



Área  
**Enología y  
Biotecnología**  
de Fermentaciones  
**Facultad de Química**



**Facultad  
de Química**  
UDELAR - Uruguay



Desarrollo de una bebida fermentada a base de zarzamora

**Tesis de grado**

**Carolina Núñez Mendoza**

**Facultad de Química, UDELAR.  
Enología y Biotecnología de las Fermentaciones.  
Agosto 2025, Montevideo, Uruguay.**

## **Agradecimientos**

**Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas e instituciones que hicieron posible la realización de este trabajo.**

**A la Universidad de la República, por brindarme la oportunidad de formarme académicamente, y a toda la Cátedra de Enología, por los conocimientos transmitidos y el acompañamiento durante la carrera.**

**A mis tutoras, Karina Medina y Valentina Martín, por su acompañamiento, su dedicación y sus valiosos aportes a lo largo de todo el proceso.**

**A Florencia y Belén, por su enorme ayuda durante la etapa experimental, por su disposición, compromiso y compañerismo.**

**A Ana Gloria, quien generosamente nos abrió las puertas de su campo y colaboró con parte de su producción, haciendo posible el desarrollo de este proyecto.**

**A mis amigos, Lore, Romi, Leti, Bruno, Agustín, Leonel y Nicolás por darme el ejemplo académico y enseñarme que si se puede, aunque la vida sea compleja.**

**A mis compañeros y amigos de carrera, Leandro y Martín, por compartir este recorrido, por el apoyo mutuo.**

**A mi familia; a mi padre que siempre me apoyo en lo que sea que me proponga, a mis abuelos Gloria y Oscar y mis tios Diego, Hernán, por abrirme las puertas de su hogar para comenzar lo que fue la primera etapa Universitaria.**

**A mi madre que nunca dudó que este día llegaría.**

**A Guzmán, mi compañero de vida, a quien dedico un agradecimiento muy especial, por su apoyo incondicional, su paciencia y por ser un pilar fundamental durante todo este camino.**

**Finalmente, a todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron a la realización de este trabajo.**

**Muchas gracias.**

## Resumen

La zarzamora (*Rubus spp.*) es una fruta con alto contenido de azúcares, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante, lo que la convierte en un recurso atractivo para la elaboración de bebidas fermentadas. En este estudio se evaluó la fermentación de mosto de zarzamora con tres especies de levaduras: *Saccharomyces cerevisiae* (SC), *Lachancea thermotolerans* (LT) y *Hanseniaspora vineae* (HV), comparando parámetros fisicoquímicos, capacidad antioxidante y atributos sensoriales.

El mosto inicial presentó condiciones favorables para la fermentación (pH 3.10; 9 °Brix; 10.48 g/L de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  de acidez total y 262.52 mg/L YAN).

En valores absolutos la fermentación realizada con SC alcanzó la mayor producción de etanol, mientras que LT mostró valores intermedios y HV produjo las menores concentraciones de etanol, aunque aportó mayor diversidad aromática.

El contenido de polifenoles varió entre 2.11 y 3.61 mg GAE/mL, siendo mayor en los fermentos con HV y SC, y significativamente menor en las fermentaciones con LT. La capacidad antioxidante (ABTS) se encontró dentro de lo esperado para bebidas de frutas.

Sensorialmente, HV se destacó por su intenso color rojo, mayor cantidad de aromas florales y frutales, SC mostró perfiles equilibrados, pero con algunas menciones negativas, mientras que LT presentó fermentaciones microbiológicamente estables debido a su pH bajo aunque menos expresivas.

En conclusión, la cepa de levadura empleada influye significativamente en la calidad de los fermentados de zarzamora. SC garantiza fermentaciones completas, HV potencia la complejidad aromática y fenólica, y LT aporta estabilidad microbiológica, lo que evidencia el potencial de esta fruta para el desarrollo de bebidas diferenciadas con valor agregado.

## ÍNDICE

### Índice

|                                                                                   |               |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>1. Introducción .....</b>                                                      | <b>pág 7</b>  |
| <b>1.1 Marco teórico .....</b>                                                    | <b>pág 8</b>  |
| <b>1.1.1 Caracterización fisicoquímica de la zarzamora .....</b>                  | <b>pág 8</b>  |
| <b>1.1.2 Propiedades fisicoquímicas de frutos silvestres de <i>Rubus</i>.....</b> | <b>pág 8</b>  |
| <b>1.1.3 Condiciones climáticas para el cultivo de zarzamora .....</b>            | <b>pág 9</b>  |
| <b>1.1.4 Zarzamora en Uruguay .....</b>                                           | <b>pág 9</b>  |
| <b>1.1.5 Composición química de la zarzamora .....</b>                            | <b>pág 10</b> |
| <b>1.1.6 Fermentación alcohólica .....</b>                                        | <b>pág 12</b> |
| <b>1.2 Antecedentes de fermentación alcohólica con zarzamora .....</b>            | <b>pág 14</b> |
| <b>1.3 Justificación .....</b>                                                    | <b>pág 15</b> |
| <b>2. Objetivos .....</b>                                                         | <b>pág 16</b> |
| <b>2.1. Objetivo general .....</b>                                                | <b>pág 16</b> |
| <b>2.2. Objetivos específicos .....</b>                                           | <b>pág 16</b> |
| <b>3. Materiales y métodos .....</b>                                              | <b>pág 16</b> |
| <b>3.1 Mosto .....</b>                                                            | <b>pág 16</b> |
| <b>3.1.1 Cosecha y realización del mosto .....</b>                                | <b>pág 16</b> |
| <b>3.1.2 Determinaciones realizadas al mosto .....</b>                            | <b>pág 18</b> |
| <b>3.1.2.1 pH .....</b>                                                           | <b>pág 18</b> |
| <b>3.1.2.2 Temperatura .....</b>                                                  | <b>pág 18</b> |
| <b>3.1.2.3 Contenido de Azúcar .....</b>                                          | <b>pág 18</b> |
| <b>3.1.2.4 Siembra en WLN .....</b>                                               | <b>pág 18</b> |
| <b>3.1.2.5 Nitrógeno disponible .....</b>                                         | <b>pág 18</b> |
| <b>3.1.2.6 Inóculo .....</b>                                                      | <b>pág 18</b> |
| <b>3.1.2.7 Microfermentaciones .....</b>                                          | <b>pág 19</b> |

|                                                                                                  |        |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 3.1.2.8 Acidez total .....                                                                       | pág 20 |
| 3.2 Bebida fermentada de zarzamora .....                                                         | pág 20 |
| 3.2.1 pH .....                                                                                   | pág 20 |
| 3.2.2 Acidez Total .....                                                                         | pág 20 |
| 3.2.3 Acidez volátil .....                                                                       | pág 20 |
| 3.2.4 Polifenoles totales .....                                                                  | pág 21 |
| 3.2.5 Actividad antioxidante .....                                                               | pág 22 |
| 3.2.6 Alcohol .....                                                                              | pág 22 |
| 3.2.7 Azúcares y glicerol .....                                                                  | pág 23 |
| 3.2.8 Color .....                                                                                | pág 23 |
| 3.2.9 Evaluación sensorial .....                                                                 | pág 24 |
| 3.2.10 Análisis estadístico.....                                                                 | pág 24 |
| 4. Resultados y discusión .....                                                                  | pág 26 |
| 4.1 Mosto .....                                                                                  | pág 26 |
| 4.1.1 Caracterización del mosto inicial de zarzamora .....                                       | pág 26 |
| 4.1.2 Cinética de fermentación .....                                                             | pág 27 |
| 4.2 Fermentos .....                                                                              | pág 28 |
| 4.2.1 Acidez total .....                                                                         | pág 28 |
| 4.2.2 Acidez volátil .....                                                                       | pág 28 |
| 4.2.3 Polifenoles totales por Folin-Ciocalteu .....                                              | pág 30 |
| 4.2.4 Capacidad antioxidante de bebidas fermentadas de zarzamora por el método ABTS (TEAC) ..... | pág 30 |
| 4.2.5 Azúcares .....                                                                             | pág 31 |
| 4.2.6 Alcohol .....                                                                              | pág 31 |
| 4.2.7 Glicerol .....                                                                             | pág 32 |

|                                      |               |
|--------------------------------------|---------------|
| <b>4.2.8 Color .....</b>             | <b>pág 32</b> |
| <b>4.2.9 Análisis sensorial.....</b> | <b>pág 33</b> |
| <b>5. Conclusiones.....</b>          | <b>pág 35</b> |
| <b>6. Bibliografía.....</b>          | <b>pág 38</b> |
| <b>7. Anexos.....</b>                | <b>pág 44</b> |

## 1. Introducción

Los alimentos fermentados son aquellos cuyo procesamiento involucra el crecimiento y la actividad metabólica de microorganismos, los cuales inducen transformaciones físicas, químicas y sensoriales en las materias primas (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Existen una gran variedad de alimentos fermentados distribuidos a nivel mundial, con características y procesos productivos diversos (Fugelsang & Edwards, 2007).

Algunos de ellos, como la cerveza, el vino, el vinagre, los quesos y el pan, han sido extensamente estudiados; se han aislado los microorganismos responsables de los cambios deseados durante el proceso fermentativo y se consumen de forma generalizada en distintas regiones del mundo (Enología y Biotecnología de las fermentaciones, 2022). Existen, sin embargo, numerosos alimentos fermentados que se producen de manera regional y que no son ampliamente conocidos fuera de su lugar de origen. Estos productos forman parte importante de la dieta de diversos grupos étnicos y se elaboran mediante métodos tradicionales que suelen ser sencillos, económicos, no requieren equipamiento complejo y emplean materias primas disponibles y de bajo costo (Tamang et al., 2020). El género *Rubus* comprende un amplio grupo de especies distribuidas en distintas regiones del mundo, incluyendo frambuesas y zarzamoras, las cuales poseen gran importancia agrícola y alimentaria (Hall et al., 2005; Antunes et al., 2014). Como miembros representativos de este género se encuentran las frambuesas y las zarzamoras, conocidas por sus frutos comestibles, los cuales se clasifican como polidrupas, ya que están formados por agregados de pequeños frutos carnosos denominados drupelas, cada una de ellas con su respectiva semilla, reunidas alrededor de un eje común (Ibáñez et al., 2006; Ruiz, 2023).

En estadios inmaduros, las drupelas suelen presentar coloración verde y, a medida que avanza el proceso de maduración, adquieren tonalidades rojizas hasta alcanzar un color morado intenso y brillante en el caso de las zarzamoras, asociado a la acumulación de compuestos fenólicos, principalmente antocianinas (Antunes et al., 2014; Garzón, 2008).

Principalmente se desarrollan en zonas frías y templadas de América, Europa, norte de África y noroeste de Asia, considerando a China el lugar donde se concentra la mayor diversidad de especies de *Rubus* en el mundo (Graham et al., 2011). En general, las zarzamoras son consideradas como especies con amplia capacidad de adaptación a condiciones ambientales, por lo que, algunas son catalogadas como hierba invasiva, promoviendo su eliminación y amenazando la pérdida de especies silvestres (PF. Rev. Mex. Cienc. Agríc, 2019).

## 1.1 Marco teórico

### 1.1.1 Caracterización fisicoquímica de la zarzamora

Las bebidas derivadas de la utilización de zarzamoras como materia prima, tales como jugos y licores son bastante frecuentes, aunque no lo son tanto en nuestro país. Consumido en fresco, el fruto, aporta una gran cantidad de vitaminas A, B y C y minerales como el hierro, magnesio y calcio entre otros, como se observa en la tabla 1 (Agromática, 2023).

Tabla 1. Composición nutricional en 100 gramos de zarzamora congelada (*Rubus fruticosus*)

| Componente          | Contenido | Componente                     | Contenido |
|---------------------|-----------|--------------------------------|-----------|
| Energía (Kcal)      | 59,000    | Vitamina A Equiv. Totales (µg) | 39,000    |
| Agua (g)            | 85,600    | Vitamina B6 (mg)               | 0,061     |
| Proteína (g)        | 0,700     | Ácido pantoténico (mg)         | 0,150     |
| Nitrógeno (g)       | 0,189     | Vitamina C (mg)                | 21,000    |
| Lípidos (g)         | 0,600     | Sodio, Na (mg)                 | 1,000     |
| Carbohidratos (g)   | 12,600    | Potasio, K (mg)                | 196,000   |
| Fibra dietética (g) | 2,700     | Calcio, Ca (mg)                | 32,000    |
| Cenizas (g)         | 0,500     | Magnesio, Mg(mg)               | 22,000    |
| Tiamina (mg)        | 0,029     | Fósforo, P (mg)                | 21,000    |
| Riboflavina (mg)    | 0,046     | Hierro, Fe (mg)                | 0,500     |
| Niacina (g)         | 1,200     | Cobre, Cu (mg)                 | 0,120     |
| Tiamina (mg)        | 0,029     | Manganeso, Mn(mg)              | 0,500     |
| Riboflavina (mg)    | 0,046     | Hierro, Fe (mg)                | 0,120     |
| Niacina (g)         | 1,200     | Cobre, Cu (mg)                 | 0,120     |

Fuente: FAO (2002).

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) (2002). *Composición de alimentos. Manual de referencia revisado*. FAO. <https://www.fao.org/3/y4709s/y4709s00.htm>

En los últimos tiempos se ha tenido un especial interés en los frutos de la zarzamora, debido al aporte de polifenoles representado fundamentalmente por antocianinas, taninos, flavonoides, que se encuentran principalmente en la piel y semillas (Skrovankova et al., 2015). Estos actúan como antioxidantes naturales, neutralizando radicales libres (Martínez, 2017).

### 1.1.2 Propiedades fisicoquímicas de frutos silvestres de *Rubus*

Nombre de la Zarzamora: *Rubus* sp.

La zarzamora pertenece al género *Rubus* sp. y guarda más relación con la frambuesa que con la mora de morera, compartiendo todas el mismo género. El género *Rubus* es extensísimo. En principio, conocemos la frambuesa y zarzamora, aunque existen más de 250 especies dentro del género (Finn, 2008). Dichas plantas tienen una gran capacidad de hibridación y propagación. Algunas pueden generar semillas sin necesidad de ser polinizadas (Agromática, 2023). El género *Rubus* está presente en todos los continentes. Aunque sean muy similares a la frambuesa, una diferencia importante es que la zarzamora sólo tiene una cosecha anual y la frambuesa puede tener dos (Strik et al., 2007). Otra de las ventajas de esta fruta es su temprana capacidad de producción. Los frutales tardan entre 5 y 7 años en llegar al óptimo de producción, y algunos incluso más. La zarzamora puede llegar al óptimo en el segundo año por lo que los costos de implantación se ven muy reducidos, y es una ventaja desde el punto de vista productivo (Agromática, 2023).

### 1.1.3 Condiciones climáticas para el cultivo de zarzamora

Las zarzamoras (*Rubus* sp.) prosperan en climas templados y húmedos, donde el equilibrio térmico estival y las horas de frío invernales son determinantes para una fructificación adecuada. Aunque toleran breves picos de calor durante el verano, temperaturas sostenidas elevadas o déficits hídricos prolongados pueden afectar negativamente el tamaño y la calidad del fruto (Antunes et al., 2014). Asimismo, el requerimiento de frío invernal entre 200 y 800 horas por debajo de 7 °C, según el cultivar es esencial para romper la latencia de las yemas y garantizar un buen rendimiento (Hall et al., 2005). En respuesta a la expansión de la fruticultura hacia regiones cálidas o subtropicales, se han desarrollado cultivares de bajo requerimiento de frío y de fructificación en brotes vegetativos del año en crecimiento lo que permite una mayor adaptación a estas condiciones (Hall et al., 2005).

### 1.1.4 Zarzamora en Uruguay

Desde el año 1980 el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA), ha estado estudiando estos frutos, por lo que ha generado información nacional respecto a la adaptación de especies y sus variedades, aspectos relevantes de su fisiología, así como de los protocolos para la multiplicación masiva de plantas in vitro en la Unidad de Biotecnología, y el manejo de suelo y plantas (INIA, Serie de Actividades de Difusión No. 286, 2002).

A través de INIA, en el año 1987 se introdujeron en el Uruguay, variedades de zarzamora y boysenberry (híbrido zarzamora-frambuesa). En el año 1990, se comenzó el estudio de los protocolos de propagación masiva in vitro para estas especies, generando plantas para su observación en granjas. Se seleccionaron y difundieron a partir del año 1993 las zarzamoras Tupí (Variedad resultante de una cruce entre Comanche y una selección nativa de Uruguay) (Rivas, 2016) y variedad Negrita mediante

plantas obtenidas por cultivo in vitro. Otras variedades propagadas, fueron Thomless y Ebano (Soria, 2002). Fueron realizados los primeros estudios sobre estas frutas como materia prima en la elaboración de yogures con la empresa Lacteria S.A. (1992). Existe actualmente demanda nacional por esta materia prima (bloques congelados de pasta de zarzamora boysenberry) para la elaboración de productos lácteos (principalmente yogurt y helados), la cual en buena parte se importa de Chile. Salvo casos aislados, no se ha expandido el cultivo de zarzamora y boysenberry y existe demanda por estas frutas para el consumo en fresco (Soria, 2002).

### 1.1.5 Composición química de la zarzamora

El fruto de la zarzamora se destaca por su color, aroma, sabor, textura y por su fuente de pigmentos; entre ellos las antocianinas que son excelentes antioxidantes (Cerón, 2008).

Las antocianinas son compuestos colorantes de origen vegetal, responsables de una variedad de colores que van desde el rojo hasta el azul de muchas frutas, vegetales y cereales. Estos pigmentos han captado considerable interés debido a sus potenciales beneficios para la salud humana, que incluyen la disminución de enfermedades cardíacas, propiedades anticancerígenas, antitumorales, antiinflamatorias y antidiabéticas, mejoras en la agudeza visual y la función cognitiva (Garzón, 2008). Las propiedades bioactivas de las antocianinas ofrecen nuevas oportunidades para desarrollar productos con valor añadido para el consumo humano (Garzón, 2008).

Las antocianinas son glucósidos de las antocianidinas, es decir, son antocianidinas (aglicona) unidas a un azúcar por enlace  $\beta$ -glucosídico. Las agliconas están compuestas por el ión flavilio, como se muestra en la figura 1, también llamado 2-fenil-benzopirilio (Khoo et al., 2017), que consta de los grupos aromáticos: benzopirilio y un anillo fenólico; el flavilio normalmente funciona como un catión (Badui, 2006).

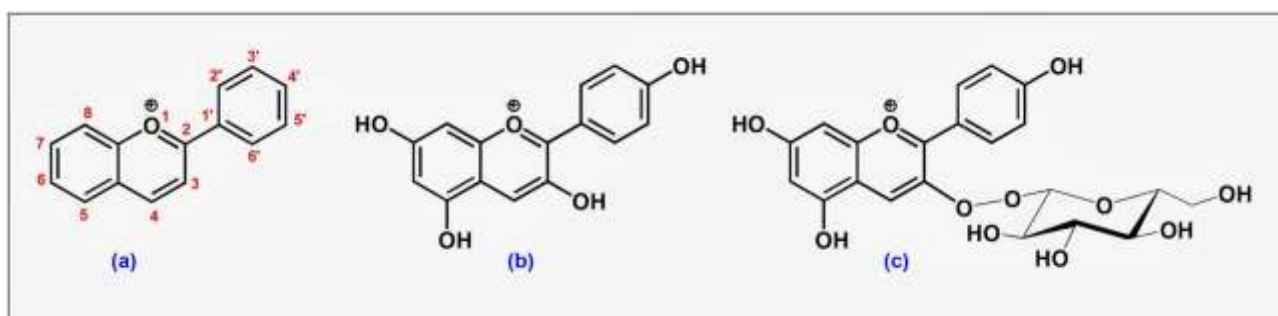


Figura 1. (a) Catión flavilio: estructura general y numeración; (b) Pelargonidina (antocianidina); (c) Pelargonidina-3-O-glucósido (antocianina). Figura extraída de UBUScientia, Autor del artículo: Espino, G (2014) (Universidad de Burgos).

No suelen existir agliconas libres, salvo alguna traza, producto de la degradación. De las aproximadamente 20 antocianidinas que se conocen, las más importantes son: pelargonidina, delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina (se muestra la estructura en la figura 2). Estas combinadas con azúcares diferentes generan unas 150 antocianinas (Khoo et al., 2017). Los azúcares más comunes encontrados en estos casos son la glucosa y la ramnosa, le siguen la galactosa, xilosa y la arabinosa, y ocasionalmente, la gentobiosa, la rutinosa y la soforosa (Espino, 2014).

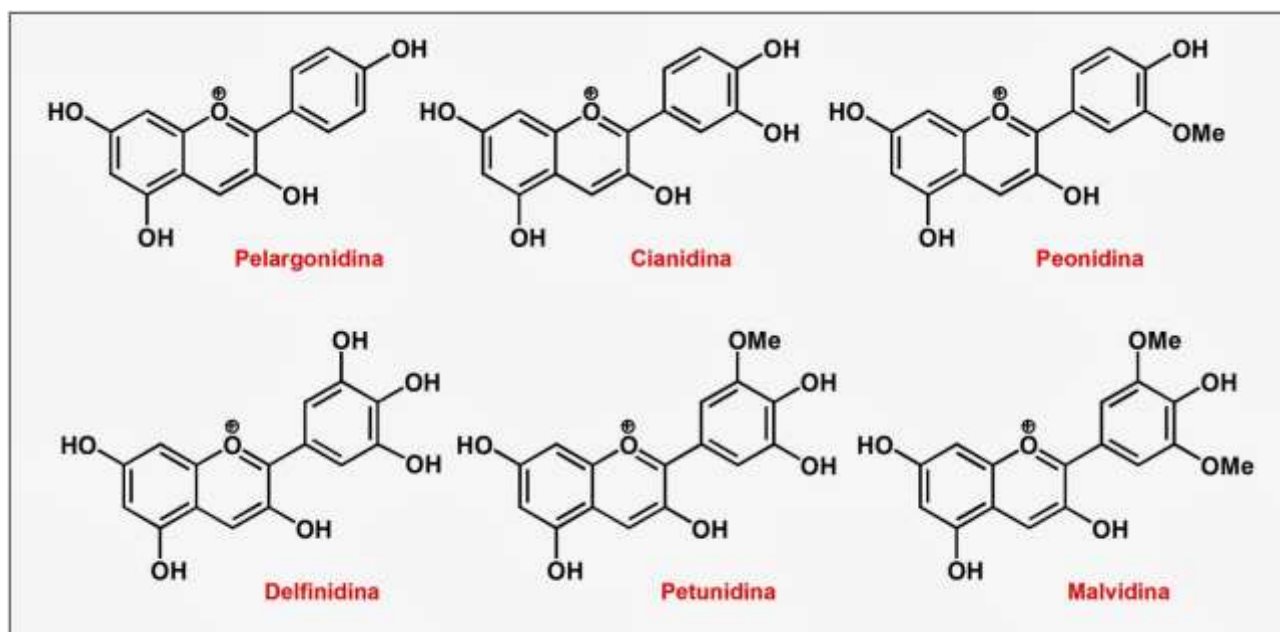


Figura 2, extraída de UBUScientia, Autor del artículo: Espino, G (2014) (Universidad de Burgos).

El color de las antocianinas depende de varios factores, como los sustituyentes químicos y su posición en el grupo flavilio; por ejemplo, si se aumentan los hidroxilos del anillo fenólico se intensifica el color azul, y la introducción de metoxilos provoca la formación del color rojo (Badui, 2006). Existen estudios que presentan evidencia contundente que los extractos ricos en antocianinas pueden mejorar la agudeza visual, mostrar actividad antioxidante, atrapar radicales libres y actuar como agentes quimioprotectores. Las antocianinas también tienen propiedades antidiabéticas como control de lípidos, secreción de insulina y efectos vasoprotectores (Aguilera, 2011).

En un estudio realizado por Hernández et al (2016), en el fruto de zarzamora, licores y mermeladas del fruto, determinó la presencia de alcaloides y flavonoides en las tres muestras. Para los primeros dos productos. En particular para las antocianinas se observa una concentración mayor en los productos elaborados respecto al contenido del fruto; y el contenido de flavonoides es más alto en el licor de zarzamora, en comparación con el fruto y la mermelada.

Tabla 2 Antocianinas y flavonoides en zarzamora y productos derivados (Hernández et al., 2016).

| Muestra            | Antocianinas <sup>a</sup> | Flavonoides totales <sup>b</sup> |
|--------------------|---------------------------|----------------------------------|
| Fruto de zarzamora | 16.199 ± 0.77             | 70.517 ± 3.69                    |
| Licor              | 24.938 ± 0.26             | 99.850 ± 1.32                    |
| Mermelada          | 75.539 ± 0.51             | 50.017 ± 3.40                    |

<sup>a</sup> Expresados en mg/L ; <sup>b</sup> expresados en mg EQ/100g

Los valores representan la media y la desviación estándar.

La tabla 2 muestra los resultados de la determinación de la concentración de antocianinas y flavonoides totales en muestras de frutos de zarzamora, mermelada y licor artesanal de Atecáxil, Ixhuacán de Los Reyes, Veracruz (Hernández et al., 2016).

### 1.1.6 Fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica es un proceso originado por la actividad de levaduras que procesan los hidratos de carbono, tales como glucosa, sacarosa, fructosa, maltosa, para obtener como productos finales etanol, dióxido de carbono y ATP (adenosín trifosfato). Es uno de los posibles destinos catabólicos del piruvato producido en la glucólisis (proceso de 10 pasos donde una molécula de glucosa da como producto entre otros intermediarios, 2 piruvatos) (Nelson y Cox, 2017).

En la reacción actúa como catalizador la enzima piruvato descarboxilasa, dando una reacción irreversible. Dicha enzima necesita  $Mg^{2+}$  y la coenzima tiamina pirofosfato para funcionar. Se libera dióxido de carbono y queda como producto intermedio el acetaldehído. En el paso dos, el acetaldehído se reduce a etanol por acción de la enzima alcohol deshidrogenasa, mediante el poder reductor obtenido del NADH (Nicotinamida adenina dinucleótido) (Nelson y Cox, 2006).

En la reacción para producir etanol, actúa la enzima alcohol deshidrogenasa; un  $Zn^{2+}$  en el sitio activo polariza el oxígeno carbonílico del acetaldehído, lo que permite la transferencia de un hidruro desde el cofactor NADH. El intermediario reducido adquiere un protón del medio para formar etanol (Nelson y Cox, 2021). Estequiométricamente parece una reacción sencilla,  $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$ , pero al mismo tiempo la levadura utiliza glucosa y nutrientes para reproducirse (Stanbury et al., 2017). Para evaluar esta transformación, se usan los rendimientos biomasa/sustrato ( $Y_{x/s}$ ), el cual es la cantidad de levadura producida por cantidad de sustrato consumido, y el rendimiento sustrato/producto ( $Y_{p/s}$ ) que es la cantidad de producto sintetizado por cantidad de sustrato consumido. El rendimiento teórico estequiométrico para la transformación de glucosa en etanol es de 0.511 g de etanol y 0.489 g de  $CO_2$

por 1g de glucosa. El rendimiento experimental varía entre 90% y 95% del teórico, es decir, de 0.469 a 0.485 g/g. Los rendimientos en la industria varían entre 87 y 93% del rendimiento teórico (Stanbury et al., 2017; Vázquez, O. Dacosta, 2007).

En la figura 3 se describe la fermentación alcohólica de una manera simplificada.

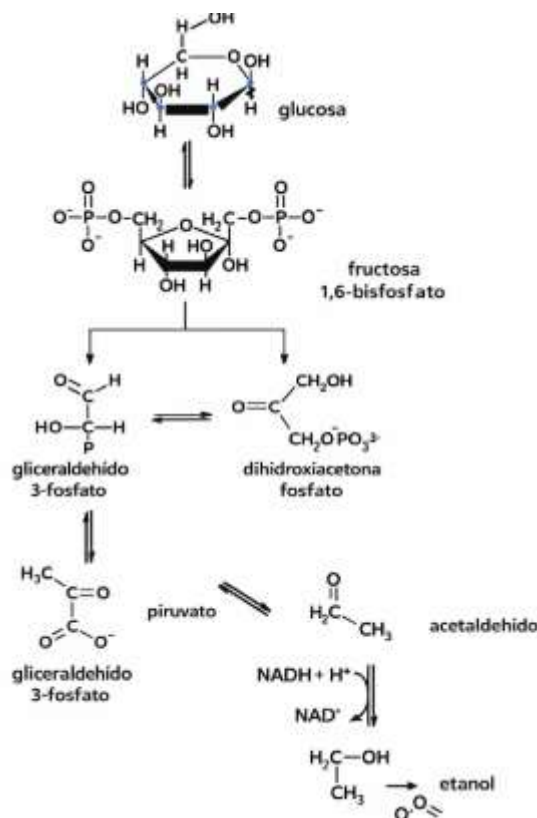


Figura 3. Etapas de la fermentación alcohólica (Nelson y Cox, 2017).

Por otra parte, mientras la reacción primaria de la fermentación alcohólica ocurre, se forman otros compuestos producto del metabolismo secundario de las levaduras, como por ejemplo compuestos aromáticos y los que dan cuerpo a la bebida fermentada, como es el caso del glicerol. Estos parámetros darán carácter e identidad al fermento por lo que son de gran importancia al momento de tener en cuenta el producto final (López de la Maza et al., 2009). Dependiendo de la fermentación que se quiera realizar hay cepas más estudiadas y mejor adaptadas a cada una de ellas (panificación, elaboración de cervezas, vinificación etc.) (Steensels et al., 2014).

Las levaduras son organismos eucariotas muy diferentes entre sí, en tamaño, forma y color. Son hongos unicelulares y generalmente sus células son ovaladas, pero también pueden encontrarse en forma esférica, cilíndrica o elíptica. Son de mayor tamaño que las bacterias alcanzando un diámetro máximo de entre cuatro y cinco  $\mu\text{m}$ . Se reproducen por fisión binaria o gemación y algunas pueden ser

dimórficas o bifásicas y crecen como micelio bajo condiciones ambientales especiales. Son resistentes a antibióticos, sulfamidas y otros agentes antibacterianos de forma natural (Madigan et al., 2021). Se conoce la secuencia completa del genoma de SC y se mantiene en constante revisión, lo que ha permitido la manipulación genética de los casi 6600 genes que codifican el genoma de levadura (Engel et al., 2014).

Las levaduras involucradas en el proceso de fermentación alcohólica se pueden discriminar en dos grandes grupos, *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*. El primer grupo es representado principalmente por *Saccharomyces cerevisiae*, la levadura tradicional de la fermentación alcohólica (Carrau, 2003). Las levaduras del grupo no-*Saccharomyces*, conocidas como levaduras nativas o autóctonas, son las que están presentes en frutas y suelos, donde representan más del 99 % de la población total de levaduras presentes en la fruta y entorno (Fugelsang y Edwards, 2007). Las levaduras no-*Saccharomyces* más comúnmente encontradas están representadas por los géneros *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia* y *Metschnikowia* (Martin et al., 2016).

## 1.2 Antecedentes de fermentación alcohólica con zarzamora

Estudios previos sobre fermentación de zarzamora (*Rubus spp.*) indican que, debido a su bajo contenido de azúcares fermentables, es frecuente la adición de sacarosa al mosto para garantizar la obtención de un producto estable y con adecuada aceptabilidad sensorial (Duarte et al., 2010).

En el trabajo realizado por Ortiz (2021), se llevaron a cabo fermentaciones de dos variedades de zarzamora, utilizando diferentes concentraciones de levadura seca comercial (0.1; 0.3 y 0.5% p/v, adicionada al mosto antes de la fermentación) y sacarosa (10, 15 y 20%), con el objetivo de obtener bebidas alcohólicas tipo “semiseco” o “dulce”, de acuerdo a lo establecido por la normativa del MERCOSUR (Resolución GMC N° 45/96). El producto final presentó un pH de 3.16, una graduación alcohólica del 10% y características sensoriales aceptables, destacando que la adición del 15% de sacarosa permitió obtener una bebida alcohólica dulce, dentro del límite superior de azúcares establecidos (Ortiz, 2021).

De manera similar, en el trabajo de Sullca y Guevara (2013), se reportaron fermentaciones de zarzamora con adición de sacarosa, obteniendo productos con características fisicoquímicas y sensoriales aceptables. En este estudio también se evaluaron parámetros fisicoquímicos del fruto fresco, que presentó 3.91% de azúcares reductores, 0.93% de acidez titulable, pH de 3.4, 10.5 °Brix y un contenido de compuestos fenólicos totales equivalente a 400.67 mg de ácido gálico/100 g de muestra, lo que resalta el interés fermentativo y funcional del fruto.

Por otro lado, Leyva (2009) analizó nueve muestras de diferentes marcas de licores de zarzamora (industriales y artesanales), encontrando un rango de contenido alcohólico entre 12% y 20%, azúcares reductores de 172.4 a 337.8 g/L y valores de pH entre 2.46 y 3.75. Estos resultados permiten concluir que los productos derivados de zarzamora presentan perfiles fisicoquímicos consistentes con bebidas alcohólicas sensorialmente aceptables, aunque con marcada adición de azúcares.

De forma complementaria, un estudio más reciente de García-Herrera et al. (2019) evaluó la fermentación alcohólica de zarzamora y su impacto en el perfil fenólico y antioxidante. Se encontró que durante la fermentación la concentración de antocianinas disminuye, pero se mantiene un elevado contenido de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante, lo que refuerza el potencial funcional de estas bebidas.

### **1.3 Justificación**

Este trabajo de tesis surge de la inquietud de productores de la zona de Las Piedras, quienes tienen excedentes de producción de zarzamora y desean agregarle valor a su cosecha. Frente a esta situación, se nos plantea el desafío de desarrollar una bebida fermentada a base de zarzamora.

En este sentido, en este trabajo de tesis, se fermenta el mosto de zarzamora con distintas especies de levaduras, con el fin de obtener un protocolo que favorezca la fermentación alcohólica de esta materia prima.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo general**

Desarrollar una bebida fermentada a partir de zarzamoras uruguayas, empleando tres cepas de levaduras: *Saccharomyces cerevisiae*, reconocida como la levadura típica de la fermentación alcohólica; *Hanseniaspora vineae*, ampliamente estudiada por su capacidad fermentativa y su contribución al perfil sensorial de los productos fermentados; y *Lachancea thermotolerans*, una especie de interés por su capacidad de bioacidificación de mostos.

### **2.2 Objetivos específicos**

A continuación, se detallan los objetivos específicos:

- Caracterización del fruto en cuanto a su composición fisicoquímica (azúcar, pH, nitrógeno, acidez, Índice de Polifenoles Totales, IPT).

- Desarrollo y puesta a punto de un protocolo para la elaboración de una bebida fermentada a base de zarzamora, utilizando diferentes cepas de levaduras como se mencionó en el objetivo general.
- Caracterización fisicoquímica y sensorial de las bebidas fermentadas obtenidas.
- Estudio del potencial antioxidante de la bebida fermentada.

### **3. Materiales y Métodos**

#### **3.1 Mosto**

##### **3.1.1 Cosecha y obtención del mosto**

Lo primero que se realizó fue la cosecha manual del fruto. La misma se realizó en la localidad de Las Piedras, Canelones, sobre la ruta 36 (Figura 4), a partir de plantaciones de zarzamoras dispuestas en sistema de conducción tipo espalderas, separadas aproximadamente 1 metro una de otra, similar a la vid (Figura 5 A y B). Se retiró el fruto que ya está maduro, de un color morado casi negro, se cosechó a mano con un movimiento perpendicular al tallo al que el fruto está unido, sin llegar a apretar de forma de no dañar el grano. Se cosecharon unos 2.5 kg aproximadamente del fruto.

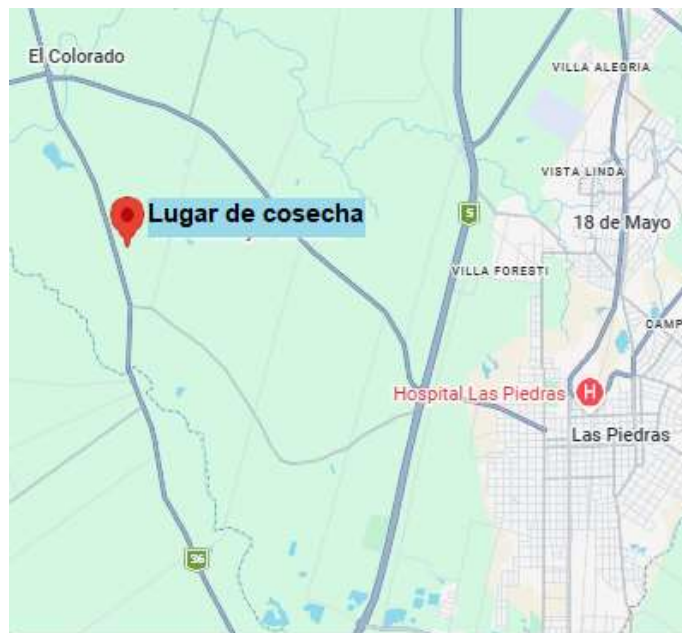


Figura 4 Ubicación geográfica de la zona de cosecha.



Figura 5. (A y B). Fotografías tomadas el día de la cosecha (5 de diciembre de 2023), en Las Piedras, Canelones.

Una vez obtenido el fruto, se procedió a moler, en un recipiente previamente lavado y sanitizado con alcohol al 70%. Una vez obtenido el mosto, se dispuso en frascos de vidrio, estériles, procurando que no quede aire dentro para evitar la oxidación del mosto (Figura 6).



Figura 6. Elaboración del mosto

### 3.1.2 Determinaciones realizadas al mosto

En experiencias previas en este tipo de mosto, se observa inconvenientes en la toma de volúmenes con pipeta, estancamiento de sólidos en pHmetro e interferencia en refractómetro, por lo que se decide centrifugar una porción a 12000 rpm por 10 min a 20°C, para la realización de los pie de cuba, la medida de °Brix, determinación de pH y análisis de acidez total, nitrógeno asimilable y polifenoles totales.

### 3.1.2.1 pH

Determinación directa con pHmetro (marca CORNING meter 320).

### 3.1.2.2 Temperatura

Temperatura con termómetro de alcohol en un vaso de agua a temperatura ambiente.

### 3.1.2.3 Contenido de Azúcar

Determinación de grados Brix, con refractómetro según el Manual de Prácticas de Enología (2022).

### 3.1.2.4 Siembra en WLN

Se realizó una siembra directa de 0.1 mL de una solución de 1/10 de mosto en placa WLN (agar nutritivo de laboratorio (Wallerstein, 2020).

La siembra del mosto directo en WLN tiene por objetivo el crecimiento de levaduras presentes en el mosto, para aislarlas y en un trabajo futuro llegar hasta su identificación. Es un medio diferencial, promueve el crecimiento de levaduras y permite la diferenciación entre grupos, posee azul de bromotimol, (indicador de pH), permitiendo la visualización de acidez o basicidad (Dalmaso, 2020)

### 3.1.2.5 Nitrógeno disponible

Para el crecimiento y replicación de las levaduras es imprescindible el nitrógeno en forma de aminoácidos y amonio para la realización de la síntesis proteica. Las formas de nitrógeno ampliamente utilizables son los  $\alpha$ -aminoácidos libres (FAN), arginina, serina, alanina, treonina y los ácidos  $\alpha$ -aminobutírico, aspártico y glutámico (Manual de Prácticas de Enología, 2022)

Niveles bajos de nitrógeno podrían causar paradas de fermentación, por lo que se hace necesario cuantificar el nitrógeno proveniente del fruto para diagnosticar el agregado de nitrógeno de ser necesario (Bisson, 2002)

Se utilizó el método de Sørensen detallado en Manual de Prácticas de Enología (2022). Se valoró con pHmetro para más seguridad del punto final, dado que el intenso color rojo del mosto impedía visualizar correctamente el punto de equilibrio con la fenolftaleína como indicador.

### 3.1.2.6 Inóculo

Se realizaron tres pie de cuba, uno para cada una de las tres levaduras estudiadas: *Lachancea thermotolerance* M18, *Hanseniaspora vineae* T02-05 y una levadura comercial de referencia *Saccharomyces cerevisiae* M522. Las tres levaduras fueron reactivadas a partir de levaduras congeladas a -80 °C, provenientes del banco de levaduras del Laboratorio de Enología y Biotecnología de las Fermentaciones de Facultad de Química. Se siembran en placas con WLN, durante 48 horas en

estufa a 28°C. En esta ocasión la siembra en WLN es para obtener un crecimiento óptimo de las levaduras y controlar su pureza.

El trabajo se realizó en campana de flujo laminar y con material estéril. Se tomó con ansa una de las colonias y se la coloca en un matraz de 100 mL conteniendo 30 mL de mosto centrifugado. Se tapan con algodón y papel de aluminio. Se agitó en shaker por 24 horas a 20°C. Transcurrido este tiempo se realiza el recuento de levaduras en Cámara de Neubauer en microscopio, y se inocula para realizar las microfermentaciones.

Para realizar el recuento de levaduras en Cámara de Neubauer, es necesario que las tomas de volumen sean de una suspensión de levaduras lo más homogénea posible, para esto debe agitarse muy bien el matraz que contiene la levadura, y tomar una muestra de 0.1 mL que se depositó en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se agrega 0.9 mL de solución de azul de metileno (para distinguir células vivas de muertas). Se llevó a un vortex para lograr homogeneidad de población, disgregando la aglomeración de células, para luego hacer la toma con micropipeta para llenar la cámara de Neubauer y donde se realizó el recuento en microscopio óptico 400x (Manual de Prácticas de Enología, 2022).

### **3.1.2.7 Microfermentaciones**

Las microfermentaciones se realizaron por triplicado, para cada uno de los tratamientos con las diferentes levaduras, en matraces Erlenmeyer estériles de 250 mL como se muestra en la figura 7, con tapón de algodón y papel de aluminio. Se utilizó un volumen de mosto de 150 mL y se inocularon  $1 \times 10^6$  células/mL de la levadura correspondiente (Medina et al., 2013).

Las fermentaciones se llevaron a cabo en condiciones semi-anaeróbicas a 20°C con una frecuencia de agitación de una vez al día, para desprender el CO<sub>2</sub> generado en la reacción. Por diferencia de masas se mide la capacidad fermentativa de cada levadura, a partir de la medida de pérdida de CO<sub>2</sub>, generado a lo largo de la fermentación alcohólica. Esto se realizó midiendo la masa inicial de cada matraz al comienzo de la fermentación y luego una vez al día hasta lograr una medida de masa estable que indica la finalización de la fermentación. Al finalizar la fermentación, se centrifuga el mosto a 12.500 rpm (Doran, 2013).



Figura 7. Microfermentaciones con mosto de zarzamora por triplicado para cada una de las levaduras estudiadas.

#### **3.1.2.8 Acidez total**

Se midió dicho parámetro tanto al mosto inicial como a los fermentos finales según la técnica detallada en el Manual de Prácticas de Enología (2022).

La acidez total es la suma de los ácidos valorables al llevar a la muestra a pH 7 por adición de una solución alcalina valorada (NaOH 0.1N). El CO<sub>2</sub> no se incluye en la acidez total. La práctica utiliza el azul de bromotimol como indicador, pero al ser muy difícil la detección visual del viraje de color, se realizó valoración potenciométrica hasta alcanzar un valor de pH=7.

### **3.2 Determinaciones realizadas a la bebida final fermentada de zarzamora**

#### **3.2.1 pH**

Se realizó la misma determinación que la realizada para el mosto.

#### **3.2.2 Acidez Total**

Se realizó la misma determinación que la realizada para el mosto.

#### **3.2.3 Acidez volátil**

El método utilizado es el descrito en el Manual de Prácticas de Enología (2022). En la figura 8 se observa el tratamiento de separación de los ácidos volátiles del fermento.



Figura 8. Determinación de acidez volátil mediante destilación por arrastre de vapor de agua.

#### 3.2.4 Polifenoles totales

La determinación de polifenoles totales se realizó utilizando el método de Folin-Ciocalteu, según el método descrito por Singleton et al. (1999) y posteriormente aplicado en Fernández et al., (2019) El método propone el seguimiento de una reacción de Redox (reducción /oxidación) entre los polifenoles presentes en una muestra y el reactivo de Folin-Ciocalteu. La cuantificación se realizó utilizando como patrón de referencia el ácido gálico (curva de calibración: 0.05 – 1.00 mg/mL). La reacción Redox se siguió mediante espectrofotometría UV-Visible a 750 nm, en un lector de placa.

En la placa que se visualiza en la figura 9, se agregaron 10  $\mu$ L de patrón o muestra en cada pocillo (por triplicado) y 200  $\mu$ L de solución de carbonato de sodio al 20%, se esperaron 2 minutos y se adicionaron 50  $\mu$ L de solución de Folin (1/5). Una vez pasados 30 minutos a oscuridad (para esto tapamos la placa con papel de aluminio), se midió en el lector de placas Spark (Tecan Group Ltd., Männedorf, Suiza). Para la adquisición y el procesamiento de los datos se empleó el software Magellan Software (Tecan Group Ltd., Männedorf, Suiza). Los resultados se expresaron como miligramos de equivalente de ácido gálico por litro de muestra (mg GAE/L).

Al agregar el carbonato de sodio al 20% a las muestras, se observó un cambio de coloración a azul tenue, por lo que se realizó un blanco solo con el carbonato de sodio y agua destilada decarbonatada en lugar del reactivo de Folin. Este blanco se le restó al valor medido correspondiente.

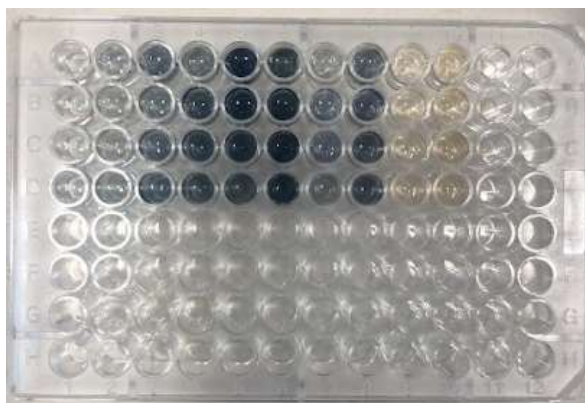


Figura 9. Siembra de muestras para determinación de polifenoles totales en lector de placas.

### 3.2.5 Actividad antioxidante

Se utilizó el método de ABTS, propuesto por Fernández et al., (2019). El principio básico del método consta, de realizar la medida de la capacidad de los antioxidantes de atrapar los radicales catiónicos  $ABTS^{\cdot+}$ , formando el complejo reducido  $ABTS^{2-}$  (incoloro). Es una reacción de reducción/oxidación (REDOX) entre los antioxidantes presentes en una muestra y el reactivo de ABTS. La reacción se monitorea midiendo la decoloración de la solución, mediante espectrofotometría UV-Vis a 750 nm, en un lector de placas.

Para la curva de calibración se prepararon soluciones estándar de Trolox (ácido  $(\pm)$ -6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) en concentraciones de 0.25; 0.50; 0.80; 1.00 y 1.50 mM. Las muestras se diluyeron 1:100 antes del análisis. Los resultados se expresaron como micromoles de equivalente de Trolox por litro de muestra ( $\mu\text{mol TE/L}$ )

### 3.2.6 Alcohol

Se determinó el contenido de alcohol en las muestras obtenidas de bebida fermentada de zarzamora mediante la utilización de HPLC (High-Performance Liquid Chromatography).

Es una técnica de separación que se basa en una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida, en las que las separaciones ocurren por procesos de partición o intercambio iónico, según el tipo de fase estacionaria utilizada en cada técnica. Para este trabajo se utilizó cromatografía de partición en fase reversa con una fase móvil polar (Suárez et al., 2018).

Se utilizó un sistema Shimadzu, conectado a un detector de índice de refracción (RID-10 A). Los componentes se separaron utilizando una columna SUPELCOGEL C-610H (Supelco) de 30 cm x 7,8mm y 5  $\mu\text{m}$ , a 55 °C con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5mN como fase móvil, y un flujo de 0,5mL/min. El análisis de los resultados se realizó en el paquete de software LabSolutions LC (version 5.106).

Para la curva de calibración, se realizaron las siguientes diluciones a partir de etanol anhidro 10%, 8%, 4%, 2%, 1%, v/v, con agua Milli- Q como se muestra en la figura 10 y se filtraron con filtros de 0.2  $\mu\text{m}$ , antes de inyectar.

Se realizó una correlación entre área del pico del estándar, tiempo de retención y concentración del mismo. Con estos datos se construyó una curva de calibración graficando el área de los patrones en función de la concentración de etanol (% v/v). Ver anexo 1, figura 1b. A partir de la ecuación de la recta obtenida, se realizó la interpolación de las áreas correspondientes a las muestras, lo que permitió determinar la concentración de etanol presente en cada una de las 9 réplicas mediante HPLC.



Figura 10. Muestras y estándares filtrados previo a la inyección en HPLC.

### 3.2.7 Azúcares y glicerol

Se determinó el contenido de fructosa, glucosa y glicerol por HPLC, de manera similar al análisis de etanol con la diferencia de que las concentraciones de los estándares a utilizar fueron en g/L. Para glucosa y fructosa las concentraciones de la curva de calibración fueron 5, 3, 2, 1, 0.5 g/L y para glicerol 10, 6, 3.6, 1.2 y 0.5 g/L. Ver anexo 1, figura 1a.

### 3.2.8 Color

Primeramente, se realizó la medida de color por el método de Gloris como indica el Manual de Prácticas de Enología (2022), que consta de medir directamente las absorbancias a 420, 520 y 620 nm. Ver anexo 3. Al observarse que el valor a 520 nm por más que se utilizan celdas de 0.1cm de paso queda por fuera de la curva de referencia de absorbancia, se decide utilizar otro método para cuantificar el color rojo a 520 nm. Para esto se utilizó el método descrito por Boulton (2001), que permite diluir la muestra 1/10

en buffer Mc. Llaine pH3.2, lo que es suficiente para que la medida a 520 nm quede comprendida en el rango con la celda de 0.1cm, para las medidas de 420 y 620 nm se utilizó la celda de 1cm.

### 3.2.9 Evaluación sensorial

La evaluación sensorial fue realizada por un panel de 10 personas semientrenadas, perteneciente al Área Enología y Biotecnología de las Fermentaciones. Cada persona recibió 9 muestras en copa de cata normalizada según la norma ISO 3591, diseñada para garantizar condiciones reproducibles en la evaluación. Esta copa, de vidrio fino e incoloro y con forma de tulipa, presenta una altura total de  $155 \pm 1$  mm, un diámetro máximo del cáliz de  $65 \pm 1$  mm, un diámetro de borde de  $46 \pm 1$  mm y una altura del cáliz de aproximadamente 100 mm, con una capacidad total cercana a 210–225 mL. El volumen de servicio recomendado es de no más de 50 mL. Su diseño, con borde ligeramente cerrado y tallo definido, favorece la concentración de compuestos aromáticos y permite una adecuada apreciación visual, olfativa y gustativa de la muestra (International Organization for Standardization, 1977).

El panel sensorial recibió unos 30 mL de fermento de zarzamora por copa a 20°C. Las muestras fueron codificadas con código de 3 dígitos elegidos al azar. Como se muestra en la figura 11. Cada evaluador recibió una boleta de evaluación (Figura 12) donde debían indicar los descriptores aromáticos que identificaban para cada una de las muestras. A su vez, se les solicitó que indicaran el nivel de agrado en una escala de 0 a 9. Estos descriptores fueron seleccionados a partir de lo encontrado en bibliografía (Jackson, 2014).



Figura 11. Copas de cata conteniendo los diferentes fermentos de zarzamora, para evaluación sensorial.

Nombre: \_\_\_\_\_

Usted recibirá 3 muestras fermentadas a base de zarzamora. Para cada una de ellas responda los siguientes ítems.

**Muestra \_\_\_\_\_**

1- Marque los descriptores aromáticos que percibe en la muestra

☐ frutos rojos   ☐ membrillo   ☐ rosas   ☐ violetas   ☐ ciruela

☐ cítrico   ☐ frutas tropicales   ☐ frutas pasas   ☐ herbáceo   ☐ extraño   ☐ defectuoso

2- Señale cuánto le agrada el producto en una escala de nada a mucho.

0 \_\_\_\_\_ 9

Nada \_\_\_\_\_ Mucho

**Muestra \_\_\_\_\_**

1- Marque los descriptores aromáticos que percibe en la muestra

☐ frutos rojos   ☐ membrillo   ☐ rosas   ☐ violetas   ☐ ciruela

☐ cítrico   ☐ frutas tropicales   ☐ frutas pasas   ☐ herbáceo   ☐ extraño   ☐ defectuoso

2- Señale cuánto le agrada el producto en una escala de nada a mucho.

0 \_\_\_\_\_ 9

Nada \_\_\_\_\_ Mucho

**Muestra \_\_\_\_\_**

1- Marque los descriptores aromáticos que percibe en la muestra

☐ frutos rojos   ☐ membrillo   ☐ rosas   ☐ violetas   ☐ ciruela

☐ cítrico   ☐ frutas tropicales   ☐ frutas pasas   ☐ herbáceo   ☐ extraño   ☐ defectuoso

2- Señale cuánto le agrada el producto en una escala de nada a mucho.

0 \_\_\_\_\_ 9

Nada \_\_\_\_\_ Mucho

Figura 12. Formulario utilizado para evaluación sensorial

### 3.2.10. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de: Acidez total, acidez volátil, ABTS, polifenoles, color, alcohol, glicerol y pH, fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía, con el objetivo de evaluar diferencias significativas entre las diferentes levaduras (LT, SC y HV) a lo largo del proceso de fermentación. Ver anexo 2. Dichos análisis fueron realizados en Infostat.

Cuando se detectaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), se aplicó el test de comparación múltiple de Fisher (LSD) para determinar diferencias entre medias.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1 Mosto

#### 4.1.1 Caracterización del mosto de zarzamora

Antes del proceso fermentativo, se realizó la caracterización físicoquímica del mosto, cuyos parámetros se detallan en la tabla 3.

Tabla 3. Valores del mosto de partida de zarzamora

| Parámetro                  | Valor                                           |
|----------------------------|-------------------------------------------------|
| pH                         | 3.1                                             |
| Grados Brix (°Bx)          | 9                                               |
| Temperatura                | 22 °C                                           |
| Acidez total               | 10.48 ± 0.09g H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /L |
| Nitrógeno disponible (YAN) | 262.5 ± 4.4 mg/L                                |
| Capacidad antioxidante     | 64.93 ± 0.58 μmol TE/mL                         |

El mosto de zarzamora presentó un pH bajo (3.10), valor típico en frutas rojas, lo cual favorece la estabilidad microbiológica durante la fermentación. El contenido de azúcares iniciales (9 °Bx,) fue moderado respecto a otros frutos similares pero suficiente como para permitir una fermentación alcohólica suave. La acidez total fue elevada (10.48 g/L en equivalentes de HSO), lo que indicó una alta presencia de ácidos orgánicos, característica de frutos ácidos como la zarzamora y determinante en el perfil sensorial final de la bebida. Por su parte, el contenido de nitrógeno disponible (YAN: 262.52 mg/L), fue considerado suficiente, ya que lo recomendado es de al menos 140 mgN/L para evitar fermentaciones lentas o incompletas, especialmente en fermentaciones llevadas a cabo con *Saccharomyces cerevisiae* (Henschke y Jiranek, 1993).

#### 4.1.2 Cinética de fermentación

Durante la fermentación, SC presentó una fase exponencial, durante el desarrollo de la fermentación alcohólica, más rápido, como se observa en la figura 13, alcanzando su máximo valor a los dos días, lo que evidencia una rápida adaptación al medio y una mayor eficiencia inicial en el consumo de sustrato. En contraste, HV mostró un crecimiento más gradual pero constante, logrando valores similares a los de SC hacia el día cinco, lo que sugiere un desarrollo más sostenido en el tiempo. Por su parte, LT exhibió un crecimiento intermedio, con un ascenso progresivo hasta el día cuatro, sin incrementos abruptos, lo que podría reflejar un metabolismo más lento y una capacidad fermentativa relativamente menor respecto a las otras dos levaduras. A partir del cuarto día, las tres cepas alcanzaron una meseta, indicando la finalización de la fermentación.

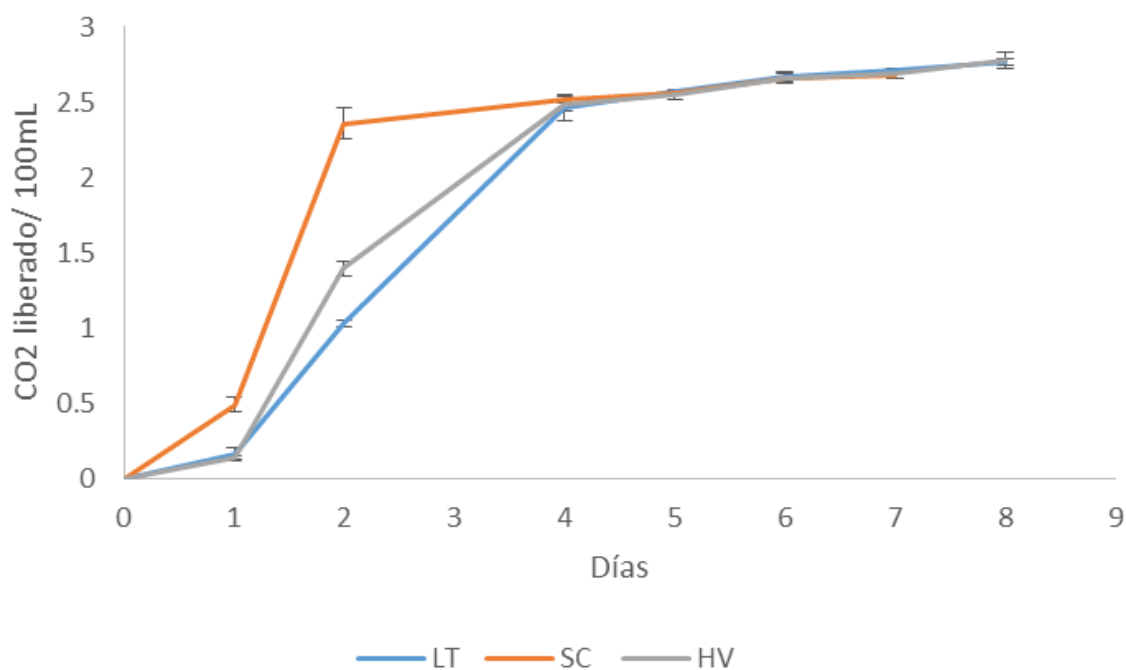


Figura 13. Curva del proceso fermentativo de las 3 levaduras.

## 4.2 Fermentos

### 4.2.1 Acidez total

En los resultados obtenidos para acidez total, se observó diferencias significativas según el microorganismo empleado, como se muestra en la tabla 4. SC mostró los valores más altos de acidez total, con un promedio de 10.16 g/L, manteniendo un pH bajo (3.28). Este comportamiento es característico de esta levadura, que en condiciones normales tiende a conservar o incluso aumentar la acidez durante la fermentación, especialmente al producir ácidos orgánicos como succínico y acético.

Por otro lado, LT presentó un comportamiento intermedio, con una acidez total media de 9.97 g/L y un pH ligeramente más elevado (3.33). Esta levadura es conocida por su elevada capacidad de producir ácido láctico, pero en este caso no se observó un aumento de la acidez total ni una disminución marcada del pH, lo que podría deberse a la alta acidez inicial del mosto o a una menor expresión de la vía láctica bajo las condiciones ensayadas (Benito et al., 2021).

En contraste, HV mostró la acidez total más baja (9.30 g/L) y el pH más alto (3.37) entre todas las cepas. Esto indica una menor acidificación del medio, posiblemente por menor producción de ácidos durante la fermentación o por un consumo parcial de ácidos presentes en el mosto. Este patrón coincide con lo reportado en la literatura, donde HV se asocia a fermentaciones más suaves y perfiles organolépticos más frutales, con menor perfil ácido (Medina et al., 2023).

Tabla 4. Valores promedio de acidez total y pH para las 3 levaduras. LSD Fisher,  $\alpha \leq 0.05$ . Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras. Ver anexo 2a y 2b.

| Levadura | Acidez total         | pH                   |
|----------|----------------------|----------------------|
| HV       | $9.37 \pm 0.58^a$    | $3.37 \pm 0.03^b$    |
| LT       | $9.98 \pm 0.17^{ab}$ | $3.33 \pm 0.03^{ab}$ |
| SC       | $10.16 \pm 0.15^b$   | $3.28 \pm 0.02^a$    |

### 4.2.2 Acidez volátil

La acidez volátil (AV) es un parámetro crítico en la evaluación de la calidad microbiológica y sensorial de los fermentos. En general, se asocia principalmente a la presencia de ácido acético, un metabolito que en concentraciones elevadas, puede originar defectos aromáticos como el olor avinagrado o disolvente (acetato de etilo) (Jackson, 2014). Los valores normales en fermentaciones frutales varían, pero concentraciones por encima de 0.5 g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/L (equivalente a ~0.83 g/L de ácido acético) pueden considerarse indicativas de desviaciones fermentativas (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

En este estudio, todos los valores se mantuvieron muy por debajo del umbral de defecto, oscilando entre 0.25 y 0.3167 g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/L, como se muestra en la tabla 5, lo cual indica una fermentación sana y controlada, sin evidencia significativa de contaminación por bacterias acéticas y/o levaduras indeseadas.

Tabla 5. Valores promedio de acidez volátil para las 3 levaduras, LSD Fisher,  $\alpha \leq 0.05$ .

Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras. Ver anexo 2c.

| Levadura | Acidez volátil gH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /L |
|----------|---------------------------------------------------|
| LT       | 0.295 ± 0.018 <sup>b</sup>                        |
| HV       | 0.290 ± 0.012 <sup>b</sup>                        |
| SC       | 0.249 ± 0.007 <sup>a</sup>                        |

Por su parte, el promedio de las levaduras SC se destacó por presentar el menor valor de acidez volátil (0.249g/L) y el valor de pH más bajo (3.28). Esta combinación podría estar relacionada con un mayor control en la producción de metabolitos secundarios, lo que convierte a esta cepa de SC en la más estable desde el punto de vista microbiológico.

Las levaduras LT presentaron valores absolutos más altos de acidez volátil (0.295 g/L) y un pH de (3.33).

Las fermentaciones con la levadura HV, mostraron valores de acidez volátil similares a los obtenidos con LT (0.290g/L) , pero con un pH ligeramente más alto (3.37). Esta condición podría favorecer una mayor actividad microbiana si no se controla adecuadamente. De hecho, durante la fermentación se observó la aparición de un halo blanco en superficie que sugiere algún grado de contaminación. Sin embargo, este fenómeno no se tradujo en defectos sensoriales significativos al momento de la evaluación organoléptica.

En cuanto a la relación entre pH y acidez volátil, no se observó una correlación directa. No obstante, se destacó que los fermentos con menor pH (como SC) coincidieron con los niveles más bajos de acidez volátil, lo que resulta esperable dado que un ambiente más ácido inhibe el crecimiento de microorganismos productores de ácido acético (Ribéreau-Gayon et al., 2006). En general, todos los fermentos presentaron niveles seguros y aceptables de acidez volátil, lo que refleja un proceso fermentativo bien controlado. La levadura SC podría considerarse como la que tuvo una mayor estabilidad microbiológica. Estos resultados refuerzan la elección de levaduras *Saccharomyces* como las más adecuadas para obtener fermentos estables y con menor riesgo de desviaciones.

#### 4.2.3 Polifenoles totales por Folin-Ciocalteu

Al analizar el comportamiento según el tipo de levadura, se observaron diferencias significativas en polifenoles totales. Ver tabla 6. La cepa HV mostró el valor más elevados de polifenoles (3.61 mg GAE/mL), lo que puede atribuirse a su capacidad para liberar compuestos fenólicos a partir de precursores glicosilados gracias a su actividad  $\beta$ -glucosidasa (Manzanares et al., 2000). Por su parte, la levadura SC presentó niveles intermedios (3.44 mg GAE/mL), en concordancia con su reconocida eficiencia fermentativa. Finalmente, la levadura LT registró la menor concentración (2.11 mg GAE/mL), lo cual podría estar vinculado a una menor acción enzimática extracelular o a una interacción menos efectiva con la matriz frutal (Morata et al., 2019).

Tabla 6. Valores promedio de polifenoles totales para las 3 levaduras evaluadas. LSD Fisher,  $\alpha \leq 0.05$ . Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras. Ver anexo 2d.

| Polifenoles totales (mg GAE/mL) |                   |
|---------------------------------|-------------------|
| Levadura                        | Promedio          |
| HV                              | $3.61 \pm 0.39^b$ |
| LT                              | $2.11 \pm 0.23^a$ |
| SC                              | $3.44 \pm 0.49^b$ |

Desde el punto de vista fisicoquímico y sensorial, las bebidas fermentadas con mayor contenido fenólico como HV y SC probablemente exhiban un color más intenso, mayor cuerpo y la presencia de notas sensoriales más complejas, tales como una ligera astringencia o un amargor suave.

#### 4.2.4 Capacidad antioxidante de bebidas fermentadas de zarzamora por el método ABTS

La fermentación con levaduras provocó un aumento significativo en la capacidad antioxidante de las bebidas, en comparación con el mosto sin fermentar (64.93  $\mu\text{mol/mL}$  (tabla 3)). Esto puede atribuirse, según literatura pertinente a la acción de enzimas como las  $\beta$ -glucosidasas producidas por las levaduras, que liberan compuestos fenólicos conjugados y aumentan la reactividad antioxidante (Zhao et al., 2021).

La metodología ABTS permitió cuantificar con precisión el efecto de la fermentación sobre la capacidad antioxidante de las bebidas de zarzamora. Se observaron diferencias entre los tratamientos, donde SC presentó los valores más altos de capacidad antioxidante (107.6  $\mu\text{mol TE/mL}$ ), siendo significativamente mayor que HV (94.3  $\mu\text{mol TE/mL}$ ). Por su parte, LT (101.4  $\mu\text{mol TE/mL}$ ) mostró valores intermedios, sin diferencias significativas respecto a HV ni a SC. Ver tabla 7.

Tabla 7. Valores promedio de capacidad antioxidante por ABTS para las 3 levaduras evaluadas. LSD Fisher,  $\alpha \leq 0.05$ . Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras. Ver anexo 2e.

| Levadura | Capacidad antioxidante<br>en $\mu\text{mol TE/mL}$ |
|----------|----------------------------------------------------|
| HV       | $94.3 \pm 8.5^a$                                   |
| LT       | $101.4 \pm 4.5^{ab}$                               |
| SC       | $107.6 \pm 6.4^b$                                  |

#### 4.2.5 Azúcares

Los azúcares fructosa y glucosa no fueron detectables en el HPLC, por lo que se puede inferir que estos dos azúcares fueron fermentados en su totalidad en las microfermentaciones realizadas por las 3 diferentes levaduras. El valor inicial de azúcares fue 9° Brix, suficientemente bajo como, por lo que es razonable este resultado.

#### 4.2.6 Alcohol

Las 3 levaduras estadísticamente no fueron diferentes con respecto a la generación de alcohol. Ver tabla 8. Igualmente se realiza una discusión en base a los valores absolutos de cada levadura.

En el presente estudio, SC presentó la mayor producción de etanol, lo cual es consistente con su fisiología, ya que se trata de una levadura altamente eficiente, con elevada tolerancia alcohólica y comúnmente utilizada para llevar a cabo fermentaciones completas (Walker and Stuart, 2016). LT, si bien también alcanzó niveles significativos de etanol, mostró un rendimiento ligeramente menor, lo cual concuerda con su metabolismo característico que combina la producción de etanol con la síntesis de ácido láctico, desviando parte del carbono disponible hacia rutas no etanólicas (Benito, 2019). Por su parte, HV registró la menor producción, en concordancia con su rol enológico más enfocado en el aporte aromático particularmente ésteres y compuestos florales que en la generación de etanol, debido a su menor capacidad fermentativa en comparación con SC y su sensibilidad a concentraciones elevadas del mismo (Martín, 2016). En conjunto, los resultados muestran que SC fue la levadura más eficiente en la conversión de azúcares a etanol, LT presentó un desempeño intermedio vinculado a su perfil fermentativo mixto, y HV se destacó más por su contribución sensorial que por su rendimiento alcohólico.

Tabla 8. Valores medios de alcohol para las 3 levaduras, medidos en HPLC. LSD Fisher,  $\alpha \leq 0.05$ . Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras. Ver anexo 2g.

| Levadura | %v/v alcohol      |
|----------|-------------------|
| HV       | $2.88 \pm 0.54^a$ |
| LT       | $3.02 \pm 0.13^a$ |
| SC       | $3.11 \pm 0.16^a$ |

#### 4.2.7 Glicerol

Los valores de glicerol de las distintas fermentaciones no fueron significativamente diferentes entre sí. Ver tabla 9. A su vez, el rango medido en las bebidas obtenidas estuvo entre 2.75 - 3.14g/L, encontrándose por debajo del nivel de percepción sensorial, (5g/L). De todas maneras la presencia de glicerol en los fermentados puede aportar sutilmente a la redondez en boca (Liu et al., 2018).

Tabla 9. Valores medios de glicerol para las 3 levaduras. LSD Fisher,  $\alpha \leq 0.05$ . Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras. Ver anexo 2f.

| Glicerol g/L |                   |
|--------------|-------------------|
| Levadura     | Media             |
| HV           | $2.75 \pm 0.35^a$ |
| LT           | $3.14 \pm 0.20^a$ |
| SC           | $2.37 \pm 0.12^a$ |

#### 4.2.8 Color

El color de los fermentados de zarzamora está fuertemente influenciado por el contenido y estado de los antocianos, además del pH, la acidez y las interacciones con otros compuestos fenólicos (Jackson, 2014).

La absorbancia en 520 nm es la más representativa del color rojo-violáceo típico de las frutas del bosque, mientras que las longitudes de 420 y 620 nm indican la presencia de pigmentos oxidados (amarillos) o tonos más azulados, respectivamente (Boulton, 2001).

En los tres fermentados el color rojo fue un orden mayor con respecto al amarillo y azul. Esto se pudo verificar a simple vista en el análisis sensorial. Los fermentados así como el mismo mosto eran de un rojo intenso.

Fermentaciones hechas con levaduras SC, presentaron las mayores absorbancias a 520 nm, indicando una mejor extracción y/o conservación del color rojo. Ver tabla 10. También mostraron valores altos a 420 nm, lo que puede estar asociado a una mayor oxidación de antocianinas o mayor contenido fenólico total.

Las fermentaciones obtenidas con LT mostraron valores similares a SC en 420 y 520 nm, aunque levemente menores. Esto podría deberse a su menor producción de etanol, lo que reduce la solubilidad de pigmentos, o a su capacidad de acidificar el medio (Benito et al., 2016). Ver tabla 10. Las fermentaciones con HV, tuvieron los valores más bajos de absorbancia, especialmente a 520 nm. Esto puede relacionarse con menor poder fermentativo, y/o producción de metabolitos que degradan o modifican el color (Jolly et al., 2014).

Tabla 10. Valores medios absorbancia a 420, 520 y 620 para las 3 levaduras por dilución de Mc Llaine 1/10.

Ver anexo 3a y 3b. LSD Fisher,  $\alpha \leq 0.05$ . Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras. Ver anexo 2h.

| Levadura | 420nm             | 520nm             | 620nm                  | Intensidad Colorante | Tonalidad |
|----------|-------------------|-------------------|------------------------|----------------------|-----------|
| HV       | $0.78 \pm 0.04^a$ | $1.87 \pm 0.12^a$ | $0.068 \pm 0.003^a$    | 2.72                 | 0.42      |
| LT       | $0.91 \pm 0.05^b$ | $2.24 \pm 0.11^b$ | $0.089 \pm 0.017^b$    | 3.24                 | 0.41      |
| SC       | $0.91 \pm 0.02^b$ | $2.29 \pm 0.05^b$ | $0.076 \pm 0.001^{ab}$ | 3.28                 | 0.4       |

#### 4.2.9 Análisis sensorial

Se evaluaron un total de nueve muestras, correspondientes a tres tratamientos fermentativos (tres levaduras diferentes) analizados por triplicado, mediante un panel compuesto por diez evaluadores semientrenados, según lo descrito en el punto 3.2.9.

De los descriptores presentados a los evaluadores, el descriptor “Frutos Rojos” fue el más frecuentemente citado, registrando 78 menciones en total, lo que lo posiciona como el atributo aromático predominante y más representativo del perfil sensorial de las muestras. Ver tabla 11. Este descriptor se asocia directamente con el carácter varietal propio del fruto utilizado (Duarte et al., 2010).

Por su parte, los descriptores “Membrillo”, “Cítrico” y “Tropicales” se presentaron con frecuencia intermedia, contribuyendo a la complejidad aromática general, aunque con menor intensidad relativa respecto al descriptor principal.

Tabla 11. Frecuencia de mención de cada uno de los descriptores en función del tipo de levadura.

| Descriptor   | LT | HV | SC |
|--------------|----|----|----|
| Frutos Rojos | 20 | 21 | 19 |
| Membrillo    | 8  | 12 | 9  |
| Rosas        | 3  | 4  | 4  |
| Violetas     | 2  | 6  | 1  |
| Ciruelas     | 5  | 6  | 4  |
| Cítrico      | 6  | 8  | 8  |
| Tropicales   | 4  | 6  | 5  |
| Pasas        | 1  | 3  | 1  |
| Herbáceo     | 6  | 6  | 4  |
| Extraño      | 2  | 6  | 4  |
| Defectuoso   | 3  | 2  | 4  |

En general, todos los fermentos presentaron alta incidencia del descriptor “frutos rojos” (Ver figura 14), lo cual es consistente con el carácter intrínseco de la zarzamora como materia prima. Sin embargo, se observó matices en la expresión de otros aromas secundarios.

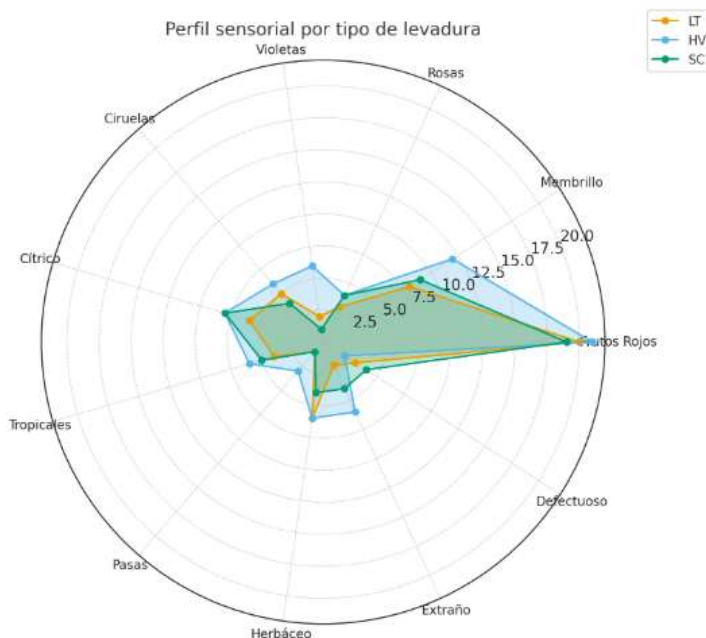


Figura 14. Diagrama tipo radar (spider chart) que muestra el perfil sensorial de las tres levaduras (LT, HV y SC) según la frecuencia de mención de cada descriptor.

Las fermentaciones con HV fueron las que mostraron mayor diversidad y riqueza aromática, con frecuencias superiores en descriptores como membrillo (12), violetas (6), cítricos (8) y tropicales (6). Esta mayor amplitud coincide con la literatura, donde HV se asocia a una mayor liberación de ésteres y compuestos terpénicos que intensifican aromas florales y frutales complejos (Viana et al., 2009). También se registró en HV la mayor frecuencia de menciones de “extraño” (6), lo que podría indicar la aparición de notas inusuales o atípicas que pueden ser producto de contaminación en el fermento. Por su parte, SC presentó un perfil más equilibrado, con frecuencias intermedias en la mayoría de los descriptores. Destacan valores similares a HV en cítricos (8) y un ligero predominio de rosas (4) y herbáceo (4). Sin embargo, también se reportaron más menciones de defectuoso (4) en comparación con HV (2), lo que podría asociarse a fermentaciones más rápidas, con formación de compuestos indeseables en ciertos tratamientos. Esto coincide con lo descrito por Swiegers et al. (2005), donde las fermentaciones dominadas por SC tienden a ser más consistentes pero menos complejas en términos aromáticos.

En el caso de LT, los resultados mostraron menor diversidad de descriptores. Si bien se mantuvo alta la mención de frutos rojos (20), otros atributos se presentaron en frecuencias más bajas, como membrillo (8), violetas (2) y tropicales (4). Esta menor amplitud sensorial puede estar relacionada con el metabolismo particular de LT, caracterizado por un mayor aporte a la acidez (a través de la producción de ácido láctico) que a la complejidad aromática (Morata et al., 2018). No obstante, es interesante que LT presentó menor frecuencia de menciones negativas como extraño (2) y defectuoso (3) respecto a SC, lo que sugiere fermentaciones más limpias, que pueden deberse a su bajo pH, aunque son menos expresivas en el plano aromático.

En conjunto, los resultados confirman una vez más que la elección de levadura impacta significativamente en el perfil sensorial de los fermentados de zarzamora. Mientras que HV potencia la complejidad aromática (particularmente en notas florales y frutales exóticas), SC asegura un perfil equilibrado, aunque con mayor riesgo de aparición de defectos, y LT aporta aromas más simples, pero con fermentaciones más estables y limpias.

## **5. Conclusiones**

El presente trabajo demostró que la zarzamora (*Rubus spp.*) constituye una materia prima viable para la elaboración de bebidas fermentadas, aportando características fisicoquímicas y sensoriales que la posicionan como una alternativa atractiva frente a otras frutas utilizadas tradicionalmente en nuestro país. El mosto inicial presentó condiciones adecuadas para una fermentación sana, con un pH bajo, azúcares moderados, acidez elevada y un nivel de nitrógeno disponible en el rango óptimo.

Los resultados evidenciaron que la elección de la levadura es un factor determinante en el perfil final de la bebida. *Saccharomyces cerevisiae* se destacó por su estabilidad fermentativa, confirmando su rol como la levadura más eficiente en la conversión de azúcares. *Lachancea thermotolerans* mostró un rendimiento intermedio, contribuyendo además a la acidez del producto, mientras que *Hanseniaspora vineae* presentó una menor capacidad fermentativa, pero enriqueció la complejidad aromática y sensorial de los fermentos.

En relación con los metabolitos secundarios, el glicerol no mostró diferencias significativas entre tratamientos, mientras que los contenidos fenólicos y la capacidad antioxidante confirmaron el potencial de la zarzamora como fuente de compuestos bioactivos. Sensorialmente, se observaron perfiles diferenciados: HV con mayor diversidad aromática, SC con equilibrio general y LT con fermentaciones limpias aunque menos expresivas.

No obstante, la elevada acidez de las bebidas obtenidas constituye una limitación para su consumo directo. Por esta razón, se sugiere su utilización en mezclas para coctelería o bien su corrección mediante la adición controlada de azúcares, lo que permitiría obtener un producto final más equilibrado y aceptable para el consumidor.

En conjunto, los resultados permiten concluir que la zarzamora es una fruta promisorio para el desarrollo de bebidas fermentadas diferenciadas. La selección de levaduras no-*Saccharomyces*, en combinación con SC, puede ser una estrategia interesante para potenciar la complejidad sensorial y el valor agregado del producto final.

Tutores a cargo del proyecto: Dra.Valentina Martín, Dra.Karina Medina.

Montevideo, Uruguay. junio del 2023. Facultad de Química, UDELAR.

## 6. Bibliografía

- Aguilera, M, Reza Vargas, M, Chew, R, Armando, J. (2011). Propiedades funcionales de las antocianinas. Revista BIOtecnia. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Juárez del Estado de Durango, México. <https://biotecnia.unison.mx/index.php/biotecnia/article/view/81/75>
- Álvarez, A., Peña-Neira, Á., Canals, R., & Jara, C. (2020). Caracterización de compuestos fenólicos en vinos de frutas tropicales fermentados en forma controlada. *Revista de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, 21(2), 35–47
- Antunes, L. E. C., Gonçalves, E. D., Trevisan, R., Reginatto, F. H., Picolotto, L., & Vignolo, G. K. (2014). Produção de amoreira-preta no Brasil. *Ciência Rural*, 44(9), 1562–1568. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20131654>
- Benito, Á., Calderón, F., Palomero, F., & Benito, S. (2021). *An integrative view of the role of Lachancea thermotolerans in wine technology*. *Foods*, 10(11), 2878. <https://doi.org/10.3390/foods10112878>
- Benito, S. (2019). The impacts of *Lachancea thermotolerans* yeast strains on winemaking. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(2), 6775–6790. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10070-7>
- Benito, Á., Calderón, F., Palomero, F., & Benito, S. (2016). Combined use of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lachancea thermotolerans* in winemaking: Impact on the anthocyanin and phenolic content of wines. *LWT - Food Science and Technology*, 64(1), 732–738. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.031>
- Bisson, L. (2002). DIAGNÓSTICO Y REACTIVACIÓN DE LAS PARADAS DE FERMENTACIÓN. REVISTA INTERNET DE VITICULTURA Y ENOLOGÍA, 11(1), 1-13. <https://www.infowine.com/intranet/libretti/libretto2572-01-1.pdf>
- Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(2), 67–87. <https://www.ajevonline.org/content/52/2/67>
- Carrau, F, Dellacassa, E, Boido, E, Medina, K, Valera, M, Fariña, L, Perez, G, Martin, V, Alvarez-Valin, F, Balestrazzi, L. Biology and physiology of *Hanseniaspora vineae*: metabolic diversity and increase flavour complexity for food fermentation, *FEMS Yeast Research*, Volume 23, 2023, foad010, <https://doi.org/10.1093/femsyr/foad010>.

- Cerón Bonilla, M. 2008. Extracción, caracterización y estabilidad de antocianinas y otros compuestos antioxidantes obtenidos a partir de zarzamora. Tesis Licenciatura. Ingeniería de Alimentos. Departamento de Ingeniería Química y Alimentos, Escuela de Ingeniería y Ciencias, Universidad de las Américas Puebla. Mayo. [http://catarina.udlap.mx/u\\_dl\\_a/tales/documentos/lia/ceron\\_b\\_m/](http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lia/ceron_b_m/)
- Dalmasso, L (2020) Microbiología cervecera: manual teórico práctico. Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de La Pampa, Argentina. Cap6.9.3:103-105. [https://repo.unlpam.edu.ar/bitstream/handle/unlpam/7356/lb-dalmic020\\_c.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repo.unlpam.edu.ar/bitstream/handle/unlpam/7356/lb-dalmic020_c.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Doran, P. M. (2013). *Bioprocess engineering principles* (2nd ed.). Academic Press.
- Duarte, W. F., Dias, D. R., Oliveira, J. M., Teixeira, J. A., Silva, J. B. A., & Schwan, R. F. (2010). Characterization of different fruit wines produced from tropical and temperate fruits. *LWT - Food Science and Technology*, 43(7), 1153–1159. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.03.012>
- Engel, S. R., Dietrich, F. S., Fisk, D. G., Binkley, G., Balakrishnan, R., Costanzo, M. C., Hitz, B. C., Karra, K., Nash, R. S., Weng, S., Wong, E. D., Lloyd, P., Skrzypek, M. S., Miyasato, S. R., Simison, M., Cherry, J. M. (2014). The reference genome sequence of *Saccharomyces cerevisiae*: Then and now. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 4(3), 389–398. <https://doi.org/10.1534/g3.113.008995>
- “Enología y Biotecnología de las fermentaciones”(2022). Manual de Prácticas. Montevideo, Uruguay: Facultad de Química de la UDELAR.
- Espino, G (2014) Antocianinas, los otros pigmentos del reino vegetal. UBUSciencia, Blog, Universidad de Burgos, España. <https://ubusciencia.blogspot.com/2014/01/antocianinas-los-otros-pigmentos-del.html>
- Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey, Y. A., Wangila, G. W., & Walker, R. B. (2010). Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin–Ciocalteu reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(14), 8139–8144. <https://doi.org/10.1021/jf1005935>
- Fernández-Fernández, A. M., Iriondo-DeHond, A., Dellacassa, E., Medrano-Fernandez, A., & del Castillo, M. D. (2019). Assessment of antioxidant, antidiabetic, antiobesity, and anti-inflammatory properties of a Tannat winemaking by-product. *European Food Research and Technology*, 245(8), 1539–1551. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03252-w>
- Finn, C. E. (2008). *Rubus breeding*. En J. F. Hancock (Ed.), *Temperate fruit crop breeding: Germplasm to genomics* (pp. 249–312). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6907-9\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6907-9_8)

- Fugelsang, K.C. and Edwards, C.G. (2007). Wine Microbiology. Practical applications and procedures., Edn. 2nd. (Springer, USA).
- García.M, Quintero. R López-Mungía. A, Ed Limusa, (1993) Biotecnología alimentaria. Cap9: 313-314.
- García-Herrera, P., Morales, P., Fernández-Ruiz, V., Sánchez-Mata, M. C., Cámara, M., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C. (2019). Nutritional and phytochemical composition of blackberry (*Rubus fruticosus* L.) beverages fermented with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chemistry*, 294, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.027>
- Garzón, G (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos. *Acta biol.Colomb.* vol.13 no.3. Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia
- Glories, Y. (1984). La couleur des vins rouges. 2e partie: Mesure, origine et interprétation. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, 18(4), 253–271.  
<https://doi.org/10.20870/oeno-one.1984.18.4.1231>
- Graham, J., Woodhead, M., & Smith, K. (2011). Current status and future prospects for *Rubus* breeding. *Horticulture Research*, 38(2), 1–18
- Hall, H. K., Stanley, C. J., & Stephens, M. J. (2005). Breeding and genetics of *Rubus*. *Acta Horticulturae*, 694, 77–86. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.694.11>
- Henschke, P. A., & Jiranek, V. (1993). Yeast—Metabolism of nitrogen compounds. En G. H. Fleet (Ed.), *Wine microbiology and biotechnology* (pp. 77–164). Chur, Switzerland: Harwood Academic Publishers.
- Hernández, A, Ochoa, Y, Cerna, E, Delgado, J, Beltrán, M, Hernández, O, & Tapia-Vargas, L. (2019). Dinámica del crecimiento in vitro de *Phytophthora cinnamomi* en medios de cultivo alternativos. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10 (spe23), 331-338. Epub 20 de noviembre de 2020. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i23.2032>. PF. Rev. Mex. Cienc. Agríc vol.10 spe 23 Texcoco sep./nov. 2019 Epub 20-Nov-2020.
- Hernández, D, Gutierrez, R (2016). V Congreso Tequio FIR Artesanal. Pág 86-98. [https://www.uv.mx/congreso-tequio/files/2017/05/LIBRO\\_VFIR\\_2016.pdf#page=96](https://www.uv.mx/congreso-tequio/files/2017/05/LIBRO_VFIR_2016.pdf#page=96)
- Ibáñez, A, Franco, O, Becerril, E, Ruiz, C, Reyes, D. (2006). Manejo del cultivo de zarzamora en la sierra nororiental del estado de Puebla. <https://www.researchgate.net/publication/301584070>
- International Organization for Standardization. (1977). ISO 3591: Sensory analysis — Apparatus — Wine-tasting glass. ISO.
- INIA, Serie de Actividades de Difusión No. 286, (2002). (<http://www.inia.org.uy/online/site/52126I1.php>).
- Jackson, R. S. (2014). Wine science: Principles and applications (4th ed.). Academic Press

- Jolly, N. P., Varela, C., & Pretorius, I. S. (2014). Not your ordinary yeast: Non-Saccharomyces yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Research*, 14(2), 215–237. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12111>
- Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., y Lim, S. M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & Nutrition Research*, 61(1).
- Leyva, D (2009). Determinación de antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante en licores y fruto de mora . Universidad tecnológica de la mixteca. [http://jupiter.utm.mx/~tesis\\_dig/10876.pdf](http://jupiter.utm.mx/~tesis_dig/10876.pdf)
- Liu, P. T., Lu, L., Duan, C. Q., & Yan, G. L. (2018). The contribution of non-Saccharomyces yeasts to wine aroma and flavour. *Food Research International*, 110, 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.001>
- López de la Maza, L., Zumalacárregui de Cárdenas, L., & Pérez Ones, O. (2019). Análisis de componentes principales aplicado a la fermentación alcohólica. *Revista Científica De La UCSA*, 6(2), 11–19. Recuperado a partir de <https://revista.ucsa-ct.edu.py/ojs/index.php/ucsa/article/view/13>
- Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2021). *Brock biology of microorganisms* (16th ed.). Pearson.
- Manzanares, P., Rojas, V., Genovés, S., & Vallés, S. (2000).  $\beta$ -Glucosidase activity in wine yeasts: Application in enology. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(7), 502–508. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00147-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00147-6)
- Martin, V. (2016). *Hanseniaspora vineae: caracterización y su uso en la vinificación* TESIS DOCTORAL.
- Martinez, Z. Tesis (2017), “Análisis financiero de los factores del fracaso en las empresas productoras de Zazmora establecidas en los Reyes, Michoacán”
- Medina, K., et al. (2023). *Impact of Hanseniaspora vineae in alcoholic fermentation and ageing on lees of high-quality white wine*. *Fermentation*, 6(3), 66. <https://doi.org/10.3390/fermentation6030066> (sobre baja acidez y perfiles florales) [sciencedirect.com/+8pmc.ncbi.nlm.nih.gov/+8mdpi.com/+8](https://www.sciencedirect.com/+8pmc.ncbi.nlm.nih.gov/+8mdpi.com/+8)
- Morata, A., Escott, C., Loira, I., Del Fresno, J. M., González, C., & Suárez-Lepe, J. A. (2018). Contribution of non-Saccharomyces yeasts to wine freshness. A review. *Biotechnology Advances*, 36(6), 1503–1512. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.06.011>
- Morata, A., Loira, I., Vejarano, R., Bañuelos, M. A., Sanz, P. D., Otero, L., & Suárez-Lepe, J. A. (2019). Grape processing and the impact on wine phenolic composition. *Food Research International*, 121, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.03.038>

- Nelson, L. Cox, M, (2006), Lehninger, "Principios de Bioquímica", 14:525-540
- Nelson, L. Cox, M (2017). Lehninger. Principios de bioquímica (7ª ed.). Omega
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). (2002). Composición de alimentos. Manual de referencia revisado. FAO. <https://www.fao.org/3/y4709s/y4709s00.htm>
- Ortiz Vásquez, R. (2021). Bebida tipo alcohol semiseco a partir de la fermentación de zarzamora (*Rubus fruticosus*) a diferente concentración de levadura y sacarosa . Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas. <https://repositorio.untrm.edu.pe/handle/20.500.14077/2533>
- Perez, G, Dibernardi, F, Boido, E, Carrau, F. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology (2020) 47:1133–1140. <https://doi.org/10.1007/s10295-020-02310-7>
- Pérez-Magariño, S., & González-San José, M. L. (2004). Polyphenols and colour variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. *Food Chemistry*, 96(2), 197–208
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2006). Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications (Vol. 1). John Wiley & Sons.
- Rivas Cancino. G (2016). Manejo y producción forzada del cultivo de zarzamora <https://www.intagri.com/articulos/frutillas/manejo-y-produccion-forzada-del-cultivo-de-zarzamora>
- Ruiz, J. (2023), Características y guía de cultivo de la zarzamora, Agromática. <https://www.agromatica.es/cultivo-de-la-zarzamora/>.
- Singleton, V.L., R.M. Orthofer y LamuelaRaventós. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* (299): 152- 178.
- Skrovankova, S., Sumczynski, D., Mlcek, J., Jurikova, T., & Sochor, J. (2015). Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. *Journal of Functional Foods*, 13, 104–122. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.006>
- Stanbury, P. F., Whitaker, A., & Hall, S. J. (2017). Principles of fermentation technology (3rd ed.). Butterworth-Heinemann.
- Steensels, J., & Verstrepen, K. J. (2014). Taming wild yeast: Potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations. *Annual Review of Microbiology*, 68, 61–80. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091213-113025>
- Soria.J (2002). REUNION TECNICA El cultivo del arándano y otros berries en el Uruguay
- Strik, B. C., Clark, J. R., Finn, C. E., & Bañados, M. P. (2007). Worldwide production of blackberries. *HortTechnology*, 17(2), 205–213.

- Suarez Ospina, D. Y Morales Hernández, Y. (2018) Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas. Semilleros: Formación Investigativa. 4(1), 7-14 Retrieved from <http://hdl.handle.net/20.500.11839/7731>
- Sullca, V. Guevara, A. (2013). Elaboración de néctar de zarzamora (*Rubus fruticosus* L). *Scientia Agropecuaria* , 4 (2), 101–109. <https://www.redalyc.org/pdf/3576/357633705003.pdf>
- Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. A., & Pretorius, I. S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 139–173. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00285.x>
- Tamang, J. P., Watanabe, K., & Holzapfel, W. H. (2020). Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(1), 118–157. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12520>
- Vázquez, J. Dacosta, O (2007), Fermentación alcohólica: una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas, <https://www.scielo.org.mx/pdf/iit/v8n4/v8n4a4.pdf>
- Viana, F., Gil, J. V., Vallés, S., & Manzanares, P. (2009). Increasing the levels of fruity aroma in wines using *Hanseniaspora vineae* yeast for fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 135(2), 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.020>
- Villaño, D., Fernández-Pachón, M. S., Moyá, M. L., Troncoso, A. M., & García-Parrilla, M. C. (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Food Chemistry*, 101(2), 492–501. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.047>
- Wallerstein Laboratory. (2020). WL Nutrient Agar (WLN) – *Product information sheet*. Merck KGaA.
- Walker, G.M.; Stewart, G.G. *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages* **2016**, 2, 30. <https://doi.org/10.3390/beverages2040030>
- Waterhouse, A. L., Sacks, G. L., & Jeffery, D. W. (2016). *Understanding wine chemistry*. John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781118730720>
- Zhao, Y.-S., Eweys, A. S., Zhang, J.-Y., Zhu, Y., Bai, J., Darwesh, O. M., Zhang, H.-B., & Xiao, X. (2021). Fermentation affects the antioxidant activity of plant-based food material through the release and production of bioactive components. *Antioxidants*, 10(12), Article 2004. <https://doi.org/10.3390/antiox10122004> [onlinelibrary.wiley.com](https://onlinelibrary.wiley.com)

## 7. Anexo

### Anexo 1. Curvas HPLC para glicerol, alcohol y azúcares

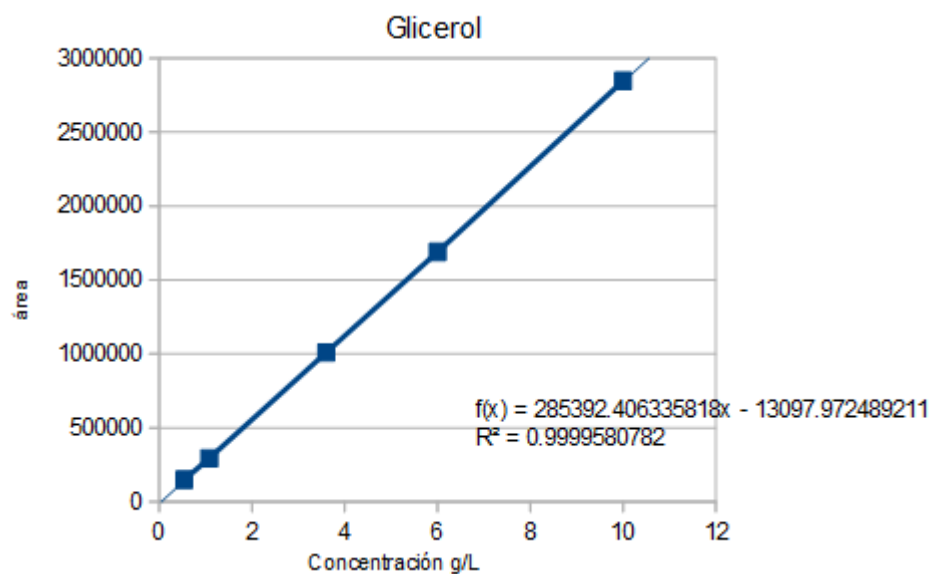


Figura 1a. Curva de glicerol por HPLC para interpolación de datos

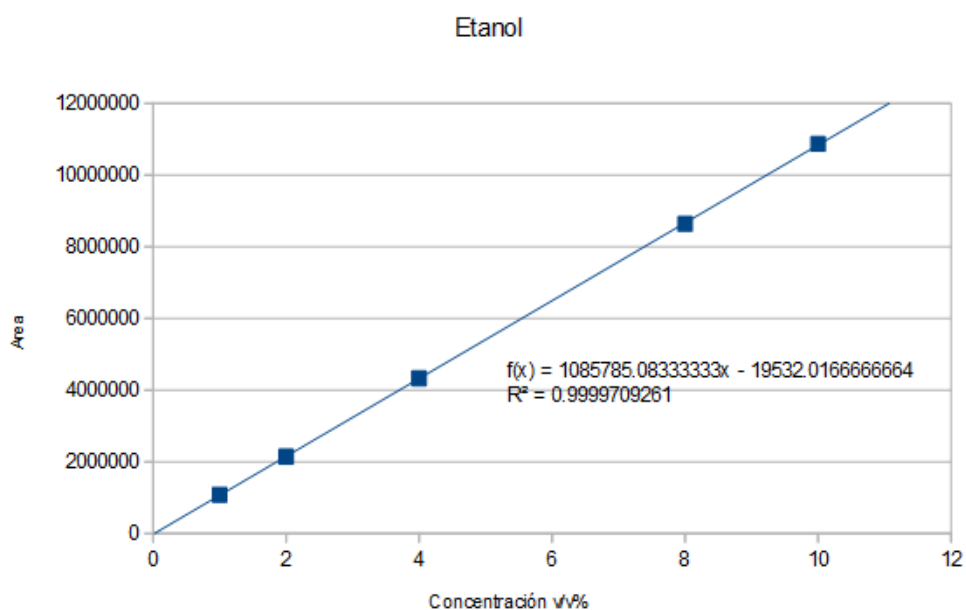


Figura 1b. Curva de etanol por HPLC para interpolación de datos

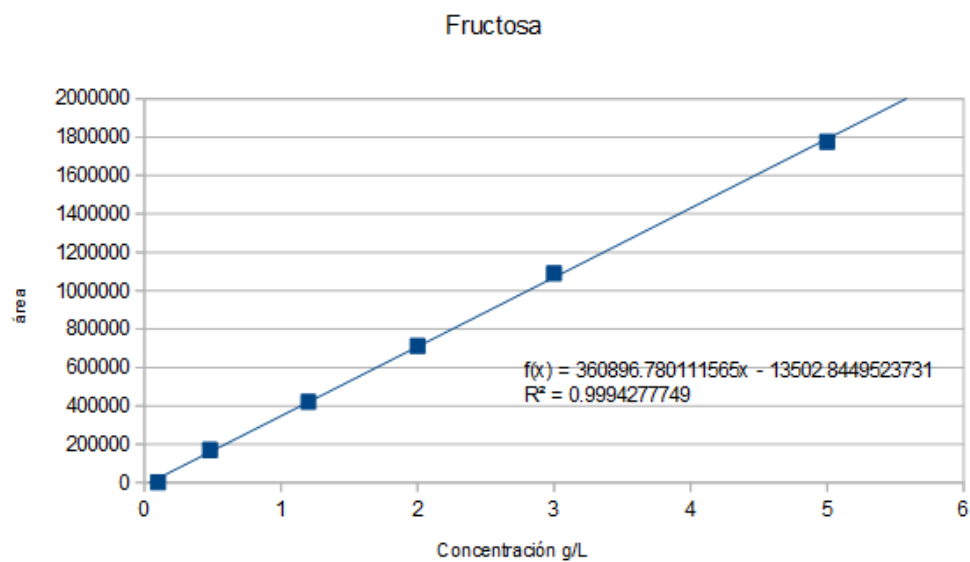


Figura 1c. Curva de fructosa por HPLC para interpolación de datos

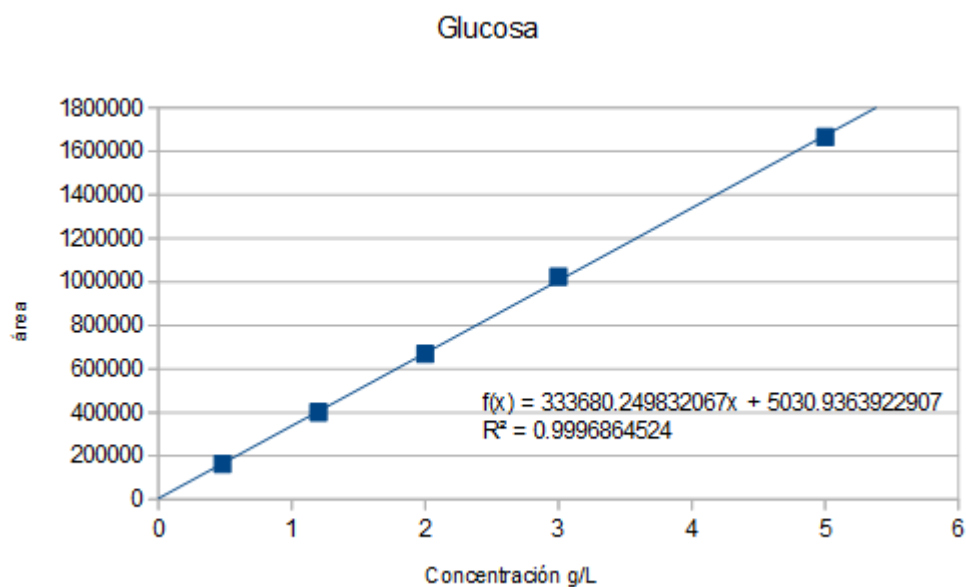


Figura 1d. Curva de glucosa por HPLC para interpolación de datos

**Anexo 2. Análisis de varianzas en bebidas fermentadas****Análisis de la varianza**

| Variable     | N | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV   |
|--------------|---|----------------|-------------------|------|
| Acidez total | 9 | 0.59           | 0.45              | 3.85 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.     | SC   | gl | CM   | F    | p-valor |
|----------|------|----|------|------|---------|
| Modelo   | 1.22 | 2  | 0.61 | 4.25 | 0.0707  |
| Levadura | 1.22 | 2  | 0.61 | 4.25 | 0.0707  |
| Error    | 0.86 | 6  | 0.14 |      |         |
| Total    | 2.07 | 8  |      |      |         |

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.75547

Error: 0.1430 gl: 6

Levadura Medias n E.E.

|    |       |   |      |     |
|----|-------|---|------|-----|
| HV | 9.31  | 3 | 0.22 | A   |
| LT | 9.97  | 3 | 0.22 | A B |
| SC | 10.16 | 3 | 0.22 | B   |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

Figura anexo 2a. Acidez total

**Análisis de la varianza**

| Variable | N | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV   |
|----------|---|----------------|-------------------|------|
| pH AT    | 9 | 0.77           | 0.69              | 0.77 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.     | SC      | gl | CM      | F    | p-valor |
|----------|---------|----|---------|------|---------|
| Modelo   | 0.01    | 2  | 0.01    | 9.97 | 0.0124  |
| Levadura | 0.01    | 2  | 0.01    | 9.97 | 0.0124  |
| Error    | 3.9E-03 | 6  | 6.6E-04 |      |         |
| Total    | 0.02    | 8  |         |      |         |

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.05115

Error: 0.0007 gl: 6

Levadura Medias n E.E.

|    |      |   |      |     |
|----|------|---|------|-----|
| SC | 3.28 | 3 | 0.01 | A   |
| LT | 3.33 | 3 | 0.01 | A B |
| HV | 3.37 | 3 | 0.01 | B   |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

Figura anexo 2b. pH

**Análisis de la varianza**

| Variable       | N | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV   |
|----------------|---|----------------|-------------------|------|
| Acidez volátil | 9 | 0.81           | 0.74              | 4.50 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.     | SC      | gl | CM      | F     | p-valor |
|----------|---------|----|---------|-------|---------|
| Modelo   | 4.0E-03 | 2  | 2.0E-03 | 12.60 | 0.0071  |
| Levadura | 4.0E-03 | 2  | 2.0E-03 | 12.60 | 0.0071  |
| Error    | 9.4E-04 | 6  | 1.6E-04 |       |         |
| Total    | 4.9E-03 | 8  |         |       |         |

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.02502

Error: 0.0002 gl: 6

Levadura Medias n E.E.

|    |      |   |      |   |
|----|------|---|------|---|
| SC | 0.25 | 3 | 0.01 | A |
| HV | 0.29 | 3 | 0.01 | B |
| LT | 0.30 | 3 | 0.01 | B |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

Figura anexo 2c. Acidez volátil

**Análisis de la varianza**

| Variable    | N | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV    |
|-------------|---|----------------|-------------------|-------|
| polifenoles | 9 | 0.82           | 0.76              | 12.69 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.     | SC   | gl | CM   | F     | p-valor |
|----------|------|----|------|-------|---------|
| Modelo   | 4.05 | 2  | 2.03 | 13.50 | 0.0060  |
| Levadura | 4.05 | 2  | 2.03 | 13.50 | 0.0060  |
| Error    | 0.90 | 6  | 0.15 |       |         |
| Total    | 4.95 | 8  |      |       |         |

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.77392

Error: 0.1501 gl: 6

Levadura Medias n E.E.

|    |      |   |      |   |
|----|------|---|------|---|
| LT | 2.11 | 3 | 0.22 | A |
| SC | 3.44 | 3 | 0.22 | B |
| HV | 3.61 | 3 | 0.22 | B |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

Figura anexo 2d. Polifenoles

**Análisis de la varianza**

| Variable | N | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV   |
|----------|---|----------------|-------------------|------|
| ABTS     | 9 | 0.50           | 0.34              | 6.56 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.     | SC     | gl | CM     | F    | p-valor |
|----------|--------|----|--------|------|---------|
| Modelo   | 266.13 | 2  | 133.07 | 3.03 | 0.1234  |
| Levadura | 266.13 | 2  | 133.07 | 3.03 | 0.1234  |
| Error    | 263.84 | 6  | 43.97  |      |         |
| Total    | 529.98 | 8  |        |      |         |

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=13.24859

Error: 43.9738 gl: 6

Levadura Medias n E.E.

|    |        |   |      |   |
|----|--------|---|------|---|
| SC | 94.26  | 3 | 3.83 | A |
| LT | 101.43 | 3 | 3.83 | B |
| HV | 107.57 | 3 | 3.83 | B |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

Figura anexo 2e. ABTS

**Análisis de la varianza**

| Variable | N | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV    |
|----------|---|----------------|-------------------|-------|
| Glicerol | 9 | 0.47           | 0.29              | 11.56 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.     | SC   | gl | CM   | F    | p-valor |
|----------|------|----|------|------|---------|
| Modelo   | 0.55 | 2  | 0.28 | 2.63 | 0.1510  |
| Levadura | 0.55 | 2  | 0.28 | 2.63 | 0.1510  |
| Error    | 0.63 | 6  | 0.11 |      |         |
| Total    | 1.19 | 8  |      |      |         |

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.64837

Error: 0.1053 gl: 6

Levadura Medias n E.E.

|    |      |   |      |   |
|----|------|---|------|---|
| LT | 2.54 | 3 | 0.19 | A |
| HV | 2.75 | 3 | 0.19 | A |
| SC | 3.14 | 3 | 0.19 | A |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

Figura anexo 2f. Glicerol

**Análisis de la varianza**

| Variable | N | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV    |
|----------|---|----------------|-------------------|-------|
| Alcohol  | 9 | 0.12           | 0.00              | 11.06 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.     | SC   | gl | CM   | F    | p-valor |
|----------|------|----|------|------|---------|
| Modelo   | 0.09 | 2  | 0.04 | 0.40 | 0.6889  |
| Levadura | 0.09 | 2  | 0.04 | 0.40 | 0.6889  |
| Error    | 0.66 | 6  | 0.11 |      |         |
| Total    | 0.75 | 8  |      |      |         |

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.66388

Error: 0.1104 gl: 6

| Levadura | Medias | n | E.E.   |
|----------|--------|---|--------|
| HV       | 2.87   | 3 | 0.19 A |
| SC       | 3.02   | 3 | 0.19 A |
| LT       | 3.11   | 3 | 0.19 A |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

Figura anexo 2g. Alcohol

**Análisis de la varianza**

| Variable | N | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV   |
|----------|---|----------------|-------------------|------|
| A420     | 9 | 0.81           | 0.75              | 4.21 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.     | SC   | gl | CM      | F     | p-valor |
|----------|------|----|---------|-------|---------|
| Modelo   | 0.03 | 2  | 0.02    | 12.71 | 0.0070  |
| Levadura | 0.03 | 2  | 0.02    | 12.71 | 0.0070  |
| Error    | 0.01 | 6  | 1.3E-03 |       |         |
| Total    | 0.04 | 8  |         |       |         |

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.07270

Error: 0.0013 gl: 6

| Levadura | Medias | n | E.E.   |
|----------|--------|---|--------|
| HV       | 0.78   | 3 | 0.02 A |
| LT       | 0.90   | 3 | 0.02 B |
| SC       | 0.91   | 3 | 0.02 B |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

Figura anexo 2h.1 Color

**Análisis de la varianza**

| Variable | N | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV   |
|----------|---|----------------|-------------------|------|
| A520     | 9 | 0.85           | 0.80              | 4.51 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.     | SC   | gl | CM   | F     | p-valor |
|----------|------|----|------|-------|---------|
| Modelo   | 0.32 | 2  | 0.16 | 17.30 | 0.0032  |
| Levadura | 0.32 | 2  | 0.16 | 17.30 | 0.0032  |
| Error    | 0.06 | 6  | 0.01 |       |         |
| Total    | 0.37 | 8  |      |       |         |

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.19200

Error: 0.0092 gl: 6

| Levadura | Medias | n | E.E.   |
|----------|--------|---|--------|
| HV       | 1.87   | 3 | 0.06 A |
| LT       | 2.24   | 3 | 0.06 B |
| SC       | 2.29   | 3 | 0.06 B |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

Figura anexo 2h2. Color

**Análisis de la varianza**

| Variable | N | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV    |
|----------|---|----------------|-------------------|-------|
| A620     | 9 | 0.52           | 0.36              | 12.82 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.     | SC      | gl | CM      | F    | p-valor |
|----------|---------|----|---------|------|---------|
| Modelo   | 6.5E-04 | 2  | 3.3E-04 | 3.28 | 0.1089  |
| Levadura | 6.5E-04 | 2  | 3.3E-04 | 3.28 | 0.1089  |
| Error    | 6.0E-04 | 6  | 1.0E-04 |      |         |
| Total    | 1.3E-03 | 8  |         |      |         |

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.01993

Error: 0.0001 gl: 6

| Levadura | Medias | n | E.E.     |
|----------|--------|---|----------|
| HV       | 0.07   | 3 | 0.01 A   |
| SC       | 0.08   | 3 | 0.01 A B |
| LT       | 0.09   | 3 | 0.01 B   |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

Figura anexo 2h3 Color

**Anexo 3. Todos los valores de colorimetría, por método de Glories y MCLlaine****Tabla 3a. Medidas de absorbancia para cada tratamiento con la dilución McLaine con celda de 1cm de paso.**

| MEDIDAS DE ABSORBANCIA CON DILUCIÓN DE MCLLAINE CON CELDAS DE 1CM |        |        |
|-------------------------------------------------------------------|--------|--------|
| LEVADURA                                                          | 420 nm | 620 nm |
| LT1                                                               | 0.9398 | 0.1019 |
| LT2                                                               | 0.9222 | 0.0953 |
| LT3                                                               | 0.8517 | 0.0698 |
| HV1                                                               | 0.75   | 0.0704 |
| HV2                                                               | 0.7596 | 0.0648 |
| HV3                                                               | 0.8223 | 0.0698 |
| SC1                                                               | 0.9042 | 0.0747 |
| SC2                                                               | 0.8966 | 0.0763 |
| SC3                                                               | 0.9274 | 0.0774 |

**Tabla 3b. Medidas de absorbancia para cada tratamiento con dilución McLane en celda de 0.1 cm de paso.**

| MEDIDAS DE ABSORBANCIA CON DILUCIÓN DE MCLLAINE CON CELDAS DE 0.1 CM |        |
|----------------------------------------------------------------------|--------|
| LEVADURA                                                             | 520 nm |
| LT1                                                                  | 0.2343 |
| LT2                                                                  | 0.2235 |
| LT3                                                                  | 0.2130 |
| HV1                                                                  | 0.1780 |
| HV2                                                                  | 0.1820 |
| HV3                                                                  | 0.2000 |
| SC1                                                                  | 0.2266 |

| <b>MEDIDAS DE ABSORBANCIA CON DILUCIÓN<br/>DE MCLLAINE CON CELDAS DE 0.1 CM</b> |               |
|---------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>LEVADURA</b>                                                                 | <b>520 nm</b> |
| <b>LT1</b>                                                                      | <b>0.2343</b> |
| <b>LT2</b>                                                                      | <b>0.2235</b> |
| <b>SC2</b>                                                                      | <b>0.2257</b> |
| <b>SC3</b>                                                                      | <b>0.2350</b> |