



ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar

ISSN: 0138-6204

revista@icidca.edu.cu

Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar
Cuba

Alvarez Zequeira, Xiomara

Producción controlada de congéneres en la producción de aguardiente mediante manipulación genética de microorganismos

ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, vol. XL, núm. 3, septiembre-diciembre, 2006, pp. 35-43

Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar
Ciudad de La Habana, Cuba

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120665005>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto



Producción controlada de congéneres en la producción de aguardiente mediante manipulación genética de microorganismos

Xiomara Alvarez Zequeira

Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA)
e.mail: xiomara.alvarez@icidca.edu.cu

RESUMEN

Se realizó un estudio bibliográfico para analizar los diferentes aspectos que deben tenerse presentes para llevar a cabo la producción controlada de congéneres en la elaboración de aguardiente mediante manipulación genética de microorganismos. Se hace referencia a medios de cultivos, cultivos mixtos, influencia de la temperatura y del pH, enzimas que intervienen en la fermentación alcohólica, mutantes deficientes respiratorios petite, levaduras killer y su vinculación con cepas alcohólicas, etc. Se analiza el empleo de cepas de levaduras alcohólicas mutantes con una producción ya sea incrementada o disminuida para los congéneres en la fabricación de aguardiente.

Palabras clave: microorganismos, *Saccharomyces cerevisiae*, mutantes petite, levadura killer, alcohol, congéneres

ABSTRACT

A biographical study was carried out to analyze the different aspects involved in the controlled production of congeners in the manufacturing of liquor by means of genetic manipulation of microorganisms. They are analyzed culture media, mixed cultures, the influence of the temperature and pH, alcoholic fermentation, enzymes, deficient petite mutants, killer yeast and their relation with alcohol strains, etc. It is also treated the use of mutants alcohol producing with a increased or diminished production of congeners.

Key words: microorganisms, *Saccharomyces cerevisiae*, petite mutants, killer yeast, alcohol, congeners.

INTRODUCCIÓN

Durante la fermentación alcohólica, junto con el etanol, se producen los alcoholes superiores que son separados en forma de aceite de fusel. La separación de los mismos en el proceso de la destilación requiere de técnicas especiales costosas, por lo que otro método de disminuir el fusel oil en el destilado sería reducir su concentración en los mostos previniendo su producción durante el curso de la fermentación. Al respecto la literatura reporta algunos trabajos utilizando cepas de levaduras alcohólicas mutantes (1,2).

Actualmente, en Cuba se plantea un programa de actualización de la industria alcohólica con relación a sus posibilidades de lograr el mejoramiento del proceso fermentativo y particularmente en la producción de bebidas alcohólicas destiladas que puedan competir con el mercado internacional. En este sentido influyen la calidad y tipo de materia prima empleada, las condiciones de fermentación, el proceso de destilación, el empleo de cepas de alta producción y la tolerancia al etanol.

Además del alcohol, la producción de aguardiente reviste una especial importancia ya que es la materia prima fundamental para la producción de bebidas alcohólicas destiladas, renglón que se está incrementando en nuestro país por sus posibilidades de exportación.

La calidad del aguardiente está determinada por la composición de los microcomponentes y de otros compuestos que se forman durante el proceso de la fermentación. Estos microcomponentes comprenden ésteres, aldehídos, ácidos orgánicos, alcoholes superiores, metanol, fenoles, compuestos nitrogenados y azufrados, etc. Se conoce que los compuestos volátiles no etanol son de gran importancia pues le suministran el aroma y el bouquet a rones y aguardientes (3,4,5,6).

Microorganismos utilizados en la fermentación alcohólica

Entre los microorganismos que son capaces de llevar a cabo la fermentación alcohólica se encuentran: *Saccharomyces*, *Torulopsis*, *Candida* y algunas bacterias, así como a partir de hongos filamentosos. La fermentación alcohólica más conocida es

realizada por levaduras del género *Saccharomyces* (7,8,9). Entre las bacterias más utilizadas en la fermentación alcohólica tenemos *Zymomonas mobilis* (10,11).

Se reporta en la literatura (12,13,14) a las levaduras como los microorganismos más utilizados para la producción de alcohol (etanol) por la vía fermentativa, debido a que producen un mejor proceso de separación de la levadura después de la fermentación, además el contenido de toxinas que producen es muy inferior a otros microorganismos.

Cultivos mixtos utilizados en la fermentación alcohólica

El empleo de cultivos mixtos de levaduras y algunos géneros bacterianos, con el objetivo de mejorar las características organolépticas de las bebidas destiladas son reportados (15,16,17,18,19).

Con el objetivo de buscar formación de diferentes microcomponentes mayoritarios tales como alcoholes superiores, aldehídos y otros ésteres, presentes en los destilados (20), estudiaron el proceso de fermentación alcohólica usando mieles, empleando levaduras *Sacch. cerevisiae*, y *Sacch. bayanences*. También emplearon cultivos mixtos utilizando bacterias del género *Bacillus*, *Lactobacillus* y *Clostridium*. Estos autores hacen énfasis en lo conveniente de seleccionar la cepa de levadura adecuada para mejorar las cualidades organolépticas de los destilados, exponiendo que las bacterias constituyen una flora auxiliar en la fermentación y que juegan un papel importante en las características organolépticas en rones.

Ciertos autores analizaron (18) como aspecto más novedoso en la industria cubana el empleo de cultivos mixtos con bacterias aisladas e identificadas de mieles y vinazas para la producción de congéneres mayoritarios durante la fermentación, además, se plantea la necesidad de búsqueda de procedimientos tecnológicos de avanzada para mejorar la calidad de la batición fermentada, y del destilado que aseguren la obtención de un aguardiente de calidad para la producción de bebidas destiladas.

Investigadores del ICIDCA estudiaron (21) a escala de laboratorio la influencia de un cultivo mixto de levadura de *Sacch. cerevisiae* *Schiz. pombe*, analizando las propiedades organolépticas del aguardiente

obtenido, logrando aguardiente con un grado alcohólico mayor con el cultivo mixto que con las cepas puras y el inóculo de *Schz pombe*; a las 12 horas de iniciada la fermentación y además, obtuvieron un aumento considerable de los alcoholes superiores y acidez en la batición.

La influencia de cultivos mixtos de levaduras en 25 litros de fermentación fue estudiada (22), así como la calidad de la destilación y propiedades organolépticas del aguardiente obtenido.

Han sido investigadas (23) las características del *Clostridium saccharobutyricum* y su comportamiento en la fermentación, demostrándose que acelera la formación de alcohol durante la fermentación. Se encontró además que el mejor rendimiento de ron y su aroma fue obtenido cuando la relación de levadura a bacterias es de 1:5.

Otros investigadores (24) estudiaron 12 cepas diferentes de las especies de *Lactobacillus* con capacidad heterofermentativa en medio de miel para la producción de alcohol, calculando la velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación; se determinó la tolerancia de estas bacterias a diferentes concentraciones de etanol, encontrándose que las cepas *Lactobacillus fermentum* 11-2 y *Lactobacillus brevis* 4121, mostraron una mayor tolerancia a concentraciones de etanol al 8 %. Se recomienda en este trabajo el empleo de cultivos mixtos para producir aguardiente.

Productos minoritarios de la fermentación alcohólica

Alcohol etílico: Constituyente fundamental, que hasta hace poco se utilizaba como parámetro para determinar la calidad del destilado. Es un líquido incoloro, de olor agradable y de sabor ardiente. Se mezcla con el agua en cualquier proporción y es un buen solvente para muchas sustancias colorantes y aromatizantes.

Ácidos orgánicos: Su presencia en cantidades modestas favorece, tanto el gusto como el perfume de los aguardientes.

Ésteres: Son numerosísimos y favorecen las más extraordinarias sensaciones olfativas, tanto positivas como negativas. Entre ellos es mayoritario el acetato de etilo, que no

favorece sensaciones exaltantes, pero que es útil porque inhibe la percepción de los aldehídos insaturados y exalta la percepción de algunos olores.

Aldehídos: Se dividen en saturados e insaturados. Los primeros dan lugar a sensaciones herbáceas, mientras que los segundos dan sensaciones florales, aunque también son responsables de sensaciones a rancio e incluso a sudor.

Terpenos: Organolépticamente son responsables de una poderosa serie de perfumes, y son distintivos destilados obtenidos de variedades de vid con frutos aromáticos.

PARÁMETROS BIOTECNOLÓGICOS

Medios de Cultivos

YPG (g/L): Medio de mantenimiento de las cuñas. (Extracto de Levaduras 10, Peptona 10, Glucosa 20); pH 4,6.

Medio de Propagación (M1) (g/L) Miel diluida Azúcares Reductores Totales (ART) 40 p/v, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 1,0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3,0 pH 4-4,5.

Medio de Producción (M2) (g/L). Miel diluida 1:1 defangada, Azúcares Reductores Totales (ART) 150 p/v, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0,8; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2 agua corriente c.s. p 1 litro, pH, 5,6.

Etapas de Fermentación del cultivo.

Etapas de Propagación del cultivo.

Determinación de congéneres

La presencia de compuestos minoritarios (acetato de etilo, acetaldehído, alcohol propílico, isobutanol y alcohol isoamílico) en la batición, se pueden cuantificar mediante cromatografía gaseosa, empleando una columna SP 1000, como gas portador argón a un flujo de 30 mL/min, con detector FID siguiendo la técnica desarrollada por González y otros (25).

Influencia de la Miel en la fermentación alcohólica

La miel, sustrato compuesto mayoritariamente por azúcares en forma de glucosa, fructosa y sacarosa, además de poseer otros compuestos como aminoácidos, vitaminas y minerales que enriquecen su valor nutritivo, favorece el desarrollo de una gran variedad de especies microbianas.

Las mieles cubanas han sido estudiadas por diferentes investigadores (26,27,28).

La literatura reporta un estudio (29) sobre la influencia que tiene la calidad de las mieles en el proceso de producción de aguardientes. De estos resultados se concluye que las mieles almacenadas bajan su calidad y producen baticiones con mayores contenidos de ácidos, aldehidos y alcoholes superiores.

Tolerancia al alcohol

La tolerancia al alcohol ha sido investigada por diferentes autores, (30,31) quienes evaluaron la tolerancia al alcohol en 26 cepas, basándose en la capacidad de crecimiento de las cepas en 10 mL de un medio que contiene de 1 a 14 % (v/v) de etanol. Partiendo de este trabajo las cepas fueron subdivididas en tres categorías: pobre (3 al 6 %), moderado (6 al 10 %) y alta (10 al 13 %). En este caso no se tomó en cuenta la evaporación del alcohol y se determinó que la determinación de la tolerancia estaba afectada. Además, se evaluaron diferentes factores que influyen en la tolerancia de las cepas al alcohol como la temperatura, pérdida de etanol por evaporación, concentración de sustrato, etc. Definieron la tolerancia al etanol como la concentración de etanol, el cual suprime el crecimiento después de 72 horas.

Influencia de la temperatura, y pH

Las cepas mesófilas de *Saccharomyces* tienen una temperatura óptima alrededor de 35 °C para su crecimiento y 37 °C para la fermentación alcohólica.

El pH óptimo de la fermentación bacteriana de etanol es más amplio: pH= 5-7

Se reportó la influencia de altas temperaturas en la fermentación como una cesación de la actividad fermentativa resultando incompleta, produciéndose bajos niveles de etanol (21,32,33).

El efecto de la temperatura y concentración celular (34) en mutante de *Sacch. cerevisiae* XA3-1, auxotrofo (leucina/isoleucina/valina) fue estudiado a las temperaturas de 30, 34 y 37 °C. En el estudio a 30 y 34 °C no se detectaron afectaciones en el perfil aromático de este mutante; a la temperatura de 37 °C se produjo una disminución marcada del propílico.

Se reportó (35), el aislamiento y selección de levaduras termotolerantes con alta producción de alcohol a partir de mieles.

La temperatura puede afectar la síntesis de los alcoholes superiores. La síntesis del alcohol isoamílico es más abundante a 35 °C y la síntesis del n-propanol es menor a 35 °C (33).

La influencia de la temperatura en la concentración de congéneres en rones, (36), fue estudiada; se manifiesta que los aguardientes recientemente destilados se depositan en barriles para lograr su añejamiento. El calentamiento a que son sometidos debe ser aproximadamente a 65 °C, no debe llegar a la ebullición, para evitar grandes pérdidas de los componentes volátiles (ésteres y aldehidos).

Otros investigadores (37) reportaron el estudio de los efectos de la temperatura y agitación sobre la concentración de compuestos volátiles en cultivos en batch. Además, estudiaron la producción de acetaldehído, acetato de etilo y alcoholes superiores en cultivos continuos. La concentración de los alcoholes superiores fue ligeramente más baja a altas temperaturas, mientras que la velocidad específica de crecimiento, aumenta con la temperatura. Reportaron un incremento en la proporción de alcoholes superiores cuando emplearon altas velocidades de agitación.

Influencia de la presión osmótica

Altas concentraciones de sustratos, pueden inhibir el crecimiento de la levadura, y la actividad fermentativa. También asociada con altos niveles de presión osmótica producen pérdida temporal en la capacidad de la levadura a formar colonias.

Aireación

En los estudios reportados por algunos autores (38), encontraron un incremento de los alcoholes superiores durante la fermentación bajo condiciones de semiaerobiosis comparado con la condición de anaerobiosis.

La influencia de la aireación (39) sobre la formación de los alcoholes superiores en la fermentación llevada a cabo por las levaduras fue analizada.

Enzimas que intervienen en la fermentación alcohólica

Los disacáridos sólo pueden ser fermentados después de haber sido transformados en hexosas, transformación llevada a cabo

por hidrolasas que se encuentran en las levaduras. Por tanto, la especie de levadura debe ser capaz de producir la enzima necesaria para la hidrólisis. De los polisacáridos el glucógeno puede ser fermentado en algunos casos por la levadura (40).

Las células de las levaduras contienen algunas hidrolasas entre otras para la hidrólisis de di y polihexosas, es decir, invertasa, maltosa, glucogenasa, melibiosa, etc. Muchas de ellas son exoenzimas como la invertasa.

Las enzimas más importantes que participan en el proceso fermentativo son: hexoquinasa y la fosfohexoquinasa, que regulan la unión del fosfato a la hexosa o fosfato de hexosa, este proceso es catalizado por fosfatasas. El fosfato que se une a la hexosa y al fosfato de hexosa; se une al éster del ácido fosfórico, el trifosfato de adenosina (TFA) que pasa a difosfato de adenosina (DFA) que puede fijar fosfato y regenerar así el (TFA). Mediante estos procesos se transporta fosfato y con ello energía a los diversos productos intermediarios del proceso fermentativo.

Una deshidrogena (oxida), la coenzima I que transporta el hidrógeno al acetaldehído que pasa a alcohol. La descarboxilasa es la enzima más característica de la fermentación alcohólica. La fermentación alcohólica y la fermentación láctica corren paralelamente hasta un estadio determinado, que es la formación del ácido pirúvico. Luego se separan los procesos.

Mejoramiento genético de cepas alcohólicas

Las levaduras utilizadas para la fabricación de ron y aguardiente deben tener características especiales, debiendo producir además de alcohol etílico, ácidos orgánicos, aldehídos, ésteres y alcoholes superiores.

Con el fin de obtener una concentración adecuada de los congéneres que le dan aroma y sabor característico al destilado, se llevó a cabo el mejoramiento genético de cepas de levaduras alcohólicas.

Se demostró (41) la posibilidad de reducir los alcoholes superiores utilizando mutantes de una cepa haploide de *Sacch. cerevisiae* obtenida en el laboratorio. Se reportó un mutante de leucina, al cual se le añadió suficiente leucina al medio de cultivo para su crecimiento, en este caso la formación de alcohol isoamílico fue reducido

al 95 %. Sin embargo, esta cepa no fue adecuada para ser utilizada en la producción de vino porque fermentaba muy lentamente, además de otros inconvenientes.

Investigadores, demostraron que el mecanismo de control por feed-back en las levaduras (42) no era una causa suficiente para una marcada reducción de los componentes del fusel oil por medio de la adición de los aminoácidos como producto final.

En estudios realizados en medio de miel clarificada (43), se reportó la obtención de un mutante XA3-1, auxotrofo, (leucina/iso-leucina/valina) que mostró una disminución de más del 10 y 20 % en la concentración de los alcoholes isobutílico e isoamílico, respectivamente, no se detectó la presencia de propanol. No tuvo afectaciones negativas en cuanto a los niveles de acetato de etilo y acetaldehído observándose incrementos en la concentración de este último. En el estudio comparativo con la cepa patrón A3, referente a su comportamiento fermentativo, este mutante mostró una velocidad de crecimiento menor.

La importancia de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en muchos procesos industriales hace que este microorganismo sea de interés en biotecnología. Se trabaja en el mejoramiento de levaduras productoras de vino y construcción de manipulaciones genéticas demostrando mejor resistencia a la situación de estrés.

La levadura sufre situaciones de estrés que afectan la productividad de la biomasa, el poder fermentativo y/o la viabilidad. En el proceso de producción de biomasa, las células de levaduras son crecidas en mieles con aireación (estrés oxidativo) para inducir un metabolismo respiratorio y un alto rendimiento de biomasa. Las células de levaduras son mantenidas en el fermentador después del agotamiento de los azúcares para motivar la producción de pequeñas cantidades de alcohol producido. Después, la biomasa es desecada para obtener el producto final: la levadura seca (estrés térmico y osmótico alta concentración de células etc.) Durante la producción de vino, las levaduras son inoculadas en los mostos en un medio con alta concentración de azúcares (estrés osmótico). Los investigadores trabajan en la selección específica de los genes estrés como marcadores de diferentes estados fisiológicos (44).

Se conoce sobre trabajos referentes al empleo de cepas de levaduras alcoholeras mutantes con una producción ya sea incrementada o disminuida para los congéneres, permitiendo reforzar sabores y característica aromática (2,5,45,46,47).

Ciertos autores reportaron (48) el aislamiento de mutantes auxotrofos de *Sacch. cerevisiae*, la mayoría de estos fueron estudiados con relación a su comportamiento sexual, tolerancia al alcohol y producción de alcohol. La tolerancia al alcohol fue determinada por fotometría y la producción de alcohol fue determinada enzimáticamente. Basados en estos resultados, dos cepas de levaduras con considerables diferencias en esas características fueron seleccionadas y cruzadas unas con otras, y la progenie fue sometida posteriormente a análisis de tetradas.

Se produjo un aumento de la producción de alcohol utilizando las nuevas cepas.

Para la producción de vino, un mutante de levadura (2) fue reportado. Este mutante, auxotrofo para leucina, presentó en la fermentación menos del 20 % del total de fusel oil y un 50 % menos de alcohol isoamílico cuando se comparó con la cepa parental. Se plantea que este mutante podría ser de importancia comercial en la preparación de material de destilación para bebidas destiladas.

Se realizó la mutagenésis con Nitrosoguanidina de las cepas de levaduras (*Sacch. carlsbergensis* y *Sacch. diastaticus*), utilizadas en destilerías. Las cepas mutantes obtenidas se emplearon en experimentos de fusión de protoplastos con la cepa *Sacch. diastaticus* (49). Algunos de los fusionantes fueron utilizados por su estabilidad en la producción de alcohol.

El mejoramiento genético en cepas de levadura *Sacch. cerevisiae* utilizadas en la producción de vino (50) fue reportado. Además, se estudió la tolerancia al etanol en el medio YEPG, conteniendo 8, 10, 12 y 14 % de etanol. El mejor resultado fue obtenido con el 12 % de etanol.

Se señala el aislamiento de mutantes auxotrofos de leucina, a partir de cepas de levaduras productoras de vino. Se utilizó el agente mutágeno Etil Metanosulfonato (EMS) (51).

Diferentes aspectos genéticos de la tolerancia alcohólica en las levaduras fueron reportados (52).

Se reportó (53), la cepa *Sacch. cerevisiae* XI, aislada a partir de un cultivo de cachaza crecido a la temperatura de 50 °C. En experimentos realizados en medio de miel clarificada a la temperatura de 37 y 40 °C para la producción de etanol, dicha cepa alcanzó 5,4 y 5,0 % de etanol, respectivamente. En el análisis del mosto fermentado, se observó una disminución de la concentración de los alcoholes superiores del 23,7 % del propanol, del 12,10 % del isobutanol cuando se comparó con la cepa patrón A3 productora de alcohol. La cepa XI, mostró un incremento en la concentración de acetaldehído y la no aparición del acetato de etilo. Esta cepa posee el carácter killer. Puede ser recomendada para la producción de bebidas alcohólicas destiladas. Además, el empleo de cepas termófilas puede: ahorrar costos de enfriamiento, conseguir velocidades de conversión más altas y reducir la contaminación.

Levaduras Killer y su vinculación con las cepas alcoholeras

El carácter killer fue descubierto (54) en las levaduras *Sacch. cerevisiae*.

La introducción del factor killer en el mejoramiento genético ha sido utilizada en las levaduras industriales productoras de alcohol. La acción tóxica de las proteínas de la levadura killer se ha visto selectivamente envuelta en el daño funcional de la membrana plasmática de la cepa sensible; los efectos fisiológicos incluyen, escape de K⁺ (55, 56); inhibición del transporte activo de aminoácidos y la acidificación en el interior de la célula (55,56). Los mecanismos de acción postulados son: cambios inducidos por las toxinas en la membrana plasmática de la cepa sensible (56,57,58,59). También se reportó (57), que el factor killer de la levadura *Sacch. cerevisiae*, es una proteína extracelular con un efecto tóxico sobre la cepa sensible (59). Se comunicó (60), un método rápido para determinar la actividad de la toxina killer en la levadura.

La partícula killer confiere inmunidad para el ataque de otras cepas killer y evita la contaminación de otras levaduras sensibles indeseadas, resultando adecuada su utilización en la industria.

Se realizó mejoramiento genético de cepas utilizadas en la producción de vinos (61). Las nuevas cepas híbridas de levadu-

ras *Sach. cerevisiae* con el carácter killer fueron utilizadas para la producción industrial de alcohol y de vinos.

Fueron reportados los mutantes auxotrofos de *Sacch. cerevisiae* aislados a partir de cepas de tipo salvaje (62). Se utilizó el agente mutágeno Nitrosoguanidina (NTG), además, se indicaron las condiciones de formación de protoplastos y fusión de protoplastos entre cepas killer y cepas industriales.

El fenómeno de competencia entre cepas killer y sensibles utilizadas en la industria fue investigado (63).

Mutantes petite

Se han utilizado mutantes deficientes respiratorios petite en la producción de alcohol. Estos mutantes tienen alterada la cadena respiratoria, la cual le impide la utilización del alcohol producido (31,64). La obtención de mutantes deficientes respiratorios (1, 61), a partir de cepas de levaduras *Sacch. cerevisiae* y su utilización en la producción de alcohol fue abordada.

Se reportaron híbridos de levadura *Sacch. cerevisiae*. Los híbridos fueron obtenidos a partir de mutantes petite con un mutante killer de *Sacch. cerevisiae* (61).

Ingeniería genética

La ingeniería genética de levaduras (65) utilizada en procesos comerciales es muy laboriosa. Esto es debido a que las levaduras industriales poseen largos genomas no caracterizados, los cuales frecuentemente cargan al menos dos copias de un gen cualquiera. Estas cepas usualmente están desprovistas de auxotrofia y de otros marcadores genéticos y requieren a menudo la incorporación de genes heterólogos en los plásmidos u otras moléculas de DNA transformantes. En este artículo, se demuestra que estos genes pueden ser incorporados en la levaduras industriales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alvarez, X; Plaza, A (1987). Obtención de mutantes deficientes respiratorio a partir de cepas de *S. cerevisiae*. Estudio de la producción de alcohol. Revista ICIDCA Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar Vol. XXI (1)

2. Rous, C.V; Snow, R; Kunkee, R.E. (1983) Reduction of higher alcohols y fermentation with a leucine auxotrophic mutant of wine. Journal of the Institute of Brewing, Vol. 89 (4) pp. 274-278.
3. Suomalainen, H. (1971). J. Inst. Brewing Vol 77. pp 164-177
4. Suomalainen, H. y Lehtonen. (1980). Nahrung, Vol. 24, pp 49-61.M.
5. Fukuda, K. (1992). Journal of Fermentation and Bioeng. Vol. 73 pp.366-369
6. Berry, DR. y Watson, D. C. (1991). Production of organoleptic compounds. En Yeast Biotechnology. Berry, D. R.; Russell, I. Y Stewart, G. G. Eds. Allen & Unwin. London
7. Valdés, I; González, M.D.; García, R; Fundora, N; Hernández, L.M; O. Porto, (1998) Selección de levaduras para la producción de bebidas alcohólicas destiladas. Revista ICIDCA Vol. XXXII (2).
8. Hoppe, G.K. and Hansford, G.S. (1984). Biotechnol Letters, Vol.6 681
9. Bazua, C.D. and Wilke, C.R. (1981). Biotechnol, Bioeng, Vol. 24, p.1881
10. Osman, Y.A. and Ihgram, L.U. (1987). Applied and Enviromental Microbiology pp.1425-1432
11. Wlodarczyk, Z. et, al (1991). Possibility of alcoholic fermentation by using bacteria J. Fermentat. Bioeng Vol 71(6) pp. 436-438.
12. Verbina, N y cols (1988) Microbiología de las producciones alimenticias /N Verbina. Ediciones Agro. Moscú. p.14.
13. Martínez, J. y cols. (1989) Microbiología General Editorial Pueblo y Educación, Cuba.
14. Valdés, I. García, R; Fundora, N; Hernández, L.M; (1996). 96. Habana Cuba. Pesquisaje de cepas para la obtención eficiente de alcohol. En Congreso Internacional sobre Azúcar y Derivados de la Caña, IV Diversificación.
15. Fahrasmane, L. Ganou-Parfait, B; Bazile, F (1997) Determination de microcomponentes orgánicos por cromatografía gaseosa Memorias del TIPAL. Matanzas, Cuba.
16. Jover, J. (1998) "Empleo de cultivos mixtos levadura-bacteria en la fermentación alcohólica. III Encuentro provincial de mujeres creadoras de Villa Clara"
17. Ganou-Parfait, B; Saint-Mare, M. (1994). Colloque sur les ehums Guadeloupe-Martinique, France pp. 118-127

18. Jover, J. (1998) "Empleo de cultivos mixtos levadura-bacteria en la fermentación alcohólica. III Encuentro provincial de mujeres creadoras de Villa Clara"
19. García, R. y cols. (1999). Ensayos con cultivos mixtos para la producción de alcohol y aguardiente de calidad. Memorias del TIPAL 99. Matanzas. Cuba.
20. Sánchez, O. y cols (1996). Procedimiento para la producción de alcohol en destilerías cubanas. Revista Sociedad de Biotecnología y Bioingeniería de México Vol.2, pp. 35-39.
21. Fundora, N.; Valdés, I.; García, R.; Porto, O.; Hernández, L.M.; Zuaznabar, Z. (2000). Influencia de cultivos mixtos de levaduras a 25 litros y calidad de la destilación sobre las propiedades organolépticas del aguardiente. VI Congreso Internacional Sobre Azúcar y Derivados de Caña ICIDCA.
22. Fundora, N.; Valdés, I.; García, R.; Porto, O.; Hernández, L.M.; Zuaznabar, Z. .2001 Pesquisaje de cepas termotolerantes en tres géneros de levaduras alcohólicas. Revista ICIDCA Vol. XXXV (2-3).
23. Nykanen, L. Suomalainen, H. (1983). "Aroma of beer, wine and distilled alcoholic beverages" D. Reidel. Publishing Company, Dordrecht, Holland/ Boston.
24. Rosete, A., García, R.; Valdés, I.; Hernández, L.M.; Redondo, D.; Fundora, N.; Cañete, Z. (2002). Selección de cepas de *Lactobacillus* en la producción de bebidas destiladas. Revista ICIDCA Vol. XXXVI (3).
25. González, M.D. y cols (1997) Manual de Técnicas Analíticas para la industria rone-ra ICIDCA.
26. Biart, J.R. (1975) determinación de azúcares. Método de Eynon Lane modificado. Manual de Técnicas Analíticas. Sub dirección de Fermentaciones
27. Rodríguez, M y Alvarez, X. (1971) Molasses storage. XXIX Conf. Asoc. Tecn. Azuc. Cuba. International Sugar Journal.
28. Otero, M.A 1990. Informe Interno. Las melasas de caña composición, propiedades y usos. Dpto de Bioquímica, Subd. de Biotecnología del ICIDCA
29. González de la Cruz, R.; Fonseca, E.; Avila. L.; Prince. C. (2003). . Influencia de la calidad de las mieles en la fermentación alcohólica. 4to Taller Internacional de Producción de Alcohol TIPAL"2003.
30. Gera, K and Sherma, S. (1991). Env. Ed. Vol (94) pp.1016-1018.
31. Ranganathan, B. and Baht, J.V. (1958) J. Indian Inst. Sci, Vol.40, p. 105
32. Izaquirre, N.E. and Castillo.(1982). F. J. Biotechnol. Lett, Vol 4, p. 257
33. Ough, C.S. and Amerine, E.A. (1965) Calif. Agric. Exp. Sta, Bull, No 821
34. Alvarez, X.; Valdés, I.; García, R.; Porto, O.; Hernández, L.M.; Cañete, Z. (2003). Influencia de la temperatura y concentración celular en un mutante auxotrofo de *Saccharomyces cerevisiae* 4to Taller Internacional de Producción de alcohol. Universidad de Matanzas.
35. Hisie, M.C. (1993). Taiwam Sugar Res. Inst. Vol.146 pp. 39-46.
36. González, M.D. y Vázquez, M. (1995) Informe Interno. Influencia de la temperatura en la concentración de congéneres y rones.
37. Parrondo, J.; L.A. Garcia, M. Diaz. (2000). Production of an alcoholic beverage by fermentation of whey permeate with *Kluyveromyces fragilis* I I Aroma composition. Journal of the Institute of Brewing. Vol 105 (6), pp 377-382.
38. Mauricio, J. C.; Moreno, J.; Zea, L.; Ortega, J. L.; Ortega, J. M. and Medina, M. (1997). The effects of grape must fermentation conditions on volatile alcohols and esters. Journal of Science of Food and Agriculture, Vol. 75, pp. 155-160.
39. Guymon, y cols. (1961). Influencia de la aireación sobre la formación de alcoholes superiores por levaduras. Am. J. Ethol. Viticu. Vol 12, pp. 60-66.
40. Jorgensen, A. (1978) Microbiología de las Fermentaciones 7ma edición Zaragoza, Editorial Acribia
41. Ingraham, J.L.; Guymon, J.F. & Crowell, E.A. (1961), Archives of Biochemistry and Biophysics. Vol. 95, p.169.
42. Kunkee, R.E. Guymon, J.F. & Crowell, E.A. (1971) Proceedings of the First International Specialised Symposium on Yeast. Smolenice. p. 531.
43. Alvarez, X. (2004). Aislamiento, identificación y estudio de una cepa de levadura con efecto killer. XVI Forum de Ciencia y Técnica.
44. Pérez, R.; Torrado, E. (2001) Selection of adequate gene markers for the study of the stress response of wine yeast strains during their industrie production. Evento Bioquímica Biologie Molecular. Universat Valencia.

45. Watanabe, M.; Fukuda, K.; Asano, K. y Ohta, S. (1990). Mutants of baker's yeast producing a large amount alcohol or isoamyl alcohol, flavour components of bread. *Applied Microbiology and Biotechnology* Vol 34 pp. 154-159
46. Suzzzy; Romano, P. y Poisinelli, M. (1998). Isolation and characterization of mutant Resistant to aminoacid analogues obtained from *Saccharomyces cerevisiae* strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* Vol 14, pp. 243-246.
47. Benvenisty, N. y Eden, A. (2000). The use of yeast strains to reduced the production of fusel oil (high alcohol) in alcohol beverages <http://www.vissum.CO.ll>
48. Miklos, I.; M, Sipiczki M. (1990) Genetic studies in alcohol producing yeast strains. *Journal 2bl. Mikrobiol. Vol. 145(5)*, p, 344.
49. Angel, I.; Vassu, T.; Brezeanu, A. (1989). Protoplast fusion for obtaining recombinants in industrial yeast. *Journal Rev Roum Biol. Ser Biol Veg Vol 34 (2)*, pp. 113-120
50. Sipiczki, M.; Budi. Z.: Zelizi; Miklos, I. (1988) *Journal Biootechnol. Food. Ind.* pp.107-114 Oda, K; Kitamoto, K; Rakahashi, K; Yoshizawa, k; (1988). Isolation of lisine auxotrophic mutants from brewing yeast strains Vol. 83 .(9)-pp. 614-617.
51. Oda, K.; Kitamoto, K.; Rakahashi, K.; Yoshizawa, K. (1988). Isolation of lisine auxotrophic mutants from brewing yeast strains Vol. 83 .(9)-pp. 614-617.
52. Del Castillo, L. y cols. (1997) Aspectos genéticos de la tolerancia alcohólica de las levaduras TIPAL Universidad de Matanzas, Cuba.
53. Alvarez, X.; Valdés, I.; García, R.; Porto, O.; Hernández, LM. (2005) Reducción de alcoholes superiores mediante fermentación con un mutante de *Saccharomyces cerevisiae* para aminoácidos. *Revista ICID-CA Vol.39 (1)*.
54. Bevan, E.A; Makower, M. (1963) The physiological basis of the killer character in yeast *Proc. Int. Congr. Genet., (The Netherlands) I* Pergamon Press, Oxford, p. 202.
55. Middelbook, N.J.; Stum, C. & Velgas, G.D. (1980). *Antonie Van - Leenwenheak Vol.46*, pp. 205-220.
56. De la Pena, P; Barras, F; Cascon, S; Laze, PS. (1981). *Biochm. Biophys Res. Common Vol.96* pp.544-550.
57. Bussey, H. J. (1974). *Can Microb Vol 83*, pp. 171-179.
58. Katini, H; Shinmys, A. & Rantzu, T. (1977). *J. Bact. Vol (129)* pp. 640-650
59. Bussey, H. J. (1981) *Physiol. Adv. Microb. Vol. 22-.pp.* 93-122.
60. Spacer. R, Vondrejs, V. (1986). Rapid method for estimation of killer toxin activity in yeast. *Biotechnol. Letters Vol 8,pp.* 701-706
61. Farris, G.A; Fatichenti, F; Bifulco, L; Beradi, L; Deiana, P; Satta, T.(1992) A genetically improved wine yeast- new *Saccharomyces cerevisiae* hybrid with killer character for alcohol production, wine-making industrial strain improved. *Journal: Biotechnol. Lett. Vol.14 (3)* pp. 219-222.
62. Chung, K.T.; Bang, K.W; Song, H.I. (1989), Conditions for protoplast formation and fusion of killer yeast *Journal: Korean J. Microbial Vol. 27(4)* pp 422-429.
63. Maule, A. P. and Thomas, P.D en (1973) Strain of yeast lethal to brewery yeast. *J. Inst. Brew., Vol. 79*, p.137.
64. Bacila and Harli J.T. IRS (1979). *Biotechnology Biong Symposium Vol.6* pp.59-61.
65. Bazua, C.D. and Wilke, C.R. (1981). *Biotechnol, Bioeng, Vol. 24*, p.1881.
65. Panoutsopoulou Kalliope; Hutter Anton; Jones Philip; Garder David, C.J. Oliver Stephen ,G (2001) Improved of ethanpl production by an industrial yeast strain via multiples gene deletions. *Journal of the Institute of Brewing Vol. 107(1)*, pp. 4494-53.