ácido cítrico (0,1M)	58,60 mL
Fosfato bisódico (0,2M)	41,40 mL

3.2.3 Mosto de jora

Este mosto se uso para evaluar a las cepas aisladas y también para preparar el medio agar mosto de jora. Su preparación fue con agua, jora y malta en una proporción de 20:3:1 respectivamente de donde se produjo un mosto dulce por decocción empleando cuatro temperaturas diferentes:

- *Proteólisis: 40 – 54°C x 2 horas*
- *Sacarificación: 54 – 65°C x 2 horas*
- *Ebullición: 85°C x 3 horas*
- *Separación del mosto del bagazo: 73°C*

3.2.4 Técnicas moleculares

3.2.4.1 Aislamiento de DNA genómico de levaduras

Para el aislamiento del DNA genómico de levaduras se utilizó el Kit *Axy Prep y Multisource genomic Miniprep Kit AP-MN-MS-GDNA-50* de la empresa Axygen distribuida por la empresa Gen Lab del Perú SAC.

3.2.4.2 Amplificación de las Secuencias Internas Transcritas (ITS) del DNA ribosomal (rDNA) mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

(a) Oligonucleótidos (primers, cebadores o iniciadores)

Para la amplificación de la región ITS, se empleó los oligonucleótidos ITS1 – ITS4 que se mandaron a sintetizar a la empresa *Integrated DNA Technologies, INC (IDT)*. La secuencia de estos oligonucleótidos se muestra en la tabla 3.1.

Tabla 3.1: Primers utilizados para la amplificación de la región ITS del rDNA.

Primer	Sentido	Secuencia	Referencia
ITS 1	Forward	5' – TCC GTA GGT GAA CCT GCG G -3'	White <i>et al</i> [38]
ITS 4	Reverse	5' – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC – 3'	White <i>et al</i> [38]

(b) DNA polimerasa: Esta enzima fue de la empresa Promega que lo comercializa con el nombre de *Go taq DNA polimerasa catalog # M8305* y fue adquirida de la distribuidora *Biomol Perú SAC*.

(c) RNAsa: Esta enzima se incluye en el kit de extracción de DNA.

3.2.4.3 Análisis de los perfiles de restricción (RFLP) del rDNA

Para el análisis de los perfiles de restricción (RFLP) del DNA ribosomal, específicamente la región amplificada ITS (ITS-1 + 5,8S + ITS-2) se hicieron uso de 3 enzimas de restricción que se mencionan a continuación:

- **Hinf I** (10 u/μL): de la empresa Promega adquirido de la empresa Biomol Perú SAC.
- **Hha I** (Cfo I) (10 u/μL): de la empresa Fermentas adquirido de la empresa GenLab del Perú SAC.
- **Hae III** (BsuRI) (10 u/μL): de la empresa Fermentas adquirido de la empresa GenLab del Perú SAC.

3.2.4.4 Visualización de bandas

(a) **Agarosa Ultra Pure:** de la empresa Invitrogen distribuida por la empresa Belomed SAC.

(b) **Marcadores de peso molecular:** Los marcadores de peso molecular que se utilizaron fueron los siguientes:

- **GeneRuler 100 bp DNA Ladder:** de la empresa Fermentas catalog # SMO241 (0,5 μg/μL), adquirido de la empresa GenLab del Perú.
- **Lambda DNA/Hind III Markers:** de la empresa Promega catalog # G1711 (0,5 μg/μL), adquirido de la empresa Biomol Perú SAC.

(c) **Buffer de carga:** 0,5% SDS, 25% glicerol, EDTA.Na₂ 12mM, 0,05% Azul de Bromofenol.

3.2.5 Reactivos y equipos de laboratorio

3.2.5.1 Reactivos

En la tabla 3.2 aparecen los reactivos empleados para los análisis químicos del presente trabajo.

3.2.5.2 Equipos

- Shaker: *JP Selecta cod. 3000435*
- Esterilizador de convección natural: *JP Selecta Digitheat cod. 2001245*
- Incubadora: *JP Selecta Hot-Cold-S cod 400667*
- Autocable de esterilización: *JP Selecta Presoclave cod. 4001135*
- Balanza analítica: *ADA 210/L*
- Microscopio: *Laboval 4 cod. T250*
- Espectrofotómetro: *Genesys mod. 336001*
- Microcentrifuga: *Mikro20-Hettich Zentrifugen*
- Refrigeradora vertical: *Lab Line Instrument Coollab serie: 1199-006*
- Cámara de electroforesis horizontal: *mini MGV-2002T*
- Termociclador: *Minicycler MJ Research*
- Cámara de flujo laminar: *Enviralaf cod. PN31370*
- Congelador: *JP Selecta A2 cod. 2101182*
- Micropipetas: *Wheaton*
- Transiluminador: *Single intensity mod. TL-33E*
- pH metro: *Oakton economy serie: 56217*
- Baño maría: *JP selecta cod. 6001173*

Tabla 3.2: Reactivos utilizados en el trabajo.

Compuesto	Marca	Pureza
Ácido sulfúrico	Merck	97%
Ácido clorhídrico	Merck	37%
Glucosa	Merck	-
Peptona de carne	Merck	-
Agar	Difco	-
Hidróxido de sodio	BioChemica ultra	99%
Agarosa	Invitrogen	Ultra Pure
EDTA.Na ₂	Promega	Grado biología molecular
TRIS	Promega	Grado biología molecular
Cloranfenicol	BioChemica	98%
Ácido cítrico	Sigma	99,5%
Fosfato bisódico	BioChemica	99%
Nitrógeno líquido	Praxair	-
3,5 Ácido dinitrosalicílico	Sigma	-
Fenol	BioChemical	-
Bisulfito de sodio	Biochemica ultra	99%
Isopropanol	Applichem	Grado biología molecular
Butanol	Applichem	99%
Etanol	Applichem	Grado biología molecular
Azul de metileno	Sigma	82%
Ácido bórico	Sigma	99%
Rojo de metilo	Sigma	-
Cloruro de sodio	Sigma	99,5%
Tartrato de sodio y potasio	UBK	-
Almidón	-	-
Acetato de sodio	-	-
Bromuro de etidio	BioChemica	Grado biología molecular
Glicerol	BioChemica	Grado biología molecular
SDS	Promega	Grado biología molecular
Azul de bromofenol	BioChemica	Grado biología molecular

3.3. Métodos

El proceso general para la selección de levaduras en el presente trabajo de investigación se muestra en la figura 3.1.

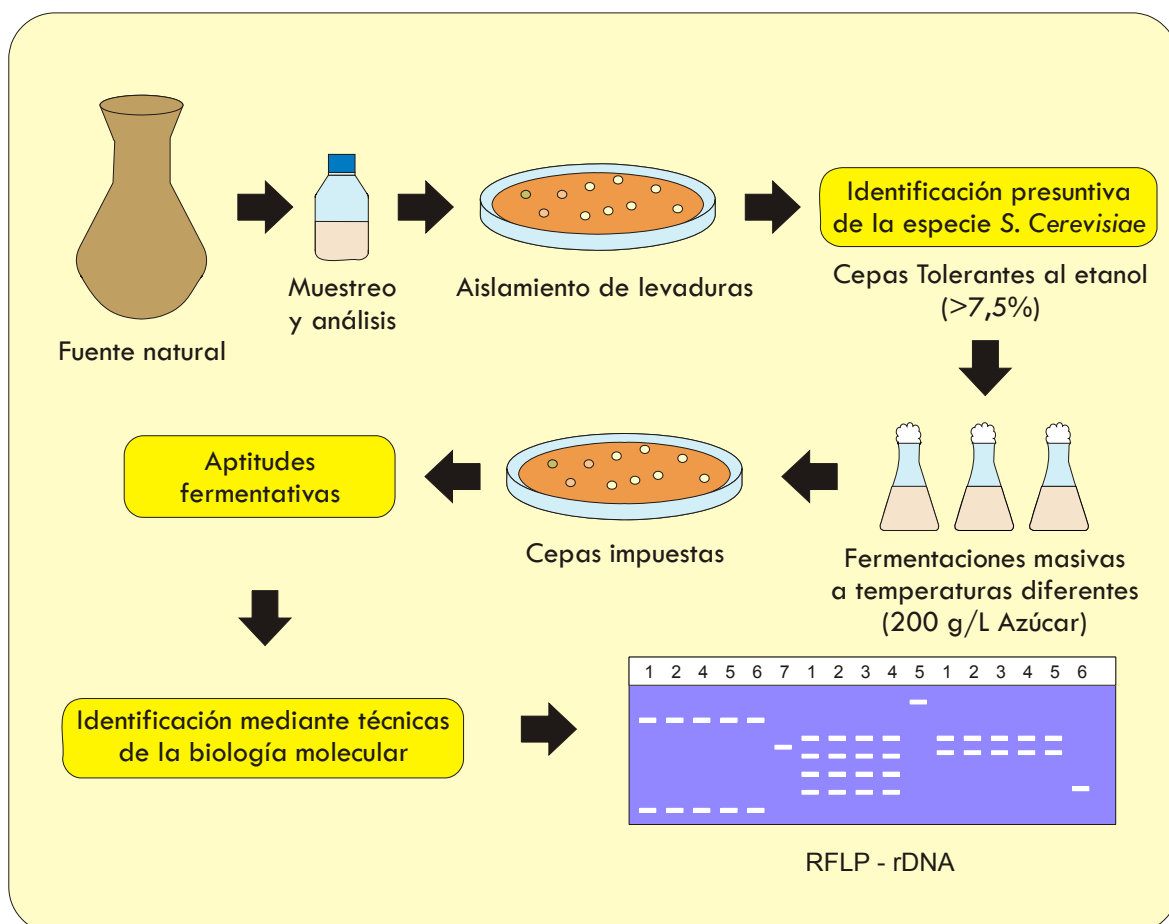


Figura 3.1: Esquema general del proceso de selección de levaduras *S. cerevisiae* aisladas de chicha de jora del Valle del Mantaro.

3.3.1 Muestreo

Para obtener las muestras de chicha de Jora que se elabora en el Valle del Mantaro se realizó un muestreo **estratificado** en todo el Valle en la que se consideró como estrato homogéneo a la población con continuidad y antigüedad mayor a dos años en la producción de esta bebida. Se tomó al 100% de la población que cumplía estas características ya que el objetivo es encontrar a las mejores cepas presentes en la chicha de jora.

3.3.2 Análisis fisicoquímicos

3.3.2.1 Análisis fisicoquímicos de las muestras de chicha de Jora

Para los Análisis fisicoquímicos de las muestras de chicha de jora recolectadas en el proceso de muestreo se emplearon los siguientes métodos:

- pH: Método potenciométrico NTP 203.010.2003
- Acidez total: NTP 211.027.2003
- Acidez fija: NTP 211.027.2003
- Acidez volátil: NTP 211.027.2003

3.3.2.2 Análisis químico proximal de la jora y malta

Para determinar las aptitudes fermentativas de las cepas aisladas y además para elaborar el medio agar mosto de jora, se utilizaron jora y malta donde esta última fue de elaboración propia.

- Humedad: Método A.O.A.C.(1998)
- Proteína total: Método A.O.A.C.(1998)
- Fibra cruda: Método A.O.A.C.(1998)
- Cenizas: Método A.O.A.C. (1998)
- Grasa: Método A.O.A.C. (1998)
- Carbohidratos: Por diferencia, luego de haber determinado el porcentaje de humedad, fibra cruda, proteína total, grasa y ceniza.

3.3.2.3 Análisis de la calidad maltera

- Azúcares reductores: Método Miller -1 958.
- Poder diastásico: Método ASBC (American Society of Brewing Chemist) - 1 957.

3.3.3 Aislamiento de levaduras

Para el aislamiento de las levaduras se utilizó el método de recuento en placa [43], para lo cual se preparó diluciones de 10^{-1} a 10^{-7} en tubos con solución salina peptonada, sembrando 100 μ L de las tres últimas diluciones por la técnica de extensión en placas con agar YPD y agar mosto de jora. Se incubaron las placas en posición invertida a 25°C durante 3 a 5 días en condiciones aerobias.

De las placas que contenían aproximadamente 50 colonias se eligieron al azar 10 colonias (5 colonias de las placas con agar YPD y 5 colonias de las placas con agar mosto de jora) que presentaban características similares al de la especie *S. cerevisiae* (cremas, lisas, brillantes y/o opacas [3]). Estas colonias elegidas fueron transferidas a viales con agar YPD inclinado y se dejaron crecer por 24 h a 25°C para luego ser conservados a 4°C hasta ser utilizadas en las posteriores pruebas. El esquema general de aislamiento de levaduras se muestra en la figura 3.2.

3.3.4 Identificación presuntiva de la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

Para la identificación presuntiva de la especie *S. cerevisiae* se consideró una de sus características más resaltantes, que es la tolerancia al etanol [22, 44]; de modo que las cepas con tolerancia por encima de 7,5% v/v etanol, se consideraban posibles cepas de esta especie.

Para determinar la tolerancia al etanol (>7,5% v/v) de las cepas aisladas, se procedió en primer lugar a reactivar las células aisladas inicialmente en 10 mL de caldo YPD a 25°C por 24 h. Seguidamente se inoculó 100 μ L de cada cepa reactivada en dos tubos con tapa hermética, una conteniendo 10 mL de caldo YPD con 7,5% v/v etanol y la otra caldo YPD con 0% v/v etanol (testigo) y se dejaron incubar a 25°C por 10 días.

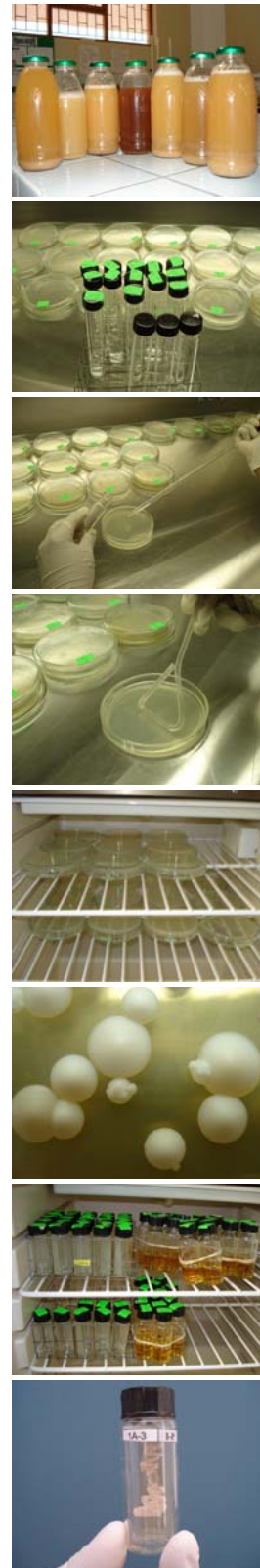
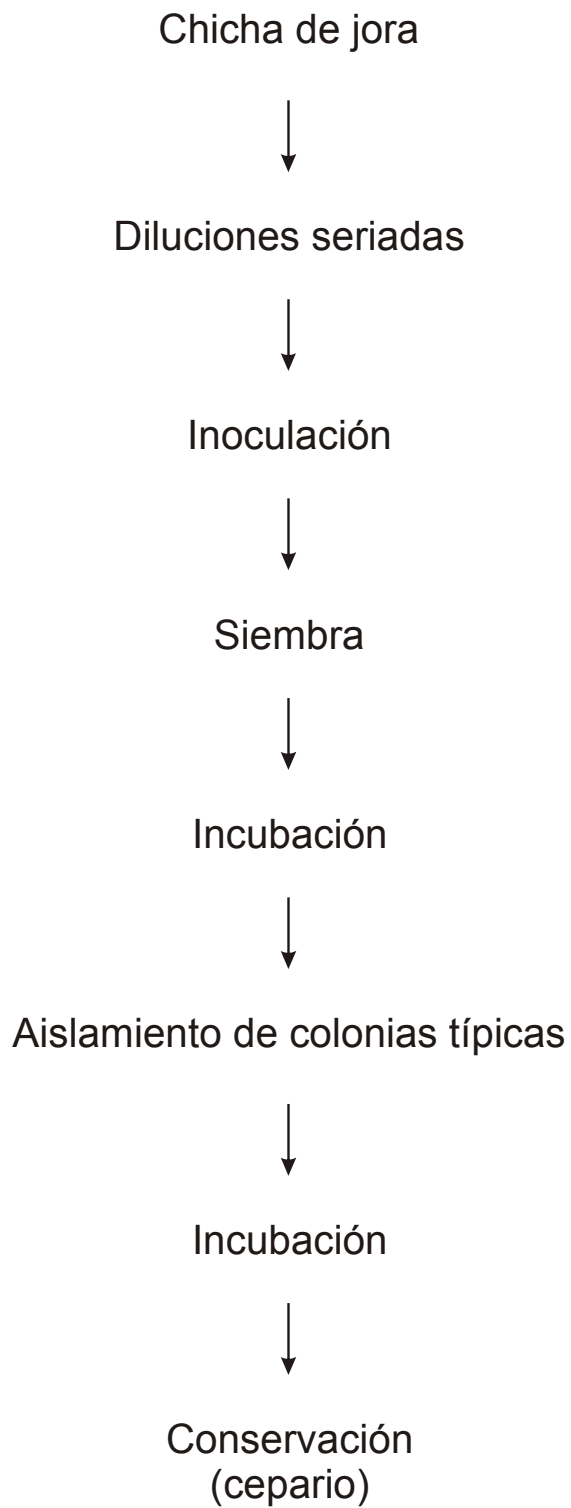


Figura 3.2: Diagrama de flujo del aislamiento de levaduras de chichas de jora

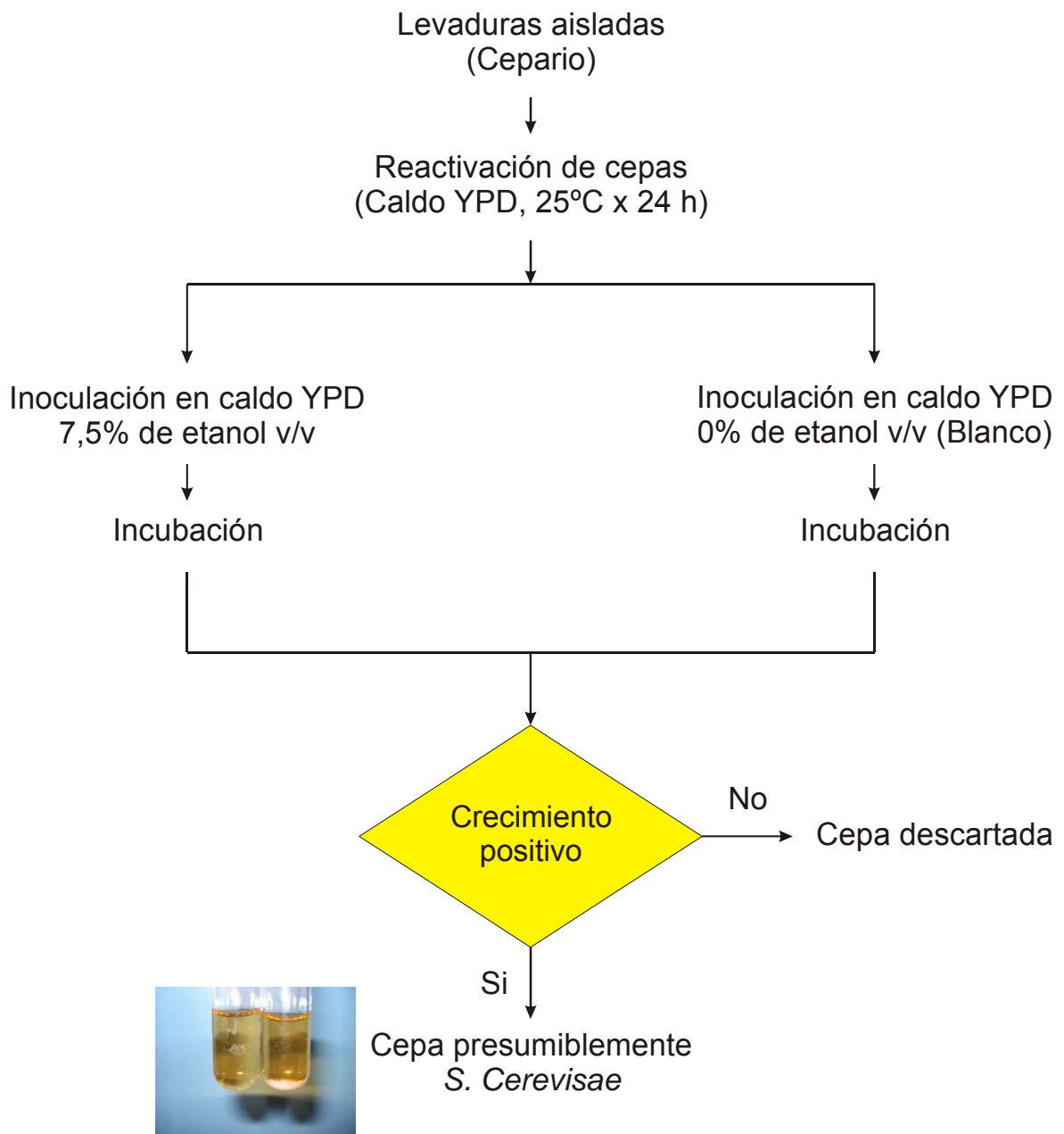


Figura 3.3: Identificación presuntiva de la especie *S. cerevisiae*

Se consideraron posiblemente cepas pertenecientes a la especie *S. cerevisiae*, aquellos que se desarrollaron completamente en el caldo YPD con 7,5% v/v etanol previa comparación con su testigo. (Figura 3.3)

Se consideró una tolerancia al etanol por encima de 7,5% v/v, ya que el propósito del trabajo no es seleccionar cepas exclusivas para llevar a cabo la fermentación de la chicha de jora, sino que se pretende aplicarlas en la elaboración de diferentes productos alimenticios y bebidas alcohólicas obtenidas por fermentación, por ejemplo, pan, vino, cerveza, etc.

3.3.5 Pre selección de levaduras mediante fermentaciones masivas

Esta prueba tiene por objeto acelerar el proceso de selección dado al elevado número de cepas que se obtuvieron en las pruebas de tolerancia al etanol; ya que evaluar individualmente a cada cepa en sus aptitudes fermentativas resulta arduo y costoso. Para tal fin esta prueba se la dividió en dos fases; la primera consistió exclusivamente en determinar a las cepas que se imponían en las fermentaciones masivas, mientras que la segunda fase consistió en descartar cepas y detectar posibles clones entre las cepas impuestas en las fermentaciones masivas. Ver figura 3.4.

En la primera fase se utilizó el método que propone Torija [31] que consiste en elegir un número no mayor a 20 cepas *Saccharomyces*, las que se inoculan en un mismo mosto concentrado en azúcares a fin de crear condiciones muy restrictivas en la fermentación produciéndose una competencia entre estas cepas por prevalecer y quedando solo aquellas cepas que tienen la capacidad de imponerse en fermentaciones masivas, desplazando a las menos representativas. Para tal fin es necesario que la población inicial de todas las cepas sean las mismas, para que todas tengan

las mismas posibilidades de imposición. Es así que en primer lugar se procedió a esterilizar mosto de jora con 200 g/L de azúcar a 115°C por 10 min. Este mosto estéril fue vertido en 3 matraces Erlenmeyer a una capacidad de 400 mL. Estos matraces se codificaron como 1A, 2B y 3C en las que se inocularon un número definido de cepas (<20) tolerantes al etanol por encima del 7,5% las que fueron escogidas adecuadamente para evitar la repetición de las cepas provenientes de una misma zona.

Para obtener una población inicial igual en todas las cepas y así tengan las mismas posibilidades de imposición se procedió a preparar una curva estándar, absorbancia versus número de células para lo cual se utilizó la cepa patrón *S. cerevisiae* IBIG 15. De esta curva se calculó cuanto de inóculo se debía adicionar a los matraces según la absorbancia que presentaba el caldo YPD de las levaduras reactivadas.

La fermentación se realizó a 30°C durante 15 días, momento en que se procedió a aislar las cepas que prevalecieron en la fermentación de cada Erlenmeyer por el método de recuento en placa. Estas cepas aisladas se conservaron a 4°C en viales en agar YPD en plano inclinado.

En la segunda fase para detectar posibles clones, se realizó fermentaciones individuales con las cepas aisladas de las fermentaciones masivas. Estas fermentaciones se realizaron por duplicado en matraces de 500 mL con mosto de jora estéril a una concentración de azúcar de 200 g/L sin agitación y a una temperatura ambiente. Las cepas aisladas de las fermentaciones masivas se reactivaron en 20 mL de caldo YPD por 24 horas, en cuyo tiempo se determinó su absorbancia a una longitud de onda de 600 nm para inocular poblaciones iguales de 1×10^7 células a cada matraz.

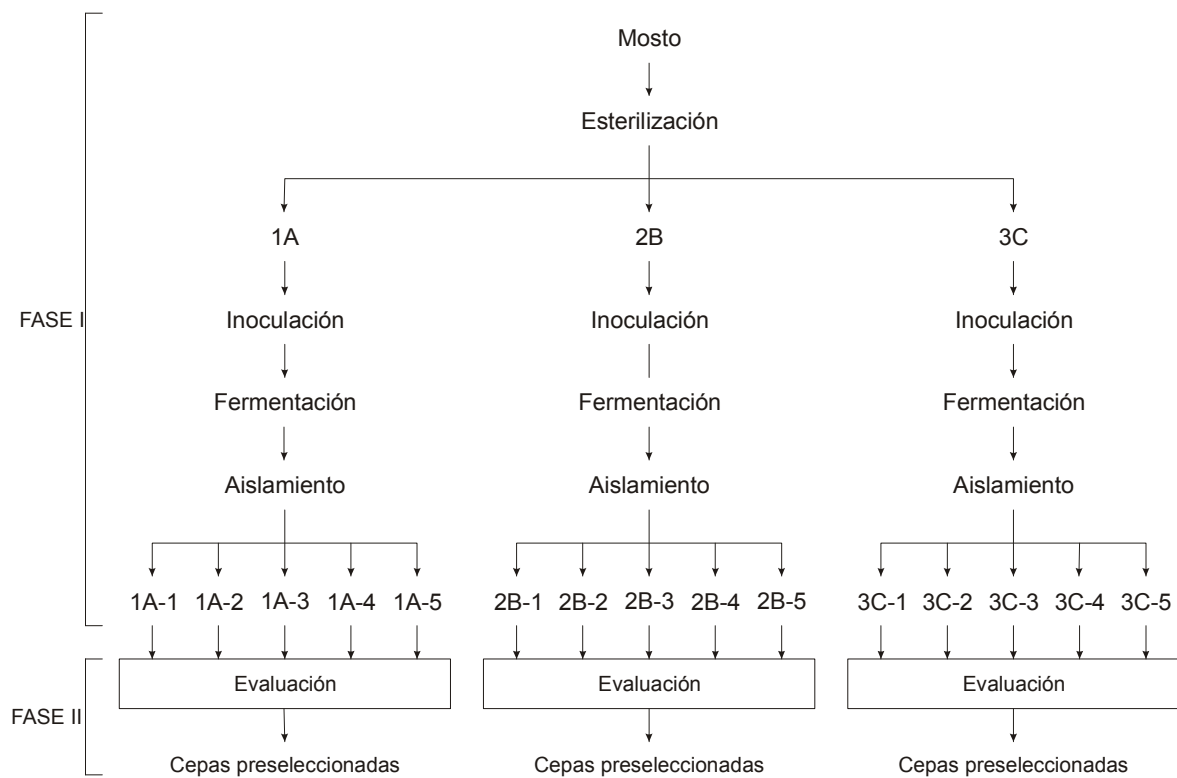


Figura 3.4: Fases que comprende la preselección de levaduras mediante fermentaciones masivas.

Los productos finales que se analizaron fueron el pH, acidez total, acidez volátil y fenotipo killer, los cuales nos permitieron descartar a las cepas menos apropiadas y detectar posibles clones en las cepas impuestas en la primera fase.

El diseño experimental que se utilizó para detectar los posibles clones fue un diseño completamente aleatorizado en la que interviene un solo factor con 5 niveles. Ver tabla 3.3

Hasta este punto se logra obtener cepas de levaduras tolerantes al etanol, resistentes a altas concentraciones de azúcares y a las que se imponen en las fermentaciones masivas. Estas cepas a partir de ahora la llamaremos “*cepas preseleccionadas*”.

Tabla 3.3: Diseño completamente aleatorizado con un solo factor con 5 niveles seguido en la detección de clones.

Factor	Cepa				
	1	2	3	4	5
Propiedades fisicoquímicas					

3.3.6 Evaluación de las aptitudes fermentativas de las cepas preseleccionadas

El siguiente paso es discriminar a las cepas preseleccionadas según sus aptitudes fermentativas para determinar que cepa puede ser utilizada en las fermentaciones para esta bebida e incluso otras bebidas fermentadas. A continuación se describe los criterios tomados para tal fin.

(a) Tolerancia al etanol:

Para cuantificar la tolerancia al etanol de las cepas preseleccionadas que fueron aisladas en las fermentaciones masivas, se empleó el método de Villar [44], que considera la pérdida de viabilidad celular en presencia de etanol. Es así que como primer paso para esta prueba se realizó la activación de las cepas preseleccionadas en 20 mL de caldo de YPD por 24 h. Paralelamente se prepararon tubos con caldo YPD a porcentajes de etanol v/v de 0%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5% y 15% en las que se inoculó 6×10^6 células de las cepas reactivadas a cada tubo. Se cerraron herméticamente para que no exista pérdidas de etanol y se incubó a 25°C por 7 días en la que se determinaron la cantidad de células desarrolladas en el primer, segundo y séptimo día mediante espectrofotometría descrito anteriormente.

(b) Tolerancia a altas concentraciones de azúcares

Esta prueba utiliza el mismo criterio de la pérdida de viabilidad celular pero ahora en presencia de glucosa. Para tal fin se reactivaron las cepas preseleccionadas en 20 mL de YPD por 24 h paralelamente se prepararon tubos con YPD a porcentajes de glucosa p/v de 10%, 15%, 20%, 25%, y 30%. Desarrolladas las cepas se procedió a inocular 6×10^6 células a cada tubo. Seguidamente se procedió a incubar a 25°C por 4 días en la que se determinó la cantidad de células desarrolladas para cada día mediante espectrofotometría.

(c) Velocidad fermentativa

Para determinar la velocidad fermentativa, se tomó como criterio evaluar la rapidez con que es consumido los azúcares en la fermentación. Para ello se reactivaron las

cepas preseleccionadas en 10 mL de YPD por 24 h en cuyo tiempo se inoculó 6×10^6 células en matraces de 250 mL conteniendo 150 mL de YPD a una concentración de 220 g/L de azúcares. Estos matraces se incubaron a temperatura ambiente y sin agitación. Los azúcares consumidos se analizaron en un periodo de 3 días por el método Miller (1958).

(d) Cinética de crecimiento a 15°C, 25°C y 35°C

Esta prueba consiste en determinar el comportamiento de las cepas seleccionadas a diferentes temperaturas. Para ello se preparó mosto de jora estéril (115°C por 10 min) a una concentración de azúcar de 100 g/L y se procedió a distribuir 400 mL en matraces Erlenmeyer de 500 mL. Seguidamente se inocularon 1×10^6 células de cada cepa en los matraces en forma individual y se incubó sin agitación a 15°C, 25°C y 35°C que son temperaturas que cubre los rangos de fermentaciones de distintos productos. Para determinar la cinética de crecimiento de las cepas a estas temperaturas se procedió a realizar conteos de las células viables por el método de recuento en placa; es decir se contó a las unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/mL) por un periodo de 10 días.

(e) Análisis de los productos de la fermentación 15°C, 25°C y 35°C

Se preparó mosto de jora estéril (115°C por 10 min) a una concentración de azúcar de 100 g/L y se procedió a distribuir 400 mL en matraces Erlenmeyer de 500 mL. Se inoculó por duplicado las cepas preseleccionadas que fueron reactivadas previamente. La cantidad de células que se inocularon fue de 1×10^7 la que se determinó por

espectrofotometría. La fermentación se llevó a cabo a 15°C, 25°C y 35°C por 20 días en condiciones anaerobias y sin agitación. Cumplido el periodo se procedió a realizar los siguientes análisis: pH, acidez total, acidez fija, acidez volátil, grado alcohólico y azúcar residual.

3.3.7 Selección final de cepas de levadura

Para la selección final de las cepas se procedió a dar una puntuación de 1 por cada característica favorable que presentaba las cepas preseleccionadas en cuanto a sus aptitudes fermentativas llamándolas ahora cepas seleccionadas.

3.3.8 Análisis sensorial

El análisis sensorial se realizó con las cepas seleccionadas, para lo cual se procedió a preparar mosto de jora estéril con una concentración de 100 g/L de azúcar. Se depositó 2 L de este mosto en dos botellas de 3 L de capacidad en las que se inocularon 8×10^7 células de las cepas seleccionadas en las pruebas de aptitud fermentativa previa activación en caldo YPD.

La fermentación se llevó a cabo a 25°C por 15 días en condiciones anaerobias y sin agitación. Finalizado este tiempo se procedió a realizar una cata con panelistas no entrenados considerando el formato de la tabla 3.4. Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente utilizando el método pareado (Amerine; 1 956) que considera una prueba de *chi cuadrado*. El valor obtenido de la ecuación 1.1, se comparó con el valor de la tabla estadística de test pareado considerando un nivel de significancia del 5%.

$$\chi^2 = \frac{[|\text{Éxito} - \text{fracaso}| - 1]^2}{n} \quad \dots \quad 1.1$$

Donde n es el número de muestras

Tabla 3.4: Formato que fue considerado para la prueba sensorial adaptada del formato propuesto por Torija [31].

Nombre:			
Fecha:			
Producto: Claro de chicha de jora			
Evalúe las características de cada muestra y responda a las siguientes preguntas marcando una “x” en la alternativa que elija.			
Código de las muestras: x - y			
1. ¿Hay diferencia entre las chichas?	Si _____	No _____	NS _____
2. ¿Cuál es el más agradable en nariz?	x: _____	y: _____	NS: _____
3. ¿Cuál es el más aromático?	x: _____	y: _____	NS: _____
4. ¿Cuál prefieres?	x: _____	y: _____	NS: _____

3.3.9 Identificación molecular de las cepas seleccionadas

3.3.9.1 Aislamiento del DNA genómico de levaduras

Se utilizó el protocolo del kit “*Axy Prep y Multisource genomic Miniprep Kit AP-MN-MS-GDNA-50*” con ligeras modificaciones que se mencionan a continuación.

- Dejar crecer las células en 5 mL de caldo YPD a 25°C por 24 h.
- Centrifugar 2 mL del cultivo anterior a 12 000 g por 2 min y eliminar el sobrenadante.
- Lavar con 1 mL de agua tetradesilada estéril dos veces.
- Centrifugar a 12 000 g por 2 min. Eliminar el sobrenadante y suspender en 200 µL de agua tetradesilada estéril.

- En un mortero y con la ayuda de un pilón reducir a un polvo fino la suspensión anterior agregándole previamente nitrógeno líquido.
- Colocar el mortero en el baño maría a 65°C hasta que se derrita completamente.
- Añadir 600 µL de Buffer G-A y homogenizar la muestra por 30 s más.
- Transferir 650 µL de la suspensión homogenizada a un microtubo de 2 mL y añadir 1,2 µL de RNAsa. Incubar por 10 min a 65°C en baño maría.
- Añadir 400 µL del Buffer G-B y 1 mL del Buffer DV preenfriado a 4°C; en ese orden. Mezclar por incorporación y centrifugar a 12 000 g por 2 min.
- Descartar la fase superior y añadir nuevamente 1 mL de Buffer DV preenfriado a 4°C, mezclar por incorporación y centrifugar a 12 000 g por 2 min.
- Descartar la fase superior y trasladar la fase inferior a un Spin-filter (colocado en un microtubo de 2 mL), y centrifugar a 12 000 g por 1 min.
- Descartar el Spin-filter y añadir 400 µL de Buffer BV y mezclar por inmersión.
- Transferir la mezcla a una columna AxyPrep (colocado en un microtubo de 2 mL). Centrifugar a 12 000 g por 1 min.
- Añadir 500 µL del Buffer W1 a la columna AxyPrep (colocado en un microtubo de 2 mL). Centrifugar a 12 000 g por 1 min y descartar el filtrado.
- Añadir 700 µL de Buffer W2 a la columna AxyPrep (colocado en un microtubo de 2 mL). Centrifugar a 12 000 g por 1 min, descartar el filtrado y nuevamente centrifugar a 12 000 g por 1 min.
- Colocar la columna AxyPrep en el microtubo de 1,5 mL y añadir de 100 µL de Eluent a 65°C. Dejar reposar por 1 min a temperatura ambiente y centrifugar a 12 000 g por 1 min.

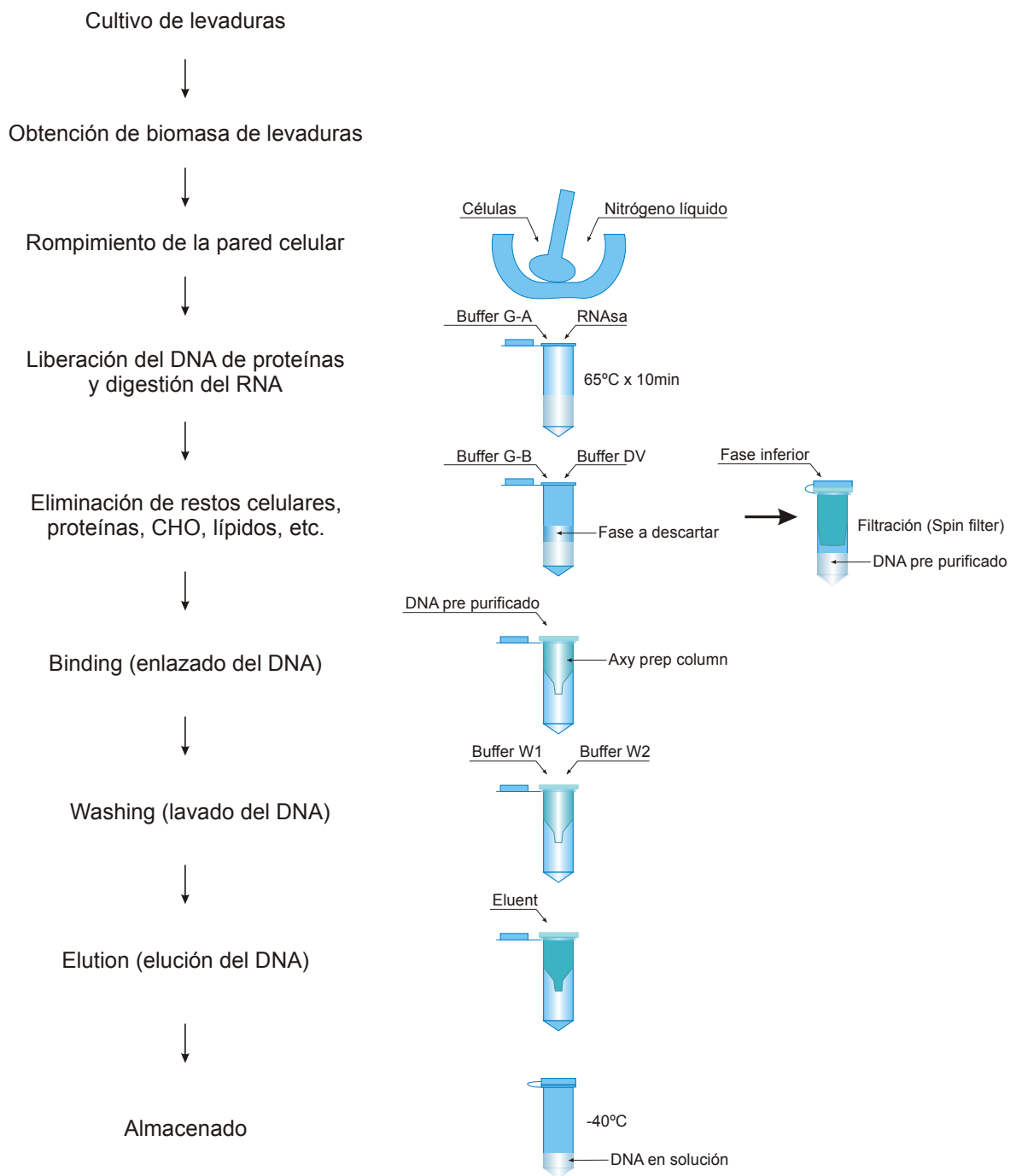


Figura 3.5: Fases que comprende la extracción de DNA genómico a partir de cepas de levaduras.

Para la evaluación de la calidad y peso del DNA extraído se le realizó una corrida electroforética en gel de agarosa. El gel se preparó a una concentración de 0,8% en TAE 0,5X. Se cargó a los pocillos 8 μ L de DNA extraído mezclado con 2 μ L de buffer de carga. Se corrió el gel a 70 V por 1 h en buffer TAE 0,5X. Se utilizó el Lamda DNA/Hind III Marker (Fermentas) como marcador de peso molecular. La tinción del gel se realizó en una bandeja con bromuro de etidio a una concentración de 1 μ g/mL. Las bandas se visualizaron en un transiluminador UV y seguidamente se fotografiaron.

3.3.9.2 Amplificación de la región ITS (Secuencias internas transcritas) del rDNA mediante PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

Para la amplificación de la región ITS (ITS-1 + 5.8S + ITS-2) del rDNA se utilizó los oligonucleótidos ITS1 – ITS4 descritos por White y *et al* [38], utilizando el siguiente programa:

- Al inicio 95°C x 3 min (desnaturalización)
- 30 ciclos

[95°C x 30 s. (Desnaturalización)
	52°C x 30 s. (Hibridación)
	72°C x 1 min. (Polimerización)
- Al final 15 min a 72°C para terminar de polimerizar.

En la tabla 3.5 se describe la composición de la mezcla utilizada para la PCR.

Con el fin de comprobar la amplificación de la región ITS del rDNA se realizó una electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR. El gel se preparó a una concentración de 1,2% en tampón TAE 0,5X y a cada pocillo se le cargó con 8 μ L del

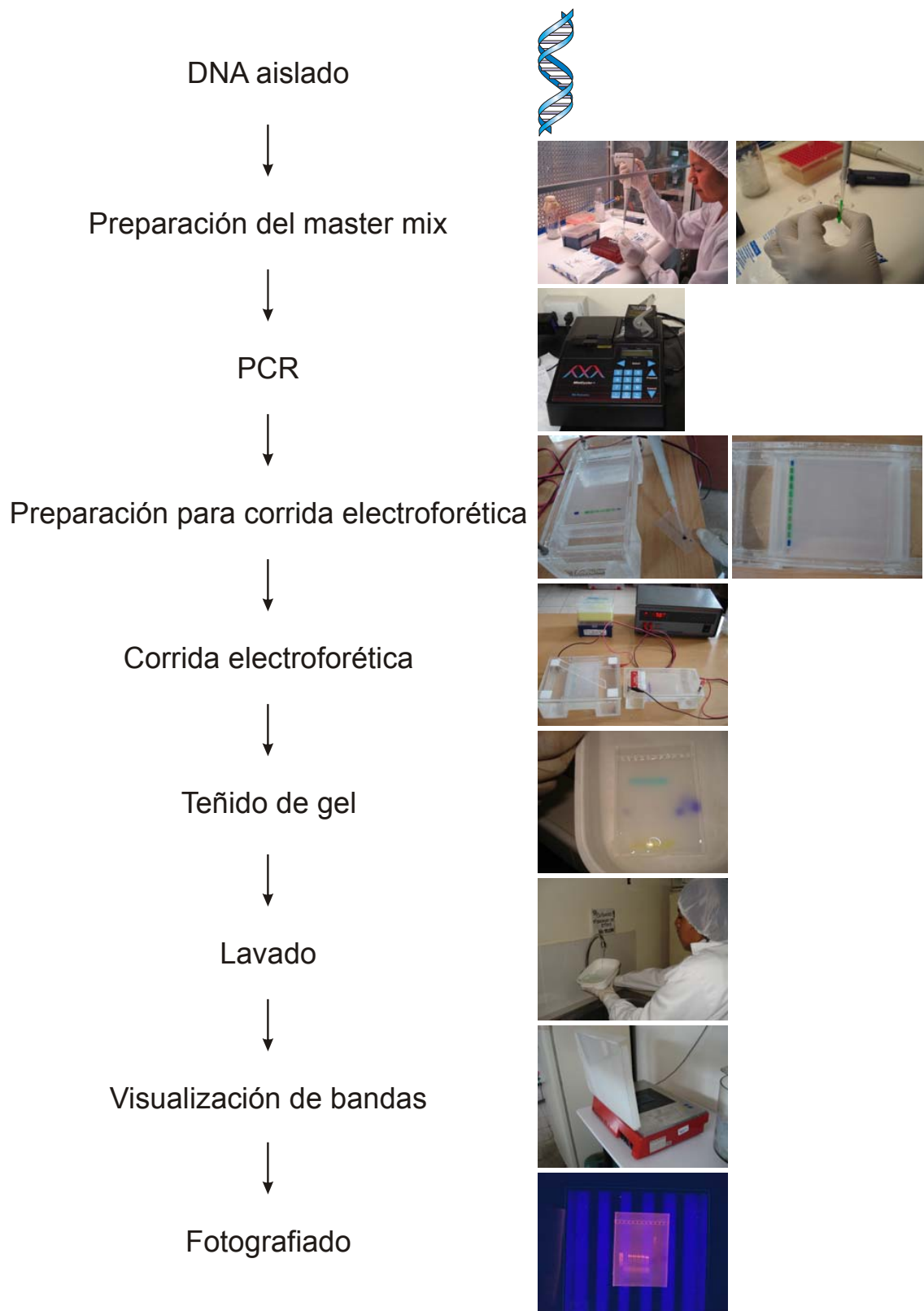


Figura 3.6: Fases que comprende la Amplificación de la región ITS del rDNA mediante PCR.

amplificado mezclado con 2 μL de buffer de carga. Se realizó la electroforesis a 70 V durante 1 h y se utilizó el marcador de peso molecular comercial *GeneRuler 100 bp DNA Ladder* (Fermentas). La tinción del gel se realizó en una bandeja con bromuro de etidio a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las bandas se visualizaron en un transiluminador UV y seguidamente se fotografiaron (figura 3.6).

Tabla 3.5: Reactivos con sus respectivas concentraciones que fueron utilizadas para la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Componente	Concentración stock	Concentración final	$\mu\text{L}/\text{reacción}$
Green GoTaq Buffer	5 X	1 X	10
MgCl ₂	25 mM	0,75 mM	1,5
dNTP (mix)	2,5 mM	0,2 mM	4
Primer ITS1	10 pM/ μL	0,4 pM	2
Primer ITS4	10 pM/ μL	0,4 pM	2
GoTaq DNA polimerasa	5 u/ μL	0,1 u	0,2
DNA	-	-	4
Total	-	-	50

3.3.9.3 Análisis de los perfiles de restricción (RFLP) del DNA ribosomal (rDNA)

Para determinar los perfiles de restricción (RFLP) del DNA ribosomal se digirió los amplificadores de la región ITS (ITS-1 + 5.8S + ITS-2) del rDNA con los siguientes enzimas de restricción: *Hinf I*, *Hha I*, *Hae III*, las que fueron incubadas a 37°C por 12 h. Seguidamente se realizó una corrida electroforética de los digeridos en gel de agarosa al 2,8% a un voltaje de 70 V inoculando 10 μL del digerido más 2 μL de buffer de carga en cada posillo. Se utilizó *GeneRuler 100 bp DNA Ladder* (Fermentas) como marcador de peso molecular. La tinción del gel se realizó en una bandeja con bromuro de etidio a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las bandas se visualizaron en un transiluminador UV y seguidamente se

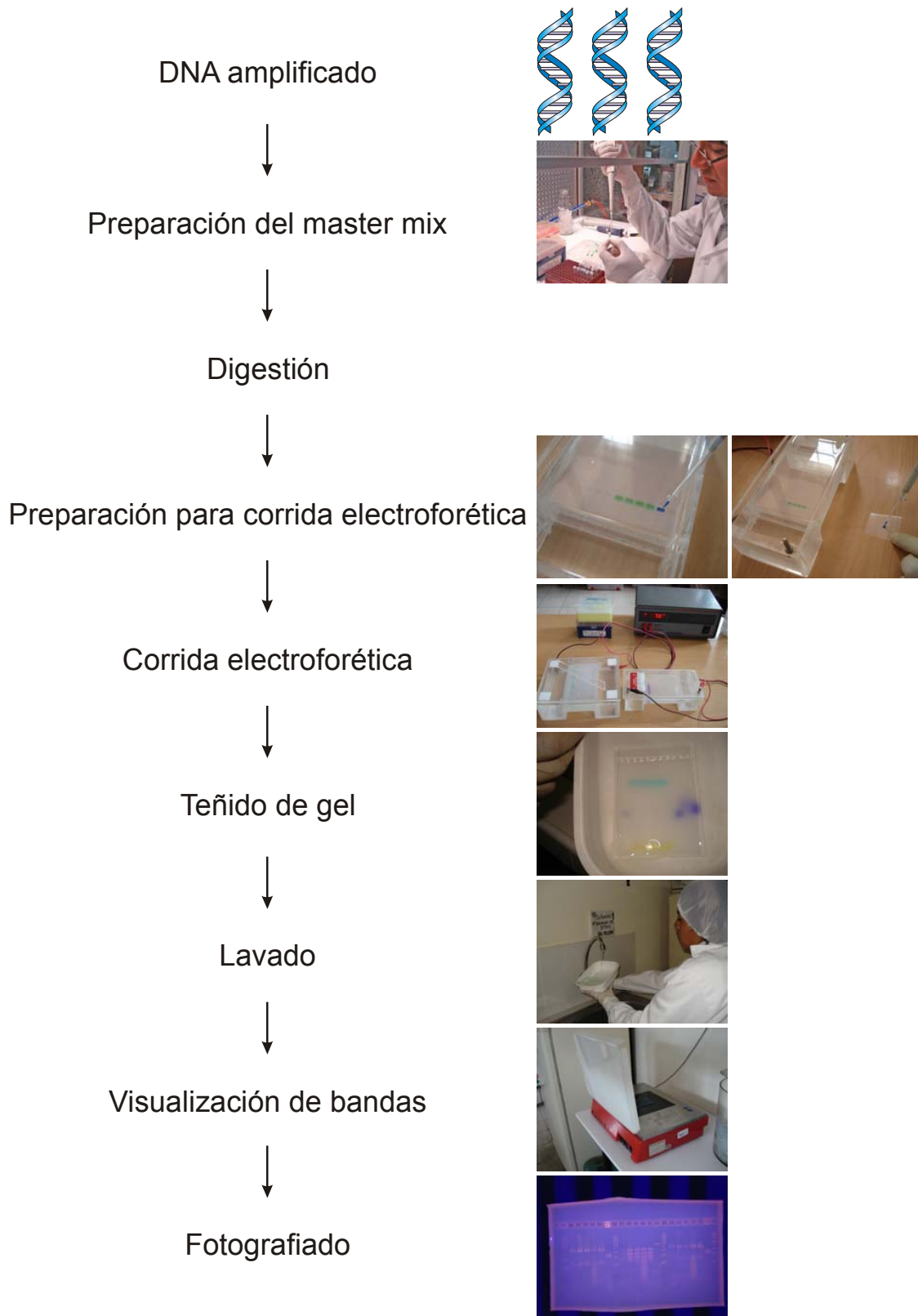


Figura 3.7: Fases que comprende el análisis de los perfiles de restricción (RFLP) del DNA ribosomal (rDNA).

fotografiaron (Figura 3.7). En las tablas 3.6, 3.7 y 3.8 se describen la composición de mix para la digestión con cada enzima de restricción que fue utilizada.

Tabla 3.6: Digestión con la enzima Hae III

Componente	Concentración		μL/reacción
	stock	final	
H2O MiliQ	-	-	6,5
Buffer 10X R	10X	1X	2,0
Hae III	10 u	15 u	1,5
DNA Amplificado	-	-	10
Total	-	-	20

Tabla 3.7: Digestión con la enzima Hha I

Componente	Concentración		μL/reacción
	stock	final	
H2O MiliQ	-	-	6,5
Buffer 10X Tango	10X	1X	2,0
Hha I	10 u/μL	15 u	1,5
DNA Amplificado	-	-	10
Total	-	-	20

Tabla 3.8: Digestión con la enzima Hinf I

Componente	Concentración		μL/reacción
	stock	final	
H2O MiliQ	-	-	6,3
Buffer 10X RE	10X	1X	2,0
BSA	10 μg/μL	0,1 μg/μL	0,2
Hinf I	10 u/μL	15u	1,5
DNA Amplificado	-	-	10
Total	-	-	20

3.3.9.4 Análisis de los perfiles de restricción (RFLP) del DNA mitocondrial (mtDNA)

Para determinar los perfiles de de restricción (RFLP) del mtDNA se digirió el DNA extraído de las cepas de levadura con la enzima de restricción Hinf I a una temperatura de 37°C por 12 horas. Seguidamente se realizó una corrida electroforética de los digeridos en gel de agarosa a una concentración de 0,8% y a un voltaje de 70 V; inoculando 20 μ L del digerido más 2 μ L de buffer de carga a cada posillo. Se utilizó *Lambda DNA/Hind III Markers*: (Promega) como marcador de peso molecular. La tinción del gel se realizó en una bandeja con bromuro de etidio a una concentración de 1 μ g/mL. Las bandas se visualizaron en un transiluminador UV y seguidamente se fotografiaron. En la tabla 3.9 se describe la composición de mix para la digestión con la enzima Hinf I.

Tabla 3.9: Digestión del DNA de las cepas de levadura mediante la enzima Hinf I.

Componente	Concentración	Concentración	μ L/reacción
	stock	final	
H2O MiliQ	-	-	6,3
Buffer 10X RE	10X	1X	2,0
BSA	10 μ g/ μ L	0,1 μ g/ μ L	0,2
Hinf I	10 u/ μ L	15u	1,5
DNA Amplificado	-	-	10
Total	-	-	20

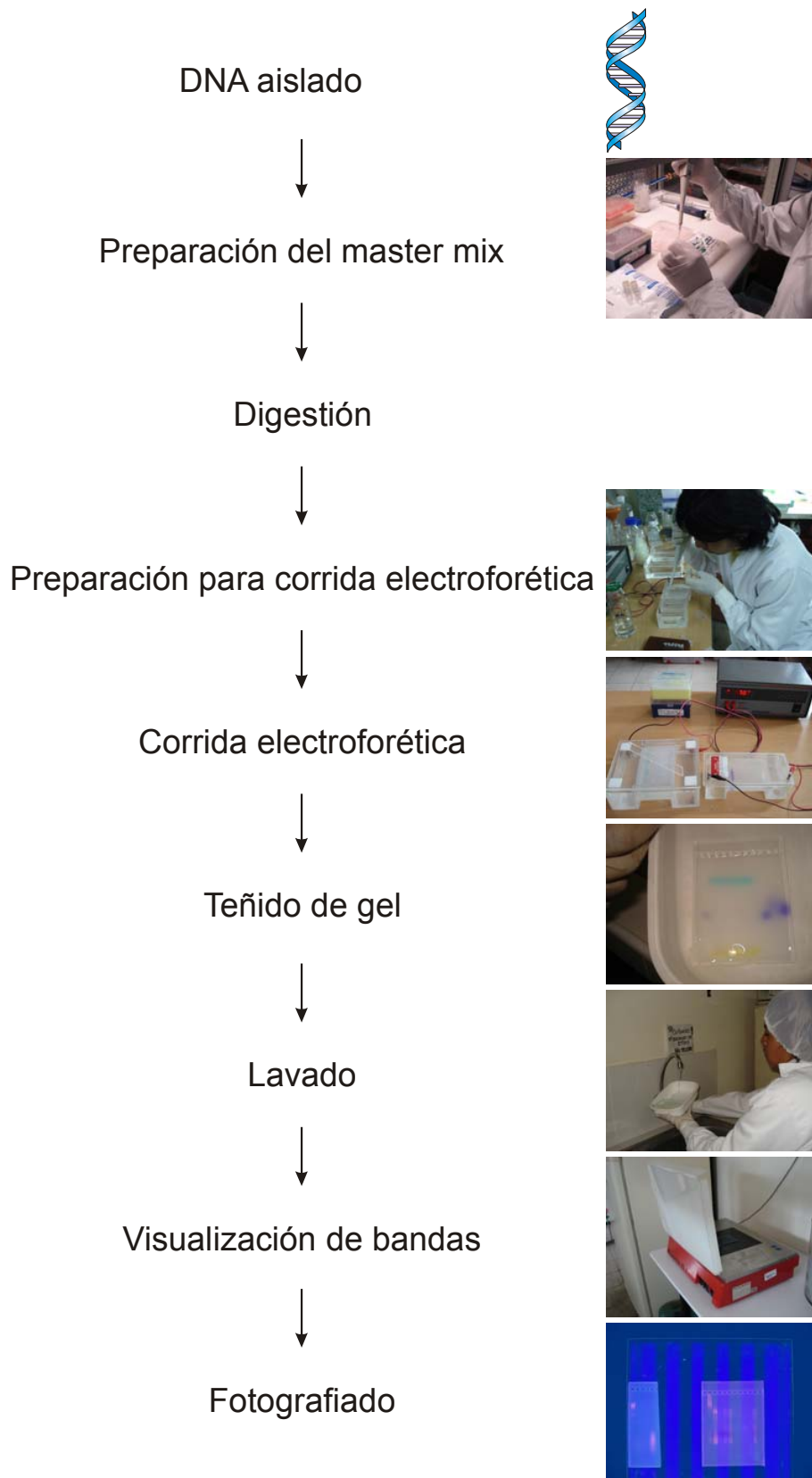


Figura 3.8: Fases que comprende el Análisis de los Perfiles de Restricción (RFLP) del DNA mitocondrial (mtDNA).

IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Muestreo

Las muestras procedieron de 15 productores de diferentes distritos del Valle del Mantaro (ver tabla 4.1, figura 4.1) las cuales fueron elegidas por la continuidad y antigüedad mayor a dos años en su producción. Se recogieron 400 mL de los depósitos, que generalmente eran cántaros de arcilla, en frascos estériles con la ayuda de una jarra también estéril que a la vez servía para homogenizar y obtener muestras representativas. Una vez recogidas inmediatamente fueron transportadas en frío al laboratorio de Microbiología Industrial del Instituto de Biotecnología de la UNCP, donde se conservaron a 4°C hasta el momento de realizar los análisis fisicoquímicos y aislamiento de levaduras. El tiempo de procesado para las muestras fue de 2 a 8 horas después de su recogida.

4.2 Análisis fisicoquímicos

4.2.1 Análisis fisicoquímicos realizados a las muestras de chicha de jora recolectadas del muestreo

Los resultados obtenidos en los análisis fisicoquímicos realizados a la chicha de jora de 15 productores del Valle del Mantaro, quienes poseen continuidad y antigüedad mayor a dos años en su producción se muestran en la tabla 4.2. Estos resultados obtenidos concuerdan con los datos reportados por Gonzáles [3] quien analizó la chicha de jora que se elabora en Catacaos y Sullana (norte del Perú); determinando que el pH promedio para estas bebidas era 3,28, que al compararlo con los resultados que se obtuvieron en el presente trabajo (pH = 3,36) nos indica que el pH bajo favorece el mantenimiento de los microorganismos que participan en la

fermentación de esta bebida, como son las levaduras y las bacterias lácticas cuyo rango de pH óptimo de crecimiento para las primeras es de 4,5 a 6,5 [18], pero pueden crecer como es el caso de las *S. cerevisiae* a rangos comprendidos entre 2,3 a 8,6 [45] y en el caso de las bacterias lácticas este rango de pH es de 3,8 a 7,2 [45]. Además a este pH bajo se evita el desarrollo de las bacterias patógenas como son las *E. coli*, *Salmonella* sp. entre otros, cuyo pH de desarrollo óptimo se encuentra en el rango de 4,4 a 9,0 [45] de esta manera se afirma que estas muestras no representan potenciales problemas de salud.

Tabla 4.1: Procedencia de las muestras de chicha de jora de donde fueron aislados las cepas de levaduras en estudio.

Nº	LUGAR	DIRECCIÓN	Código
1	El Tambo	Jr. Tumbes Mz 51 LT 12 Ciudad Universitaria / Rosa Pariona Pumachahua	M1
2	El Tambo	Av. Huancavelica 1566	M2
3	Concepción	Jr. Mariscal Cáceres Nº 425 / Luz Ramos	M3
4	Concepción	Jr. Mariscal Cáceres Nº 1180 / Amanda Ramos Elias	M4
5	Jauja	Jr. Gálvez Nº 799 / Beatriz León	M5
6	Huancayo	Esquina Jr. Piura y Mantaro / Sra. Teófila	M6
7	Hualhuas	Jr. Huancayo S/N Maderera / Maruxa Balbín	M7
8	Huancayo	Mercado Modelo – Frontis / Sr. Rómulo	M8
9	Huancayo	Jr. Piura 345 / Sra. Libertad	M9
10	Jauja	Av. Motto Vivanco Nº 1131 / Primitiva Castro	M10
11	Huaycha	Carretera margen derecha / La Encantada - recreo	M11
12	Sicaya	Jr. Unión Nº 812 / David Ortiz	M12
13	El Tambo	Av. Mariscal Castilla / Huancahuasi	M13
14	Ingenio	Carretera Principal / Recreo Paca- Paca	M14
15	Huayucachi	Féria central	M15

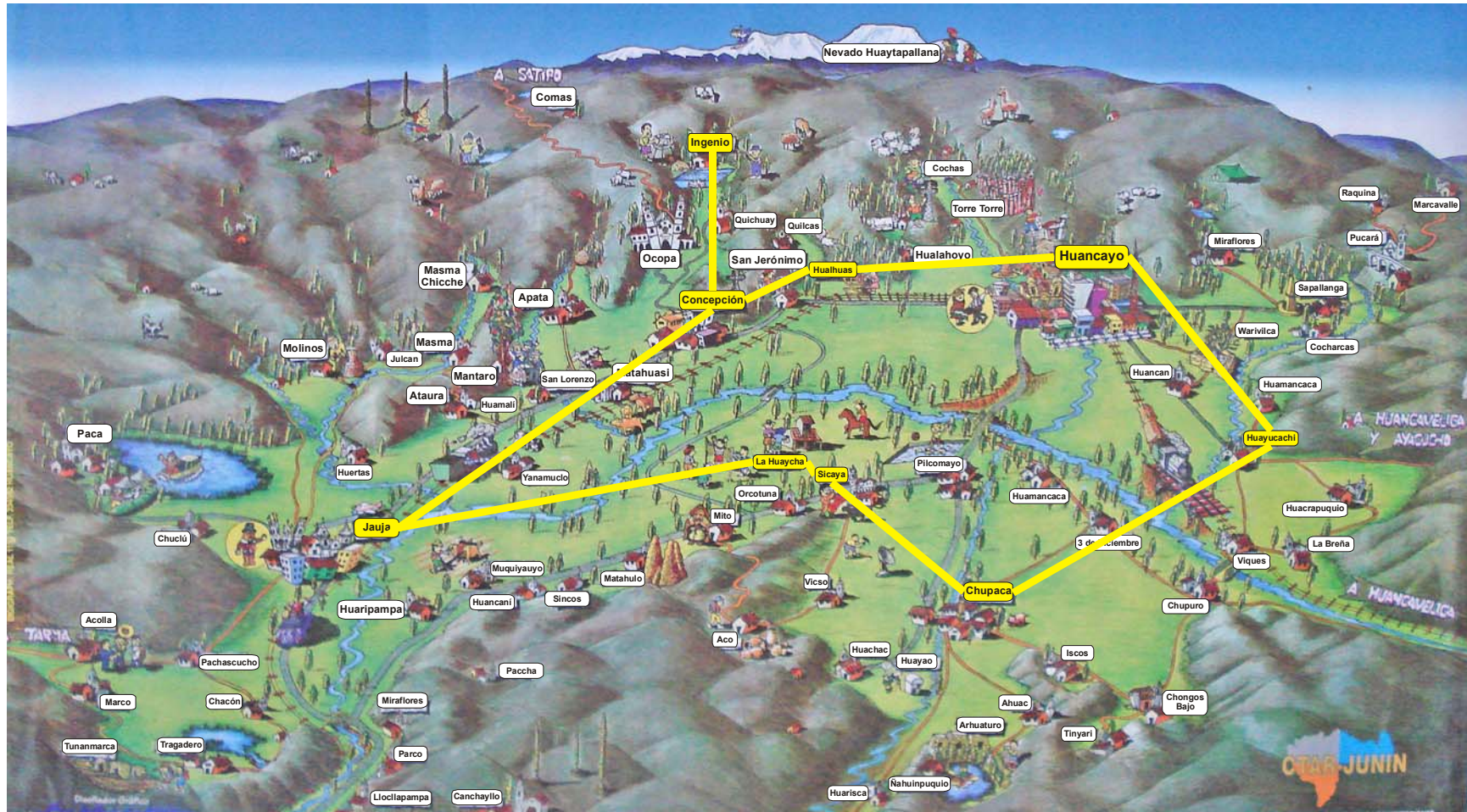


Figura 4.1: Trayectoria seguida en el muestreo de chicha de Jora elaborada en el Valle del Mantaro.

Tabla 4.2: Análisis fisicoquímicos realizadas a las chicha de jora recolectadas

Código	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15
Brix a 25°C	9,20 (±0,1)	11,60 (±0,0)	9,20 (±0,1)	19,10 (±0,2)	9,00 (±0,1)	11,67 (±0,0)	8,00 (±0,0)	10,00 (±0,0)	10,80 (±0,1)	10,80 (±0,2)	8,40 (±0,1)	9,60 (±0,0)	13,40 (±0,0)	10,60 (±0,0)	8,8 (±0,1)
pH a 20°C	3,45 (±0,02)	3,22 (±0,03)	3,45 (±0,00)	3,49 (±0,01)	3,68 (±0,01)	3,20 (±0,01)	3,30 (±0,01)	3,37 (±0,01)	3,27 (±0,03)	3,35 (±0,02)	3,23 (±0,01)	3,48 (±0,01)	3,30 (±0,02)	3,29 (±0,03)	3,42 (±0,02)
Acidez total (g/100 mL ac. sulfúrico)	0,51 (±0,04)	0,65 (±0,02)	0,22 (±0,03)	0,26 (±0,02)	0,18 (±0,06)	0,30 (±0,03)	0,27 (±0,06)	0,28 (±0,05)	0,25 (±0,02)	0,25 (±0,01)	0,36 (±0,01)	0,36 (±0,03)	0,24 (±0,03)	0,26 (±0,03)	0,32 (±0,01)
Acidez fija (g/100 mL ac. sulfúrico)	0,27 (±0,04)	0,27 (±0,05)	0,15 (±0,06)	0,19 (±0,04)	0,11 (±0,04)	0,22 (±0,04)	0,17 (±0,10)	0,19 (±0,02)	0,16 (±0,01)	0,16 (±0,04)	0,22 (±0,01)	0,16 (±0,04)	0,15 (±0,01)	0,13 (±0,06)	0,15 (±0,02)
Acidez volátil (g/100 mL ac. acético)	0,29 (±0,04)	0,47 (±0,03)	0,10 (±0,04)	0,09 (±0,02)	0,09 (±0,05)	0,09 (±0,03)	0,12 (±0,05)	0,10 (±0,02)	0,11 (±0,01)	0,10 (±0,03)	0,17 (±0,01)	0,24 (±0,02)	0,11 (±0,01)	0,17 (±0,03)	0,21 (±0,01)

Nº de repeticiones: 3

El pH bajo de la chicha se debe principalmente al metabolismo de las levaduras y bacteria lácticas ya que en el metabolismo de estas últimas se produce ácido láctico a partir de los azúcares [31] en este caso de la glucosa, maltosa y sacarosa presente en el mosto de jora.

Se ha demostrado además que en estas bebidas participan bacterias lácticas productoras de bacteriocinas [46] y de levaduras con fenotipo killer (K^+R^+) [31], dando una evidencia más, que estas bebidas no representan problemas de salud ya que los microorganismos participan como antagonistas.

4.2.2 Análisis químico proximal de jora y malta

Los análisis químico proximal (tabla 4.3) practicados a estos productos se observa que no existe claras diferencias al que reporta la tabla de composición de alimentos peruanos [32].

Tabla 4.3: Análisis químico proximal de jora y malta utilizada en el trabajo por cada 100 g de muestra.

Químico proximal	Jora (%)	Malta (%)
Humedad	11,3 ($\pm 0,29$)	7,6 ($\pm 0,26$)
Proteína	9,2 ($\pm 0,04$)	8,6 ($\pm 0,68$)
Grasa	3,2 ($\pm 0,22$)	1,74 ($\pm 0,15$)
Fibra	4,0 ($\pm 0,03$)	5,3 ($\pm 0,11$)
Ceniza	2,3 ($\pm 0,18$)	1,8 ($\pm 0,08$)
Carbohidratos	70,0 ($\pm 0,03$)	75,0 ($\pm 0,36$)

Nº de repeticiones: 3

4.2.3 Análisis de la calidad maltera

En cuanto a la calidad maltera (tabla 4.4) se observa que los azúcares reductores de la jora es mucho mayor al de la malta, aproximadamente cuatro veces más. Esta elevada cantidad de azúcares

reductores en la jora es la que favorece a la obtención de un mosto fermentecible sin necesidad de producir un mosto dulce mediante la sacarificación y proteólisis como lo hacen en la malta para producir cerveza [5].

Tabla 4.4: Análisis de la calidad maltera de jora y malta empleada en el trabajo.

Análisis	Malta	Jora
Azúcares reductores (g Glucosa/100 g)	5,7 ($\pm 0,08$)	20,5 ($\pm 0,02$)
Poder diastásico ($^{\circ}$ Lintner)	115 ($\pm 0,16$)	7,4 ($\pm 0,04$)

Otro dato importante que resulta de estos análisis es que la malta posee un elevado poder diastásico de 115 $^{\circ}$ Lintner, lo que no es sorprendente ya que estos valores son propios de la malta de 6 líneas, que poseen valores de 120 a 140 $^{\circ}$ Lintner [5]. En cuanto la jora posee un poder diastásico de 7,4 que es propio de este producto como lo reporta De Florio [1] que obtuvo valores de 6 $^{\circ}$ Lintner para este producto. Pero Velásquez [47] reporta haber obtenido un poder diastásico de 128 $^{\circ}$ Lintner del maíz cancha de Huaraz realizando un malteado a una temperatura de germinado a 25°C y secado a 27,3°C, con lo que nos abre un camino para la estandarización posterior de este producto. Esto hace presumir que los parámetros de temperatura y humedad de germinación y la temperatura de secado para la cebada y maíz son diferentes influyendo en la producción de α amilasa enzima que se sintetiza cuando comienza la germinación [5].

4.3 Aislamiento de levaduras

Las muestras de chicha de jora utilizadas en este estudio tenían una población de levaduras entre 10^6 a 10^7 ufc/mL. De las cuales se aislaron un total de 150 cepas con morfología típica a las colonias de *S. cerevisiae* (colonias lisas de color crema y de brillantes a opacas), descartando a aquellas que no presentaban estas características [22].

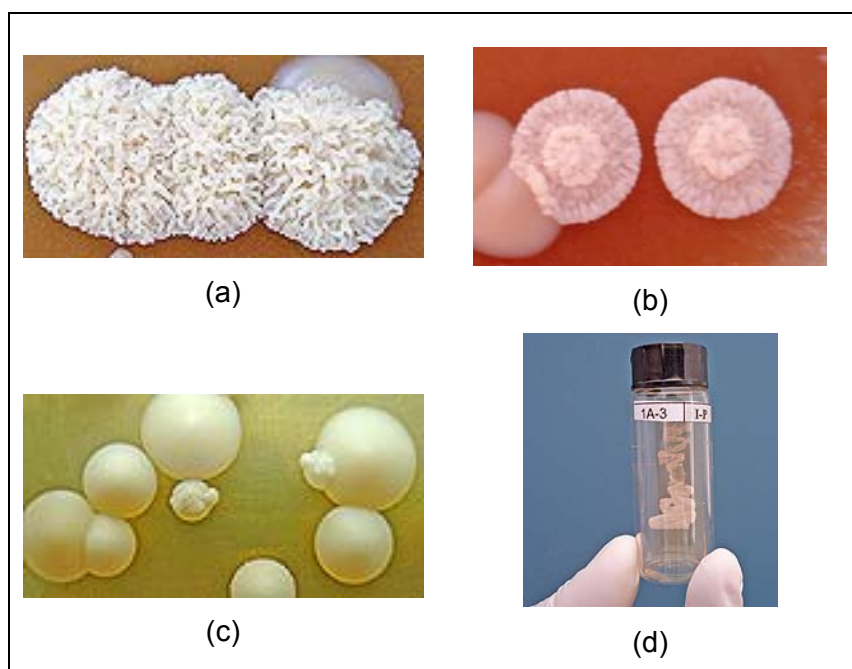


Figura 4.2: Morfología de algunas colonias de levadura presentes en chicha de jora. (a) y (b) Colonia no *S. cerevisiae*, (c) Posible colonia de *S. cerevisiae*, (d) Cepas conservadas en agar inclinado YPD.

4.4 Identificación presuntiva de la especie *Saccharomyces cerevisiae*

De las 150 cepas previamente aisladas, sólo 33 cepas (22%) eran tolerantes al etanol por encima de 7,5% v/v etanol (figura 4.3). Estas 33 cepas fueron consideradas posibles cepas *S. cerevisiae*.

En la tabla 4.5 se muestran los resultados de la tolerancia al etanol de las 150 cepas aisladas de chicha de jora. Los resultados en gris corresponden a las cepas que se seleccionaron debido a su tolerancia al etanol por encima de 7,5% v/v.

Manrique [7] determinó que en la flora levaduriforme de la chicha de jora, el 53% pertenecía a la especie *S. cerevisiae*; pero en los resultados obtenidos solo el 22% eran presumiblemente *S. cerevisiae*, habiendo una diferencia del 31%. Esta diferencia puede estar fundamentada en que no todas las cepas *S. cerevisiae* tienen la misma capacidad de tolerar al etanol, sino que esta capacidad varía según sus estirpes (cepas) [22, 44].

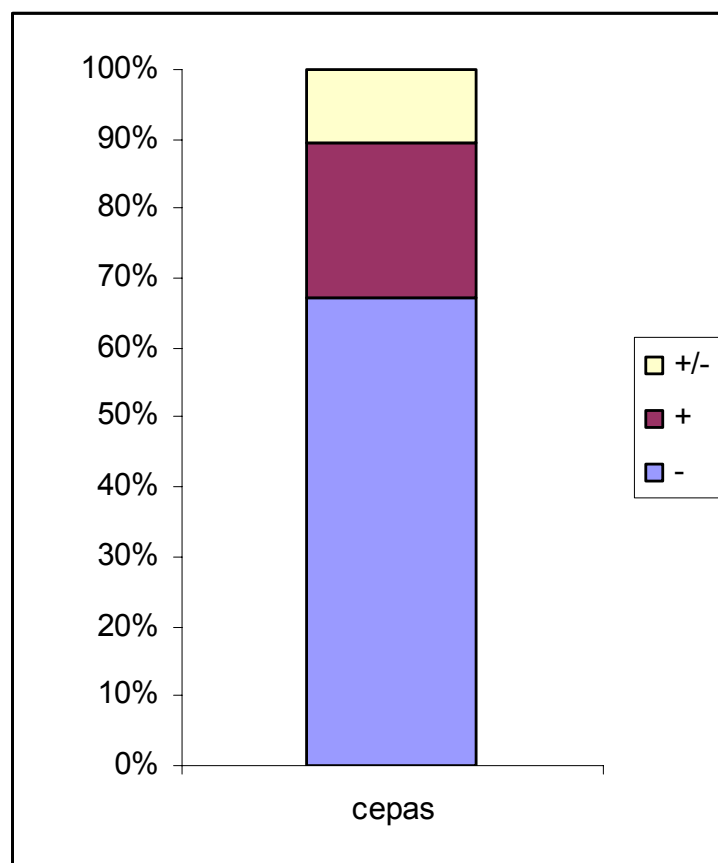


Figura 4.3: Porcentaje de las cepas de levadura aisladas de chicha de jora tolerantes al etanol. (+): Tolerantes al etanol por encima de 7,5%. Cepas desarrolladas completamente comparada con su testigo, (+/-): Tolerantes al etanol hasta 7,5% v/v. cepas con poco desarrollo en comparación a su testigo. (-): Cepas no tolerantes al etanol hasta 7,5% v/v. Cepas no desarrollada en comparación de su testigo.

Villar [44] estudió la tolerancia al etanol de *S. cerevisiae*, *Candida utilis*, *Candida pseudotropicalis*, *Pichia stipitis* y *Kluyveromyces marxianus* incluyendo a la especie *S. cerevisiae* al grupo de las levaduras más tolerantes al etanol (>8% v/v), sustentado en la conservación de su tasa de fermentación y respiración a niveles de 2M de etanol (aproximadamente 12% v/v). En cuanto a las cuatro levaduras restantes, las incluyó en el grupo de tolerancia baja - media (3,0 - 6,0%v/v etanol). De esto se corrobora que el criterio de tolerancia al etanol mayor al 7,5% v/v que se tomó para la preselección de *S. cerevisiae* estaba en lo correcto, ya que a estos valores la probabilidad de desarrollo de otras especies de levaduras son escasas.

Tabla 4.5: Distribución de cepas de levadura aisladas de chicha de jora tolerantes al etanol por encima de 7,5% v/v.

Cepa		Cepa		Cepa		Cepa	
M1-1	-	M5-1	+	M9-1	-	M13-1	+/-
M1-2	+	M5-2	-	M9-2	-	M13-2	-
M1-3	-	M5-3	-	M9-3	-	M13-3	-
M1-4	+	M5-4	+	M9-4	-	M13-4	-
M1-5	-	M5-5	+	M9-5	-	M13-5	+
M1-6	-	M5-6	-	M9-6	+	M13-6	-
M1-7	+/-	M5-7	+	M9-7	-	M13-7	-
M1-8	-	M5-8	+/-	M9-8	-	M13-8	+
M1-9	-	M5-9	-	M9-9	+	M13-9	-
M1-10	-	M5-10	+	M9-10	+	M13-10	+/-
M2-1	-	M6-1	-	M10-1	-	M14-1	+
M2-2	+	M6-2	-	M10-2	+/-	M14-2	-
M2-3	-	M6-3	-	M10-3	-	M14-3	-
M2-4	-	M6-4	-	M10-4	-	M14-4	+
M2-5	-	M6-5	+/-	M10-5	-	M14-5	-
M2-6	-	M6-6	-	M10-6	-	M14-6	-
M2-7	+	M6-7	-	M10-7	+/-	M14-7	-
M2-8	-	M6-8	+	M10-8	-	M14-8	-
M2-9	-	M6-9	-	M10-9	+	M14-9	-
M2-10	+	M6-10	+/-	M10-10	-	M14-10	+
M3-1	-	M7-1	-	M11-1	-	M15-1	-
M3-2	-	M7-2	-	M11-2	+	M15-2	+
M3-3	-	M7-3	+	M11-3	+/-	M15-3	-
M3-4	-	M7-4	-	M11-4	-	M15-4	-
M3-5	+/-	M7-5	-	M11-5	-	M15-5	-
M3-6	-	M7-6	+	M11-6	+	M15-6	+/-
M3-7	-	M7-7	-	M11-7	-	M15-7	-
M3-8	-	M7-8	+/-	M11-8	-	M15-8	+
M3-9	-	M7-9	-	M11-9	-	M15-9	+
M3-10	+	M7-10	-	M11-10	-	M15-10	-
M4-1	+/-	M8-1	-	M12-1	+		
M4-2	-	M8-2	-	M12-2	-		
M4-3	-	M8-3	+	M12-3	+/-		
M4-4	+	M8-4	-	M12-4	-		
M4-5	-	M8-5	-	M12-5	-		
M4-6	+/-	M8-6	-	M12-6	+		
M4-7	-	M8-7	-	M12-7	-		
M4-8	-	M8-8	+	M12-8	-		
M4-9	-	M8-9	-	M12-9	+/-		
M4-10	-	M8-10	-	M12-10	-		

- (+): Tolerantes al etanol por encima de 7,5%. Cepas desarrolladas completamente comparadas con su testigo.
- (+/-): Tolerantes al etanol hasta 7,5% v/v. Cepas con poco desarrollo en comparación a su testigo.
- (-): Cepas no tolerantes al etanol hasta 7,5% v/v. Cepas no desarrolladas.

4.5 Pre selección de levaduras mediante fermentaciones masivas

4.5.1 Fase I: Fermentaciones masivas

Las fermentaciones masivas se realizaron con las 33 cepas tolerantes al etanol por encima del 7,5% (v/v) de etanol, presumiblemente pertenecientes a la especie *S. cerevisiae*; para lo cual se empleó 3 matraces Erlenmeyer de 500 mL codificados con 1A, 2B y 3C distribuyendo a cada matraz, 11 cepas provenientes de diferentes zonas. La tabla 4.6 muestra la distribución de las cepas que se inocularon en los Erlenmeyer.

Tabla 4.6: Distribución de cepas tolerantes al etanol por encima del 7,5% (v/v) que se inocularon en los matraces 1A, 2B y 3C para realizar las fermentaciones masivas.

Matraz	Distribución de cepas										
1A	M1-2	M2-2	M5-1	M7-3	M8-3	M9-6	M11-2	M12-1	M13-5	M14-1	M15-2
2B	M1-4	M2-7	M5-4	M5-10	M7-6	M9-10	M11-6	M12-6	M13-8	M14-10	M15-9
3C	M2-10	M3-10	M4-4	M5-5	M5-7	M6-8	M8-8	M9-9	M10-9	M14-4	M15-8

Terminada la fermentación se aislaron 5 cepas de cada matraz a partir de una placa que contenía aproximadamente 50 colonias, haciendo un total de 15 cepas preseleccionadas que se les codificaron según su procedencia de la siguiente manera: 1A-1,1A-2, 1A-3, 1A-4, 1A-5, 2B-1, 2B-2, 2B-3, 2B-4, 2B-5, 3C-1, 3C-2, 3C-3, 3C-4, 3C-5.

4.5.2. Fase II: Detección de clones

Se realizó una fermentación individual con las 15 cepas aisladas en la fase I, con el fin de detectar clones o cepas diferentes. Los resultados fisicoquímicos de los productos de la fermentación se muestran en la tabla 4.7. De estos resultados obtenemos que las cepas 1A-1, 1A-2, 1A-3, 1A-4 y 1A-5, no presentan diferencias estadísticas a un nivel de significancia del 5%, lo hace que hace suponer que se tratan de clones.

Las cepas 2B-1, 2B-2, 2B-4 y 2B-5 se presume que son clones ya que no existe diferencia significativa al 5% con respecto a las propiedades fisicoquímicas (pH, acidez) pero la cepa 2B-3 difiere de las demás cepas presumiendo que se trata de una cepa diferente.

Las cepas 3C-2, 3C-3, 3C-4 y 3C-5 se presume que son clones y la cepa 3C-1 se trata de una cepa diferente a un nivel de significancia del 5% con respecto a las propiedades fisicoquímicas (pH, acidez).

La mejor alternativa para detectar clones o cepas diferentes es mediante la biología molecular, concretamente, el análisis de los perfiles de restricción del DNA mitocondrial (RFLP) cuyo DNA está altamente conservado para especies de un mismo género, pero que muestra alta variabilidad entre clones [31, 34]. Pero para el uso de esta técnica es necesario disponer de una gran cantidad de DNA de alta calidad; que en los ensayos no se logró debido a la técnica de extracción del DNA total que se utilizó, que se explica en la sección 4.6.1. Pero este inconveniente en cuanto a la no aplicación de la técnica RFLP del mtDNA en esta fase, no desmerece los criterios que se tomaron, sino que esta muy bien sustentada en el trabajo de Torija [31], quien determinó que al final de una serie de fermentaciones masivas a una temperatura de 30°C en la que se evaluaron 66 cepas, solo predominaba una cepa en mayor proporción (60%) y 3 cepas en menor proporción (13%), quedando las demás cepas totalmente rezagadas.

Con lo mencionado anteriormente y comparado con los resultados que se obtuvieron en la *fase II*, se puede afirmar que más de un clon fue aislado ya que los criterios que se tomaron como pH y acidez volátil que son características propias de cada cepa muestran valores comunes en cuanto a las cepas que se aislaron del fermentador 1A, 2B y 3C variando en una cepa en las dos últimas. Esto es un indicativo de que en el fermentador 1A, sólo una cepa se impuso hasta el final de la fermentación y en cuanto al fermentador 2B y 3C solo una cepa se impuso mayoritariamente mientras que otra cepa lo hizo en menor proporción.

Tabla 4.7: Fermentación individual de las cepas seleccionadas

Cepa	pH a 20°C	Acidez			Fenotipo Killer
		Total	Fija	Volátil	
		g/100mL Ac. sulfúrico	g/100mL Ac. sulfúrico	g/100mL Ac. acético	
1A-1	4,21	0,245	0,191	0,066	K ⁻ R ⁺
1A-2	4,22	0,251	0,179	0,088	K ⁻ R ⁺
1A-3	4,21	0,256	0,177	0,097	K ⁻ R ⁺
1A-4	4,22	0,250	0,181	0,084	K ⁻ R ⁺
1A-5	4,22	0,249	0,175	0,091	K ⁻ R ⁺
2B-1	4,37	0,250	0,186	0,078	K ⁻ R ⁺
2B-2	4,38	0,250	0,188	0,076	K ⁻ R ⁺
2B-3	4,43	0,235	0,172	0,077	K ⁻ R ⁺
2B-4	4,38	0,256	0,190	0,081	K ⁻ R ⁺
2B-5	4,38	0,245	0,195	0,061	K ⁻ R ⁺
3C-1	4,60	0,294	0,176	0,144	K ⁻ R ⁺
3C-2	4,31	0,272	0,190	0,100	K ⁻ R ⁺
3C-3	4,31	0,268	0,186	0,100	K ⁻ R ⁺
3C-4	4,30	0,279	0,188	0,111	K ⁻ R ⁺
3C-5	4,30	0,274	0,186	0,108	K ⁻ R ⁺

En cuanto al fenotipo killer se encontró que todas estas cepas eran neutras, lo cual es cierto ya que el fenotipo killer (K⁺R⁺) no está muy difundido en las fermentaciones espontáneas, predominando las cepas con fenotipo killer neutro (K⁻R⁺) y cepas de fenotipo killer sensible (K⁻R⁻) [36, 38]. Estos resultados en los que se obtuvieron cepas neutras, no es un indicativo de que el proceso de selección fue un fracaso sino que al ser estas cepas de fenotipo killer (K⁻R⁺) neutro, se asegura que estas no podrán ser desplazadas con facilidad en fermentaciones masivas. Además ya se ha comprobado que el fenotipo killer no es una característica imprescindible para cepas seleccionadas [29, 31].

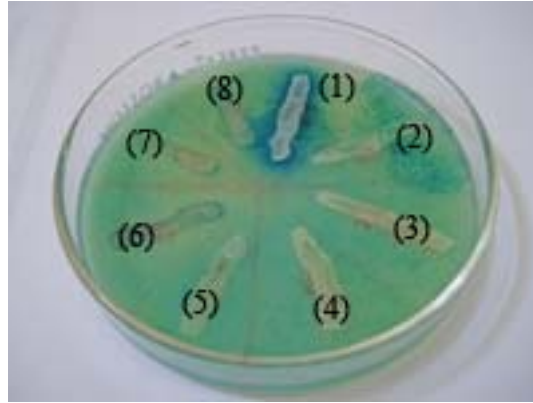


Figura 4.4 Evaluación del fenotipo killer de las cepas seleccionadas en césped sensible *Saccharomyces cerevisiae* IBIG-17 (K⁻R⁻) (1) *Candida tropicalis* IBIG16 (K⁺R⁺). (2) Cepa 1A-1, (3) Cepa 2B-1, (4) Cepa 2B-3, (5) Cepa 3C-5. (6, 7, 8) Otras cepas.

De los análisis de la *fase II* resultan 5 cepas diferentes pero solo se consideró a 4 cepas para las posteriores evaluaciones, dejando de lado a la cepa 3C-1 ya que su pH y acidez volátil elevado no dan crédito para ser una cepa seleccionada. Las cepas que se consideraron para las siguientes pruebas son 1A-1, 2B-1, 2B-3 y 3C-5.

4.6 Evaluación de las aptitudes fermentativas de las cepas preseleccionadas

(a) Tolerancia al etanol

Los resultados de la tolerancia al etanol se muestran en la figura 4.5, en donde se observa que la cepa 3C-5 es la más tolerante al etanol, alcanzando niveles de 4×10^7 cel/mL en el séptimo día a una concentración de etanol de 12,5% v/v, de modo que esta cepa fue considerada como "altamente tolerante al etanol", ya que según Villar [44] las cepas que son tolerantes por encima del 8% v/v son consideradas industrialmente dentro de la categoría de "*alta tolerancia al etanol*", por lo que esta cepa puede ser aplicada en las fermentaciones industriales.

Otra cepa que también es considerada como "altamente tolerante al etanol" es la cepa 2B-3 que alcanzó niveles de aproximadamente 2×10^7 cel/mL a una concentración de 12,5% v/v duplicando así su número inicial a esta concentración de etanol. Las cepas 1A-1 y 2B-1 resultan tolerantes a niveles del 10% v/v etanol, cuya tolerancia no es nada despreciable.

Además se puede observar en la figura 4.5 que al ir incrementando la concentración del etanol, la cantidad de células también va disminuyendo; esto es debido a la pérdida de las tasas de respiración y fermentación causada por las altas concentraciones de etanol presente en el medio [44] que interfieren con los componentes celulares como la membrana celular y enzimas (desnaturalización) [22].

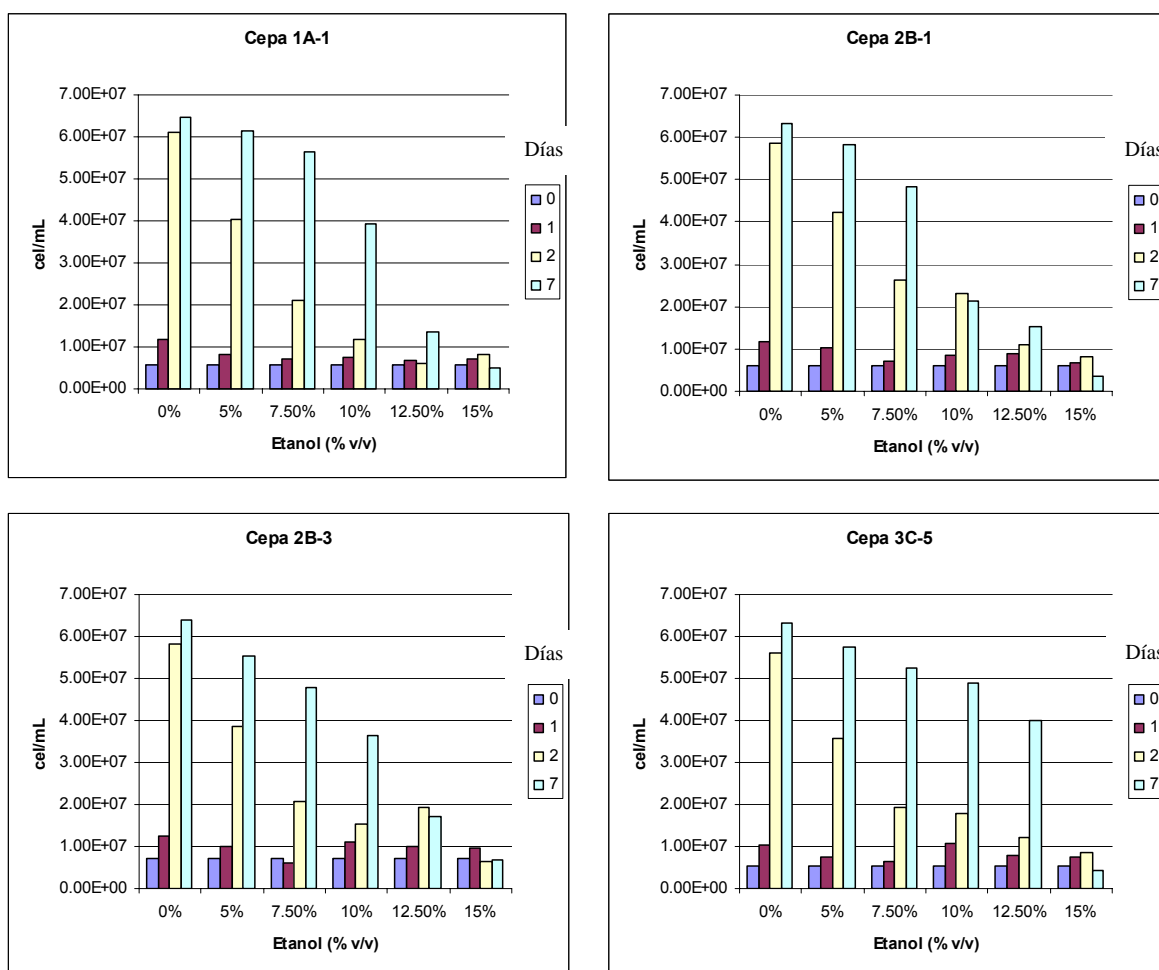


Figura 4.5: Resultados de la tolerancia al etanol de las cepas seleccionadas.

(b) Tolerancia a altas concentraciones de azúcar

Los resultados de la tolerancia a altas concentraciones de azúcar se muestran en la figura 4.6. De estos resultados se observa que la cepas 1A-1, 2B-3 y 3C-5 alcanzan poblaciones de 7×10^7 cel/mL a una concentración del 25% de azúcar; demostrando que estas cepas son altamente tolerantes a esta característica; por lo que pueden ser utilizadas fácilmente en fermentaciones vinitícolas; ya que la característica de estas fermentaciones se da hasta 220 g/L de azúcar [29, 31]. Esta característica está también relacionada a la producción de levaduras secas activas (LSA), dado que en la producción de estas LSA las levaduras son desarrolladas sobre melasas con alimentación progresiva que alcanza niveles de hasta del 50% (p/v) por lo que las células se ven expuestas a un ambiente altamente oxidante causado por su propio metabolismo respiratorio [48]. Entonces de nuestros resultados podemos asegurar que las cepas 1A-1, 2B-3, 3C-5 pueden ser utilizadas en la producción de LSA.

(c) Velocidad fermentativa

La determinación de la velocidad fermentativa se desarrolló a temperatura ambiente y sin agitación. En la figura 4.7 y tabla 4.8 se muestra que la cepa 2B-3 y la cepa 3C-5 son las que poseen mayor rapidez fermentativa, ya que dejaron como residuo 1,2 g/L y 2,8 g/L de glucosa respectivamente en un periodo de 65 horas (tabla 4.7). Por otro lado las cepas con menor velocidad fermentativa son 1A-1 y 2B-1 los que dejaron 10,8 g/L y 17,3 g/L glucosa como residuo en este mismo periodo. Estos resultados sugieren utilizar las cepas 2B-3 y 3C-5, lo cual no es cierto ya que la cantidad en que se consumen los nutrientes, en este caso la glucosa, no es evidencia de que se estén produciendo los metabolitos deseados tales como etanol o ésteres, porque cada cepa tiene rutas diferentes para los sustratos que se encuentren en su entorno [29]. Así que este parámetro de velocidad fermentativa solamente es un indicativo de la eficiencia con que se consumen los nutrientes del medio.

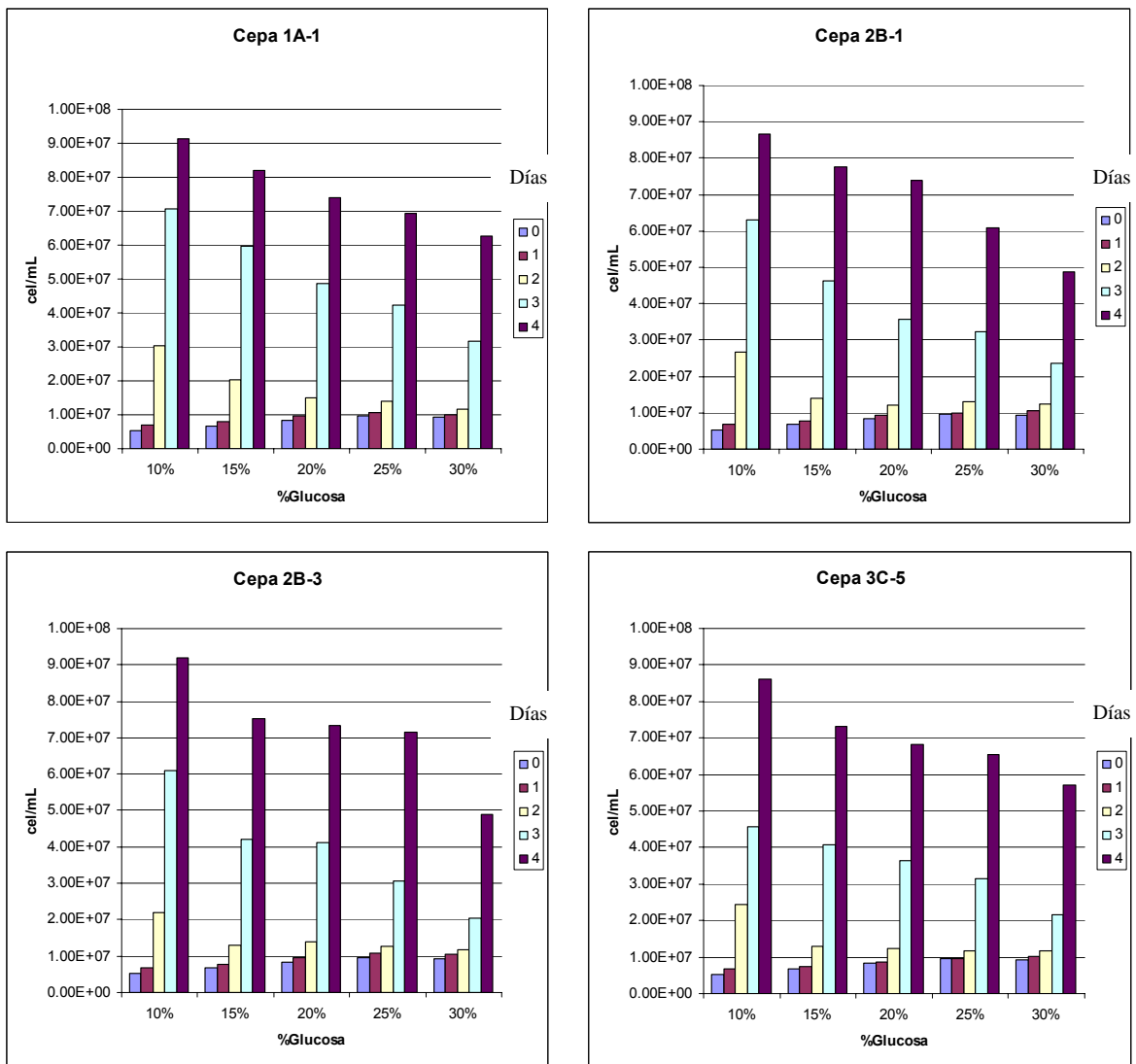


Figura 4.6: Resultados de la tolerancia a altas concentraciones de azúcar de las cepas seleccionadas.

Tabla 4.8: Velocidad fermentativa de las cepas seleccionadas

Tiempo (h)	g/L glucosa			
	1A-1	2B-1	2B-3	3C-5
0	220,3	220,3	220,3	220,3
25	173,2	171,9	164,7	165,4
40	118,4	125,8	89,7	109
65	10,8	17,3	1,2	2,8

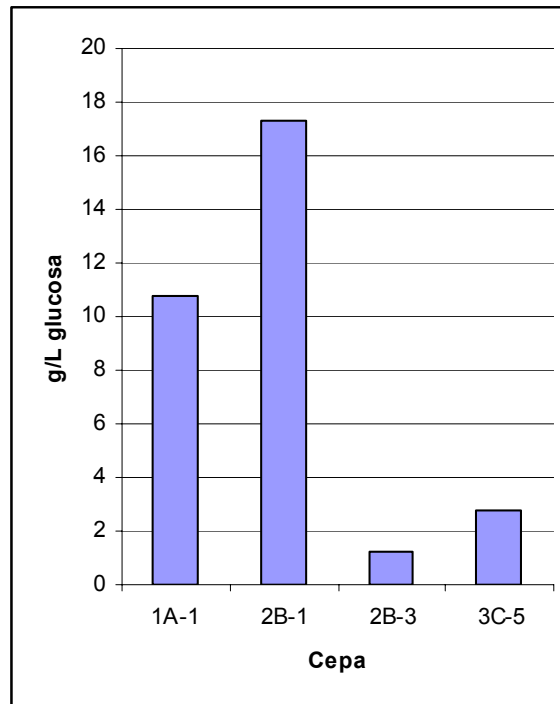


Figura 4.7: Velocidad fermentativa de las cepas seleccionadas. Azúcar residual g/L al final de la fermentación.

(d) Cinética de crecimiento a 15°C, 25°C y 35°C

La cinética de crecimiento a temperaturas de 15°C, 25°C y 35°C de las cepas 1A-1, 2B-1, 2B-3, 3C-5 se muestran en la figura 4.8. Esta prueba nos muestra claramente que la velocidad de crecimiento de las células y por ende el de la fermentación está en función a la temperatura. Es así que a una temperatura de 35°C se da la mayor tasa de crecimiento de las células en los primeros días para ir bajando conforme va transcurriendo la fermentación, hasta que en un momento dado la viabilidad de las células cae drásticamente debido a la acumulación de etanol que actúa en sinergia con la temperatura. Esto ocasiona que el estrés de la célula aumente drásticamente traduciéndose en la pérdida de viabilidad de estos [31, 48].

Se observa además, que a una temperatura de 15°C la velocidad de crecimiento de las células se da lentamente hasta alcanzar los niveles más altos de población. Esto es debido a que al ir creciendo lentamente a causa de la baja temperatura, las células atenúan su estrés, enfrentando la

situación extrema del medio en donde intervienen complejas rutas bioquímicas que es gobernada por los genes que posee cada cepa. [34]. También es de observar que a temperaturas de 15°C y 25°C las cepas en estudio presentaron una fase estacionaria lo que no ocurrió a 35°C.

Las cepas 2B-1 y 3C-5 presentan el mayor número de población a una temperatura de 25°C, lo que sugiere que a esta temperatura son eficientes en la fermentación y producción de biomasa. Mientras que las cepas 1A-1 y 2B-3 presentan poblaciones mayores a temperaturas de 15°C, lo que sugiere que estas cepas están acondicionadas para fermentar a temperaturas por debajo de 25°C.

Esta adaptación a altas o bajas temperaturas es debido a que estas cepas incrementan su tolerancia al etanol modificando la composición de ácidos grasos de sus membranas plasmáticas, evitando de esta manera que este solvente (alcohol) actué con los componentes celulares, por ejemplo las enzimas [17, 22, 31].

(e) Análisis físico químicos de los productos finales de la fermentación a 15°C, 25°C, 35°C.

Los análisis químicos de los productos finales se realizaron una vez acabado la fermentación para cada cepa, en donde los azúcares residuales presentaban niveles por debajo de 2 g/L partiendo de 100 g/L. Estos resultados se muestran en las tablas 4.9, 4.10, 4.11 y 4.12.

De los resultados de la tablas 4.9, 4.10, 4.11 y 4.12. se observa que la concentración de etanol va disminuyendo conforme aumenta la temperatura, este fenómeno ya lo había observado Torija [31] quien mencionó que esto se debía en gran parte a las temperaturas elevadas empleadas en la fermentación, en la que existe una mayor probabilidad de que el etanol se evapore; además justifica este hecho a la activación brusca del metabolismo de las levaduras a consecuencia de esta elevada temperatura, en la que se acelera la glucólisis, traduciéndose en una mayor

producción de piruvato, que en las primeras etapas de la fermentación no puede ser transformado a etanol porque las células presentan una actividad enzimática muy baja del piruvato descarboxilasa y del alcohol deshidrogenasa.

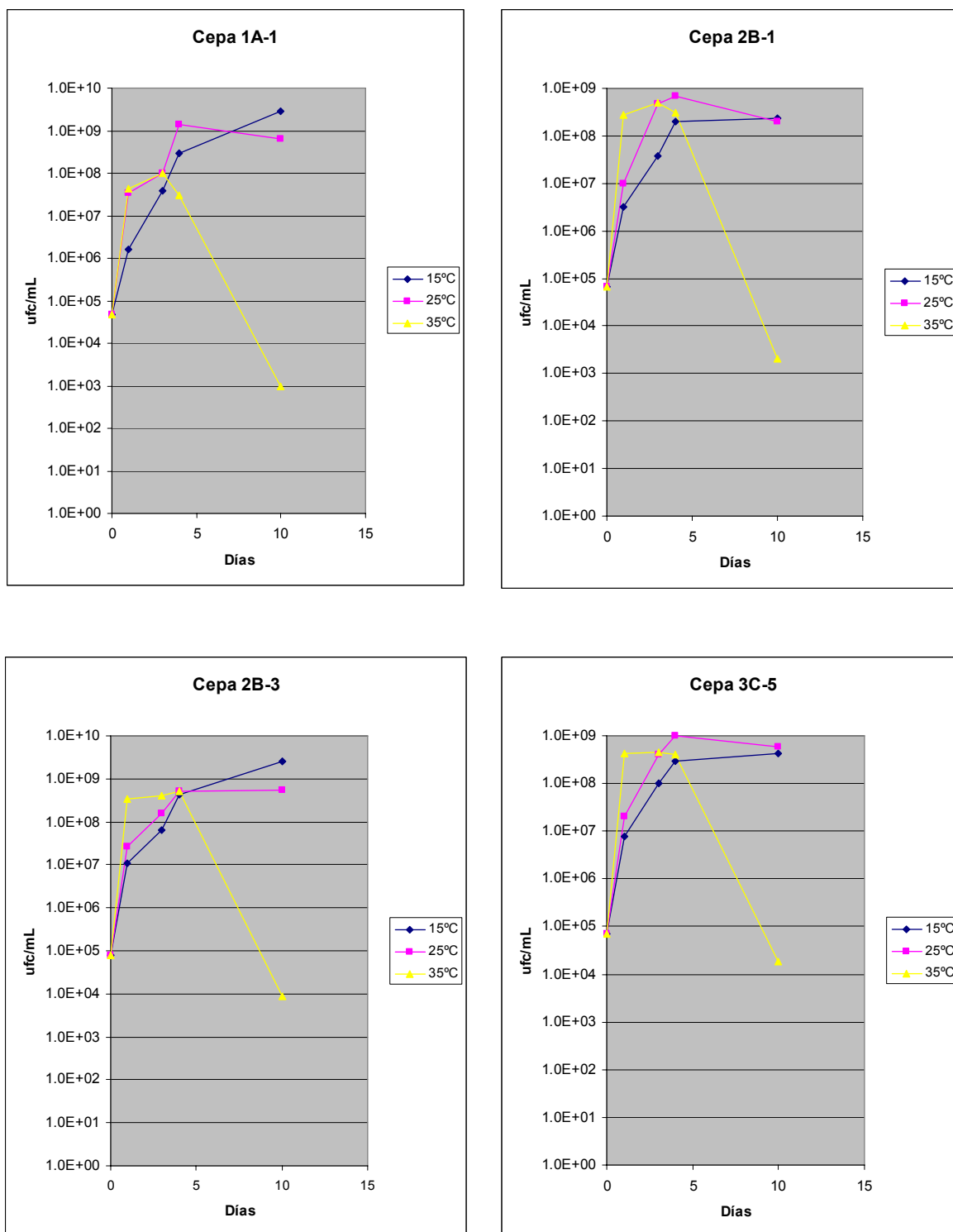


Figura 4.8: Resultados de la cinética de crecimiento a 15°C, 25°C y 35°C.

Tabla 4.9: Productos finales que dejó la cepa 1A-1 en la fermentación de mosto de jora.

	Temperatura		
	15°C	25°C	35°C
pH	4,13	4,20	4,25
Etanol (% v/v)	7,20	6,39	6,19
Etanol (g/L)	56,80	50,41	48,84
Acidez total (g/L Ac. sulfúrico)	2,65	2,65	1,96
Acidez Volátil (g/L Ac. acético)	1,02	1,14	0,36
Azúcares totales (g/L)	1,40	1,33	1,97
Rendimiento etanol %	58,55	51,97	50,35

Tabla 4.10: Productos finales que dejó la cepa 2B-1 en la fermentación de mosto de jora.

	Temperatura		
	15°C	25°C	35°C
pH	4,14	4,37	4,19
Etanol (% v/v)	6,29	6,02	5,63
Etanol (g/L)	49,59	47,53	44,40
Acidez total (g/L Ac. sulfúrico)	2,40	2,50	2,35
Acidez Volátil (g/L Ac. acético)	0,72	0,78	0,48
Azúcares totales (g/L)	1,51	1,00	1,20
Rendimiento etanol %	51,13	49,00	45,77

Tabla 4.11: Productos finales que dejó la cepa 2B-3 en la fermentación de mosto de jora.

	Temperatura		
	15°C	25°C	35°C
pH	4,42	4,20	4,19
Etanol (% v/v)	6,20	5,95	5,93
Etanol (g/L)	46,96	48,90	46,78
Acidez total (g/L Ac. sulfúrico)	2,70	2,35	2,45
Acidez Volátil (g/L Ac. acético)	0,90	0,78	0,36
Azúcares totales (g/L)	1,41	1,53	1,74
Rendimiento etanol %	50,42	48,42	48,22

Tabla 4.12: Productos finales que dejó la cepa 3C-5 en la fermentación de mosto de jora.

	Temperatura		
	15°C	25°C	35°C
pH	4,21	4,20	4,30
Etanol (% v/v)	7,44	6,09	5,52
Etanol (g/L)	58,74	48,03	43,58
Acidez total (g/L Ac. sulfúrico)	2,35	2,45	2,74
Acidez Volátil (g/L Ac. acético)	0,78	1,08	0,24
Azúcares totales (g/L)	1,30	1,31	1,42
Rendimiento etanol %	60,56	49,51	44,93

De las 4 cepas que se pusieron a prueba a estas temperaturas de fermentación, resalta claramente que las cepas 1A-1 y 3C-5 son las que mejor rendimiento presentan en cuanto a la producción de etanol.

En el caso de la acidez volátil se observa que a 35°C, todas las cepas producen cantidades mínimas de este compuesto en comparación a la que se produce a temperaturas de 15°C y 25°C. Este hecho parece ser al igual a lo que ocurre en la producción de etanol, en la que las rutas bioquímicas son afectadas por la activación brusca del metabolismo de la levadura. Pero la cepa que se comportaría mejor en una fermentación natural, en la que existe posibilidades de que ocurra subidas y bajadas extremas en las temperaturas, como es en el caso de nuestra zona, es la cepa 2B-1 quien producirá bajas cantidades de acidez volátil.

En cuanto al pH y la acidez total no presentan claras diferencias entre estas cepas respecto a la temperatura de fermentación.

4.7 Selección final de cepas de levadura en función a sus aptitudes fermentativas

En la tabla 4.13 se muestra la puntuación de las cepas que obtuvieron en cuanto a sus características relevantes. Las que mejor se adaptan para nuestros requerimientos son las cepas 2B-3 y 3C-5.

Tabla 4.13: Puntuación de las cepas en función a sus aptitudes fermentativas.

Cepa	Tolerancia al etanol	Tolerancia a concentraciones altas de azúcar	Velocidad fermentativa	Rendimiento etanol	Puntuación Total
1A-1	0	1	0	1	2
2B-1	0	0	0	0	0
2B-3	1	1	1	1	4
3C-5	1	1	1	1	4

4.8 Análisis sensorial

Los resultados del análisis sensorial de las cepas 2B-3 y 3C-5 se muestran en la tabla 4.14. El número de panelistas fue de 44.

Tabla 4.14: Resultados del análisis sensorial entre las cepas 2B-3 y 3C-5.

Pregunta			
1. ¿Hay diferencia entre las chichas?	Si : 42	No: 2	NS: 0
2. ¿Cuál es el más agradable en nariz?	2B-3: 31	3C-5: 11	NS: 0
3. ¿Cuál es el más aromático?	2B-3: 23	3C-5: 19	NS: 0
4. ¿Cuál prefieres?	2B-3: 27	3C-5: 14	NS: 1

De la tabla de test pareado para un nivel de significancia de 5% y 44 jueces se requiere de 28 jueces acierten para que exista diferencia significativa. (Amerine 1 956).

Según lo anterior se llega a las siguientes conclusiones:

- Que las cepas 2B-3 y 3C-5 otorgan productos diferentes en este caso *claro de chicha de jora*. Siendo ambas diferentes a una probabilidad del 95%.
- La cepa 2B-3 otorga aroma más agradable comparado con la cepa 3C-5 con una probabilidad del 95%.
- Tanto la cepa 2B-3 como la cepa 3C-5 tienen la capacidad de expeler cantidad de aromas a una probabilidad del 95%.
- En cuanto a preferencia ambas cepas son elegidas a una probabilidad del 95%.

4.6 Identificación molecular de las cepas seleccionadas

4.6.1 Aislamiento del DNA genómico de levaduras

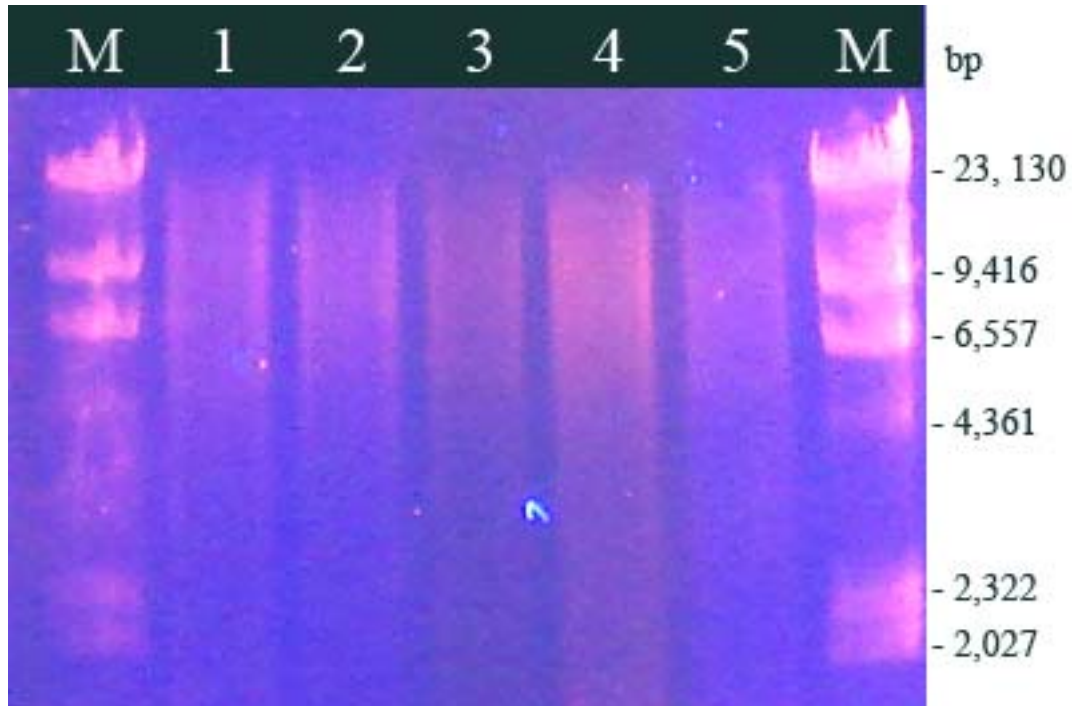


Figura 4.9: DNA genómico de cepas silvestres de levaduras aislados de chicha de jora del Valle del Mantaro visto en electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, (M) Marcador de peso molecular Lambda DNA/Hind III, (1) *Saccharomyces cerevisiae* IBIG 15, (2) Cepa 1A-1, (3) Cepa 2B-1, (4) Cepa 2B-3, (5) Cepa 3C-5.

En la figura 4.9 se muestran los resultados de la purificación de DNA de las cuatro cepas seleccionadas. Como se puede observar el DNA que se obtuvo fue de mala calidad, no por contaminación de RNA, sino que resultó muy degradado debido a que se utilizó nitrógeno líquido y fuerza mecánica para lisar la pared celular de las levaduras, que es el primer paso para toda extracción de DNA de microorganismos y cuyo método que se utilice para este fin será la que determine la cantidad y calidad de DNA a obtenerse [50]. Aun así se logró obtener un DNA con alto peso molecular que abarca de 6 557 pb hasta 23 000 pb y que puede ser utilizado sin problemas para amplificar la región ITS del rDNA, ya que su naturaleza multicopia hace de esta secuencia una región de fácil amplificación, aún cuando se utilicen muestras de DNA pequeñas, muy diluidas, o altamente

degradadas [51]. Pero para determinar el perfil de fragmentos de restricción (RFLP) del mtDNA resulta inadecuado ya que para esta prueba se requiere DNA de alta pureza y que incluya en la extracción el DNA mitocondrial (mtDNA) que presenta el polimorfismo necesario para la caracterización hasta el nivel cepa. En los estudios de caracterización de levaduras mediante RFLP del mtDNA siempre lisan la pared celular con zimoliasa una proteasa que proviene de *Artrobater luteos* [31 12, 29] que en este trabajo no se utilizó por motivos de disponibilidad y costos.

4.6.2 Amplificación de la región ITS mediante PCR

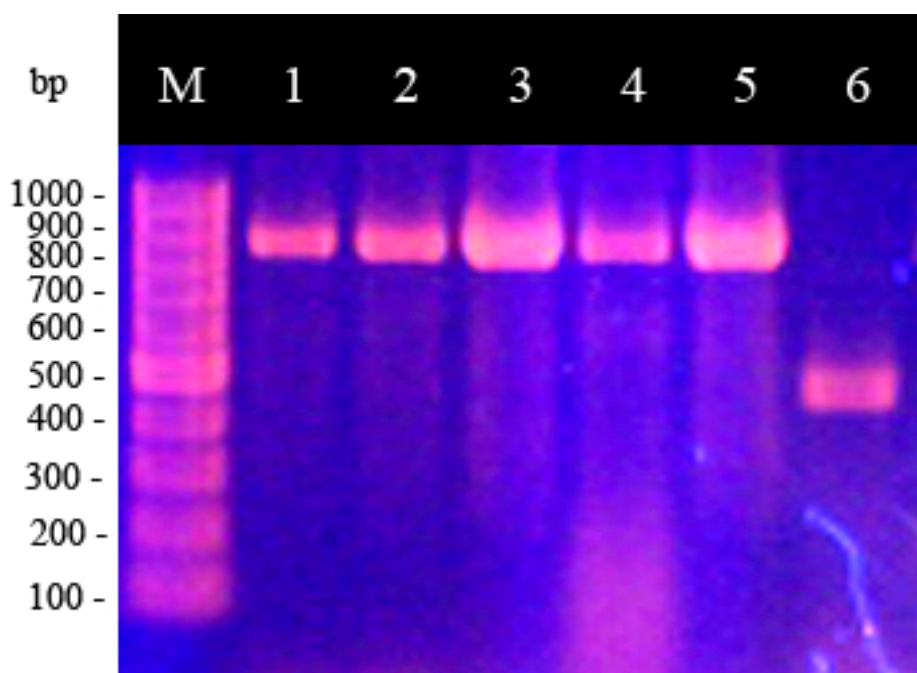


Figura 4.10: Productos de PCR de la Región ITS del rDNA. (M) Marcador de peso molecular 100bp DNA ladder, (1) *S. cerevisiae* IBIG 15, (2) Cepa 1A-1, (3) Cepa 2B-1, (4) Cepa 2B-3, (5) Cepa 3C-5, (6) Cepa de control negativo *Candida tropicalis* (K⁺R⁺)

La figura 4.10 muestra los amplificados de la región ITS (ITS1 – 5,8S rRNA – ITS2) que según los resultados que se obtuvieron comprende aproximadamente 850 pares de bases.

El tamaño de esta secuencia amplificada ITS del rDNA (850 pb) concuerda con la alojada en la base de datos de la NCBI [52] en donde se comprueba que la región ITS para la *S. cerevisiae* comprende de 843 pares de bases (figura 4.11). Ante este resultado ya es posible presumir que la especie de las cepas que fueron seleccionadas pertenecen a esta especie, ya que todas las cepas dieron el mismo tamaño del amplificado incluyendo la cepa patrón, más no la cepa negativa en donde se amplificó una región de 500 pares de bases aproximadamente.

```
TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGGATTTTTTTTGT
GGCAAGAGCATGAGAGCTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCTGCGCTTAA
GTGCGCGGTCTTGCTAGGCCTTGTAAGTTTCTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTT
TGTTATAGGACAATTAAAACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTCATATCTTTGCAACTTTTCT
TTGGGCATTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAACACAACAATTTTATCTATTCAATAAATTTTG
TCAAAAACAAGAATTTTCGTAACCTGGAAATTTTAAATATTA AAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTT
CTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCGGTGAATCATCGAA
TCTTTGAACGCACATGCGCCCTTGGTATTCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTTCAA
ACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTT
TTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTAC
CAACTGCGGCTAATCTTTTTTATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGA
ACAAATGTTCTTAAAGTTGACCTCAAATCAGGTAGGAGTACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGA
GGA
```

Figura 4.11: Región ITS1-ITS4 de la especie *Saccharomyces cerevisiae* incluyendo parte de los genes 18S rRNA y 26S rRNA. [52].

4.6.3 Análisis de los perfiles de restricción (RFLP) del DNA ribosomal

La figura 4.12 muestra los perfiles de restricción de la región ITS amplificada del rDNA generadas por las enzimas de restricción Hinf I, Hae III y Hha I. En la digestión con Hinf I se generaron 2 perfiles de corte los que corresponden aproximadamente a 110 pb y 380 pb, en la digestión con Hae III se generó 4 perfiles de corte que corresponden a 140 pb, 160 pb, 250 pb y 310 pb, en la digestión con Hha I se generó 2 perfiles de corte que corresponden a 150 pb y 400 pb.

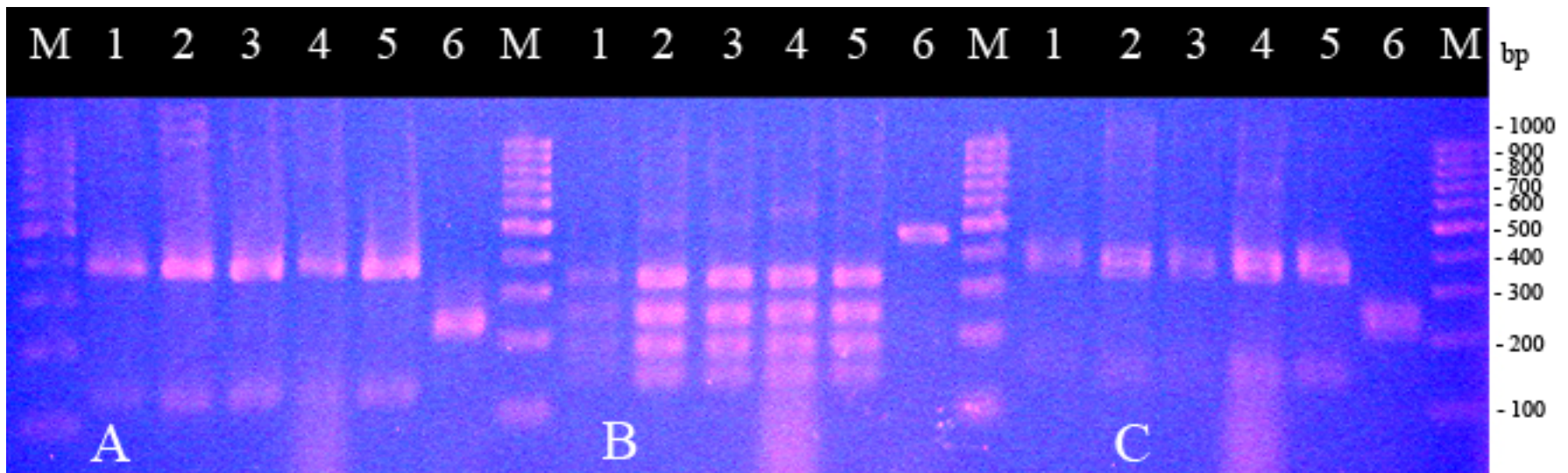


Figura 4.12: Perfil de restricción de la región amplificada ITS del rDNA generados por las enzimas A) Hinf I, B) Hae III y C) Hha I en gel de agarosa al 2,8%. (M) Marcador de peso molecular 100bp DNA ladder, (1) *S. cerevisiae* IBIG 15, (2) Cepa 1A-1, (3) Cepa 2B-1, (4) Cepa 2B-3, (5) Cepa 3C-5, (6) Cepa de control negativo *Candida tropicalis* (K^+R^+)

Este polimorfismo que se obtuvo con las tres enzimas de restricción demuestra que las cepas seleccionadas corresponden a la especie *Saccharomyces cerevisiae* ya que presentan perfiles de restricción semejantes comparada con la cepa patrón para cada enzima empleada. Además se puede demostrar que estas cepas pertenecen a la especie *S. cerevisiae* revisando la secuencia de nucleótidos del ITS del rDNA para esta especie en la base de datos de la NCBI [47] que se encuentra disponible gratuitamente y procesando esta información que se encuentra en formato FASTA mediante el software “Tacg” que se aloja en la página Web: <http://biotools.umassmed.edu/tacg/WWWtacg.php> en la que se simula los cortes con las enzimas empleadas (Hinf I, Hae III y Hha I) obteniendo perfiles de corte que se muestran en la figura 4.13.

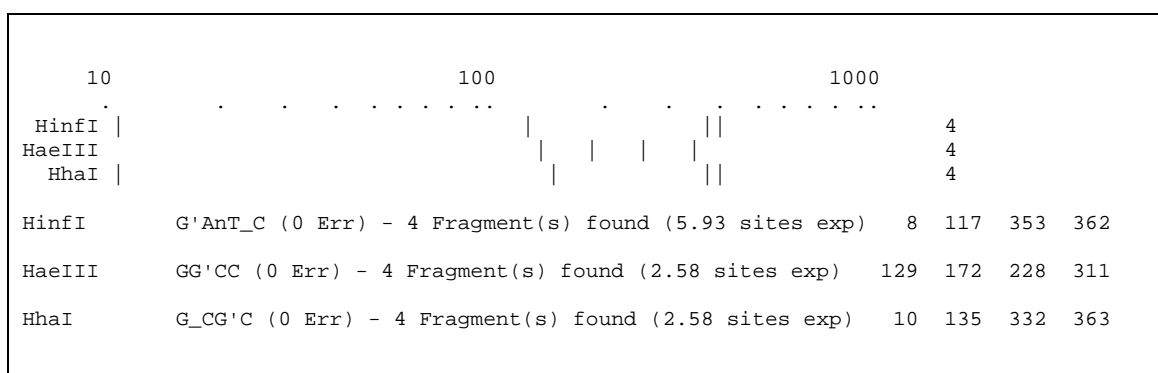


Figura 4.13: Perfiles de corte producidos por el software “Tacg” con las enzimas de restricción: *Hinf I*, *Hae III* y *Hha I*.

Analizando estos polimorfismos de corte producidos por este software, se determina que:

- La enzima Hinf I produce 4 cortes de 8 pb, 117 pb, 353 pb y 362 pb respectivamente
- La enzima Hae III produce 4 cortes de 129 pb, 172 pb, 228 pb y 311 pb respectivamente.
- La enzima Hha I produce 4 cortes de 10 pb, 135 pb, 332 pb y 363 pb respectivamente.

En el caso de la digestión de la enzima Hinf I de la región ITS que fue amplificada en este trabajo, solamente se pueden distinguir 2 perfiles de corte correspondiente a 117 pb y 362 pb, no detectándose el fragmento de 8 pb por ser un fragmento muy pequeño que se presume se perdió en el buffer de corrida, además el fragmento de 353 pb no puede diferenciarse del fragmento 362pb ya la diferencia entre estos es de solamente 9pb, en la que la concentración de agarosa del 2,8% empleada no ha sido suficiente para que se logre separar estos fragmentos necesitando un gel aún más concentrado al que se preparó (2,8%) o se procediera a correr estos fragmentos en geles de poliacrilamida con una concentración del 20% de acrilamida, a cuya concentración es posible apreciar rangos de pares de bases comprendidos entre 10 pb y 100 pb [50].

En cuanto a la digestión con la enzima Hae III, no presenta problemas para observar los fragmentos que se predijo mediante el software "*Tacg*" ya que los cortes con esta enzima son relativamente grandes de modo que pueden ser observados fácilmente en gel de agarosa al 2.8%.

En la digestión del Hha I de la región ITS predicha por el software, *Tacg*, no es posible observar el fragmento 10 pb por razones similares al que presenta la enzima Hinf I. En cuanto a los 3 fragmentos restantes se apreciaron, aunque con poca resolución en los fragmentos 332 pb y 363 pb, debido a la que la concentración del gel que no fue suficiente y sobre todo al tamaño próximo que presentan, habiendo una diferencia de 31 pb.

Comparando los resultados del perfil de corte de las 3 enzimas del ITS con el que se obtuvo con el software, se puede decir una vez más que efectivamente las cepas que se seleccionaron pertenecen a la especie *S. cerevisiae*.

V CONCLUSIONES

1. Se logró aislar un total de 150 cepas de levaduras de las cuales solo 33 cepas (22%) se identificaron presumiblemente como *S. cerevisiae* ya que presentaron una tolerancia al etanol por encima de 7,5% v/v.
2. Se logró preseleccionar seis cepas que se imponen en fermentaciones masivas y en condiciones muy restrictivas de temperatura (30°C) y concentración de azúcares (200g/L).
3. A partir de las evaluaciones fermentativas de las cepas impuestas en fermentaciones masivas se seleccionó las siguientes cepas de la especie *S. cerevisiae* para ser utilizada en la elaboración de chicha de jora y otras bebidas fermentadas.

Cepa codificada con el nombre de 2B-3 cuyas aptitudes fermentativas son:

- Fenotipo Killer neutro (K-R+)
- Tolerancia al etanol hasta el 10%v/v
- Tolerancia al azúcar hasta el 25% (p/v)
- Temperatura adecuada de fermentación entre los 15°C.

Cepa codificada con el nombre de 3C-5 cuyas aptitudes fermentativas son:

- Fenotipo Killer neutro (K-R+)
- Tolerancia al etanol hasta el 12,5%v/v
- Tolerancia al azúcar hasta el 30% (p/v)
- Temperatura adecuada de fermentación entre los 25°C.

4. Mediante la técnica molecular del RFLP del DNA ribosomal se pudo identificar el género y la especie de las seis cepas preseleccionadas las que pertenecen a la especie *Saccharomyces cerevisiae*.
5. No se pudo identificar hasta el nivel cepa mediante el método molecular RFLP del DNA mitocondrial de las cepas preseleccionadas, debido a la mala calidad de DNA que se obtuvo de estas cepas.

VI RECOMENDACIONES

1. Para la identificación de cepas impuestas en fermentaciones masivas es preferible utilizar la técnica del RFLP del DNA mitocondrial.
2. Para la amplificación de la región ITS del DNA ribosomal se puede partir de las propias colonias de levadura sin necesidad de extraer su DNA.
3. Para la obtención de DNA de calidad de levaduras para los ensayos de RFLP del DNA mitocondrial (mtDNA) utilizar enzimas que lisen la pared celular tales como la Zimoliasa y Liticasa. No se recomienda utilizar nitrógeno líquido.

VII REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. De Florio Ramírez E. Estudio de la fermentación de chicha de jora. [Tesis pre grado]. Tacna: Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias, Universidad Nacional Jorge Basadre; 1986.
2. Chuco Morales F. Determinación de diacetilo en la chicha de jora por cromatografía de gases y espectrofotometría. [Tesis pregrado]. Huancayo: Programa Académico de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Centro del Perú; 1971.
3. Gonzáles Duarte G. Estudio químico bromatológico de la chicha de jora elaborada en Catacaos y Sullana. [Tesis pre grado]. Lima: Facultad de farmacia y bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 1987.
4. Espinoza Rosales L. La chicha como bebida, algunos análisis. [Tesis pre grado]. Lima: Facultad de farmacia y bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 1936.
5. Hough S. Biotecnología de la cerveza y de la malta. Zaragoza: Acribia S.A.; 1990.
6. Manrique P. El maíz en el Perú. Lima: CONCYTEC; 1997.
7. Manrique Sáenz I. Flora microbiana de la chicha de jora. [Tesis pre grado]. Lima: Facultad de farmacia y bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 1978.
8. Collazos C, White P, White H, Viñas E, Alvistur E, Urquieta R, et al. La composición de alimentos peruanos. Lima: Ministerio de Salud Instituto Nacional de Nutrición; 1993.
9. Perú Profundo. Valle del Mantaro. [en línea]. Perú. [fecha de acceso 02de enero de 2008]. URL disponible en: <http://www.peruprofundo.com/valle/>

10. Eduardo J, Plasencia C. Región Junín. Huancayo: EDA; 2005.
11. Cabronero Fernandez C. Biotipado de levaduras de interés clínico: su utilidad como marcador epidemiológico y de virulencia. Madrid: Facultad de Ciencias Biológicas departamento de Microbiología I, Universidad Complutense de Madrid; 1993.
12. Martorell Guerola P. Desarrollo y aplicación de sistemas rápidos para la detección, identificación y caracterización de levaduras alterantes de alimentos. [Tesis doctorado]. Valencia: Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología y Ecología, Universitat de Valencia; 2006.
13. Zinsser M, Gang W, Willett H, Bernard D. Microbiología. 18a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 1985.
14. Mesas J, Alegre M. El papel de los microorganismos en la elaboración del vino. ALTAGA 1999, 2(4): 174-183.
15. Barnett J; Paine W, Yarrow D. A guide to identifying and classifying yeast. Cambridge: University Press; 1979.
16. Ingraham J, Ingraham C. Introducción a la microbiología. Barcelona: Reverté S.A.; 1997
- i
17. Leveau J, Bovix M. Microbiología industrial. Zaragoza: Acribia S.A; 2000.
18. Carrillo L. Microbiología agrícola. [en línea]. Perú: UNSA; 2007. [fecha de acceso 24 de noviembre de 2007]. URL disponible en: <http://www.unsa.edu.ar/matbib/micragri/micagricap7.pdf>
19. Departamento de microbiología II. Guía de prácticas de microbiología industrial. [en línea]. Madrid: Facultad de farmacia, Universidad Complutense; 2007. URL disponible en: http://www.ucm.es/info/mfar/pdfs/Guia_Indus.pdf

20. Lagos López F. Levaduras autoctonas aisladas en la comarca de Laujar de Andarax (Almería). Su influencia en la calidad. Granada: Facultad de Farmacia, departamento de nutrición y bromatología, Universidad de Granada; 1999.
21. Adrio Fondevila J. Obtención y caracterización de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* superproductoras de glutatión. [Tesis doctorado]. Granada: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Granada;
22. García G, Quintero R. Biotecnología Alimentaria. México: Limusa; 1993.
23. Madigan M, Martinko J, Parker J. Biología de los microorganismos. 8a. ed. Madrid: Prentice Hall; 2001.
24. González A, Valenzuela L. La levadura *Saccharomyces cerevisiae*: un modelo de estudio desde hace más de cien años. México: Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular. Universidad Nacional Autónoma De México; 2004.
25. Martínez Bono, B. La ruta de la proteína quinasa C en *Saccharomyces cerevisiae*. Conexiones con el control del ciclo celular. [Tesis doctorado]. Valencia: Departamento de bioquímica y biología molecular, Universidad de Valencia; 2006.
26. Rodríguez Pachón J. implicación de la proteína quinasa PAK Skm1 y de la GTPasa Cdc42 en procesos de crecimiento polarizado en *Saccharomyces cerevisiae*. [Tesis doctorado]. Madrid: Facultad de farmacia, Departamento de Microbiología II, Universidad complutense de Madrid; 2001.
27. Lehninger A. L. Bioquímica las bases moleculares de la estructura y función celular. 2a ed. Barcelona: Ediciones Omega, S.A. ; 1999

28. Microbiología industrial. Microbiología industrial. [en línea]. España: ANAVARRA, 2007. [fecha de acceso 12 de diciembre 2007] URL disponible en: <http://www.unavarra.es/genmic/micind-0.htm>.
29. Epifanio Fernández S. Influencia de la tecnología de vinificación en la microbiología y el desarrollo de la fermentación alcohólica. [Tesis doctoral]. Rioja: Universidad de la Rioja; 2005.
30. Las levaduras seleccionadas en enología. [en línea]. España: REGODON, [fecha de acceso 05 de febrero 2007] URL disponible en: <http://perso.wanadoo.es/e/regodon/marcos.htm>
31. Torija Martínez J. Ecología de Levaduras: Selección y adaptación a fermentaciones vínicas. [Tesis doctoral]. Tarragona: Facultat d'enologia de tarragona departament de bioquímica i biotecnologia, Universitat Rovira i Virgili; 2002.
32. Rodríguez L, Abad D, Casanova J, Lema C. Fenotipo killer: distribución en la comarca de la Riveira Sacra en las poblaciones de *Saccharomyces cerevisiae*. ALTAGA 1998, 2(1): 33-37.
33. Asociación Civil Sin Fines de Lucro. Las levaduras algo sobre ellas. [en línea]. Argentina; 2007. [fecha de acceso 10 de diciembre 2007] URL disponible: http://www.cervezas-argentinas.com.ar/Las_levaduras_algo_sobre_ellas.htm
34. Martorell Guerola, P. Desarrollo y aplicación de sistemas rápidos para la detección, identificación y caracterización de levaduras alterantes de alimentos. [Tesis doctoral]. Valencia: Departamento de biotecnología, Universitat de Valencia; 2006.
35. Orberá T. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. CEBI 2004. 21: 15-19.
36. Módulo experimental 12 aplicación de técnicas de biología molecular.

37. Mathews C, Holde K, Ahern K. Bioquímica. México: Prentice Hall; 2004.
38. White T, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungi ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols. A guide to methods and applications. San Diego Academic Press; 1990.
39. Carro D, Piña B. Identificación de cepas de levadura de interés enológico. CSIS. D Esorier
40. Querol A, Barrio E, Ramón D. A comparative study of different methods of yeast strain characterization. Syst. Appl. Microbiol 1999. 15: 439-446.
41. Guillamón J, Sabaté J, Barrio E, Cano J, Querol A. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. Arch. Microbiol 1998. 169, 387-392.
42. Araneda C. Apuntes de marcadores moleculares. [en línea] Universidad de Chile; [fecha de acceso 14 de abril 2007] URL disponible: <http://www.plataforma.uchile.cl/fg/semestre2/2004/biotec/modulo2/clase2/doc/marcadores.pdf>
43. Arquihuatl M, Pérez M. Manual de prácticas del laboratorio de microbiología general. México: Departamento de bioquímica, Universidad Autónoma Metropolitana; 2004.
44. Villar Moreno A. Sensibilidad a etanol en levaduras: bases fisiológicas y análisis de métodos empleados en su determinación. [Tesis Doctoral]. Madrid: Facultad de biología, Departamento de microbiología, UNIVERSIDAD Complutense; 1992.
45. ICMSF. Ecología microbiana de los alimentos I. vol 1. Zaragoza: Acribia; 1980.
46. Quillama Polo E. Técnicas para la selección de levaduras, bacterias lácticas de importancia en la industria alimentaria. Lima: Facultad de ciencias

biológicas, departamento académico de microbiología y parasitología, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2004.

47. Velásquez Milla M. Determinación de parámetros para la elaboración de jora a partir del maíz cancha de Huaraz (Terciopelo y rojo huarosanta). [Tesis pregrado]. Universidad Nacional Agraria La Molina; 1982.
48. Zuzuarregui Miró, A. Caracterización fisiológica y molecular de cepas vínicas de *Saccharomyces sp.* influencia en su comportamiento durante la vinificación. [Tesis Doctoral]. Valencia: Departamento de bioquímica y biología molecular, Universidad de Valencia; 2005.
49. Aenor. Análisis sensorial. Tomo I: Alimentación. Recopilación de normas. Madrid; 1997.
50. Ramírez P, García R, Alvarado D. Curso de genética microbiana – manual de prácticas. Lima: Facultad de ciencias biológicas, departamento académico de microbiología y parasitología, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2007.
51. Villalobos Arámbula A, Escobar Ibáñez M, Santerre A, Guzmán Huerta G, Guzmán Dávalos L, et al. Extracción de DNA y amplificación de secuencias de ITS en *psilocybe (Agaricales fungi)*. ISBN 2005. 548-553.
52. National Center Biotechnology Information. [en línea]. USA; 2008 [fecha de acceso 19 de diciembre 2007]. URL disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>