



Selección de levaduras nativas productoras de etanol a partir de “chicha de jora” elaborada artesanalmente en el distrito de Santiago de Chuco, La Libertad-Perú.

Selection of native yeasts ethanol producing from "chicha de jora" Handcrafted in the district of Santiago de Chuco, La Libertad-Peru.
Aníbal Quintana Díaz, Eva E. Villanueva Tarazona, Pedro A. Alvarado Salinas y Luis A. Llenque Díaz

Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivos aislar, seleccionar y conservar levaduras nativas productoras de etanol a partir de “chicha de jora” elaborada artesanalmente en el distrito de Santiago de Chuco, La Libertad-Perú. Las muestras de “chicha de jora” fueron recolectadas en frascos estériles de 200 mL de capacidad, acondicionadas adecuadamente y trasladadas a Laboratorio de Microbiología Industrial de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo, para su posterior procesamiento. Para el aislamiento y selección de los cultivos se utilizó la técnica de dilución y agotamiento por estría en placas Petri conteniendo Agar Sabouraud enriquecido con extracto de levadura, fueron incubadas a 30°C durante 24 horas, las colonias desarrolladas fueron analizadas macroscópicamente y microscópicamente. Las células observadas con características morfológicas de levadura, fueron purificadas y conservadas. En la Selección secundaria los cultivos conservados fueron reactivados en agar sabouraud e incubados para obtener biomasa de levaduras luego, se “cosecharon” con solución fisiológica estéril y se centrifugaron en tubos de ensayo estériles, a 4000 g durante 10 minutos, La capacidad fermentativa fue medida mediante el método de Davies-Griffith modificado, utilizando caldo sabouraud sacarosado. Seleccionándose ocho cultivos puros de levaduras nativas que mostraron diferentes productividades (en g etanol/g lev. h), y con diferencias estadísticamente significativas entre algunas de ellas. Estas levaduras nativas no superaron la productividad alcanzada por el cultivo control referente *Saccharomyces cerevisiae* MIT-L51, pero si igualaron su productividad según la evaluación estadística de comparaciones múltiples realizada lo cual nos mostró una información relevante ya que los aislados realizados son levaduras de altas productividades con un potencial uso industrial.

Palabras clave: *Saccharomyces*, Levaduras nativas, Chicha de jora.

ABSTRACT

The aims of this research were to isolate, select and preserve native yeasts produce ethanol from "chicha" handcrafted in the district of Santiago de Chuco, La Libertad, Peru. Samples of "chicha" were collected in sterile flasks of 200 ml capacity, suitably packaged and transported to Laboratory of Industrial Microbiology, Faculty of Biological Sciences of the National University of Trujillo, for further processing. For isolation and crop selection dilution technique and exhaustion was used streaked on Petri plates containing Sabouraud agar enriched with yeast extract, were incubated at 30°C for 24 hours, the colonies grown were analyzed macroscopically and microscopically. The cells observed with morphological characteristics of yeast were purified and preserved. In secondary selection cultures preserved were reactivated in Sabouraud agar and incubated for yeast biomass then were "harvested" with sterile saline and centrifuged in sterile test tubes at 4000 g for 10 minutes, The fermentative capacity was measured by the method of Davies-Griffith modified using Sabouraud broth sacarosado. Eight pure cultures of selected yeast native showed different productivities (in g ethanol/g lev. H), and statistically significant differences between some of them. These native yeasts did not exceed productivity achieved by the control culture reference *Saccharomyces cerevisiae* MIT-L51, but if they matched their productivity according to the statistical evaluation of multiple comparisons made which showed us relevant information as isolated made are yeasts high productivities with a potential industrial use.

Keywords: *Saccharomyces*, native yeasts, Chicha de jora.

INTRODUCCIÓN

Las levaduras productoras de etanol pueden aislarse a partir de diversas fuentes naturales realizando técnicas de *screening*. Una alternativa es recurrir a materias primas sometidas a fermentación natural, lo cual permite que las levaduras nativas, salvajes, silvestres o autóctonas^{1,2} presentes en estas fuentes naturales, desarrollen en medios debidamente formulados, facilitando así su aislamiento y selección.

Las levaduras más importantes desde el punto de vista biotecnológico son las pertenecientes al género *Saccharomyces*, destacando *S. cerevisiae*. Estas levaduras son cultivadas a nivel industrial para obtener biomasa que puede ser utilizada en panificación o como suplemento dietético^{1,3}. También son utilizadas en la producción de etanol y bebidas alcohólicas; así mismo en la obtención de mosto alcohólico para la producción de ácido acético y vinagre⁴. Es eucariota, fácilmente cultivable en el laboratorio, su genoma es pequeño y su tiempo de duplicación es relativamente corto⁵.

La importancia de *Saccharomyces* está en el éxito del bioproceso y la rentabilidad, ello exige utilizar cultivos seleccionados con capacidades metabólicas especiales⁶ que se hallan disponibles en colecciones; sin embargo, esta forma crea dependencia y no garantiza la disponibilidad del “mejor” cultivo. La alternativa es aislarlos de su hábitat natural. Considerando que en estos hábitats están acompañados de otros microorganismos, se requiere aplicar programas de aislamiento y selección⁶⁻⁹.

En el Laboratorio de Microbiología Industrial de la Universidad Nacional de Trujillo se han aislado levaduras productoras de etanol a partir de diversos frutos sometidos a fermentación natural *in vitro*, Tal es el caso de tuna¹⁰ “fresa”, “piña”, “ciruela” y “uva”¹¹; “mango”, “plátano” y “mandarina”¹²; y de tres variedades de “uva”¹³. También es factible aislar estas levaduras a partir de bebidas alcohólicas producidas en forma artesanal, en las que no se han inoculado levaduras específicas. Como estas bebidas son fermentadas en forma natural, es factible aislar las levaduras y seleccionar las más promisorias.

En el distrito de Santiago de Chuco, región La Libertad-Perú, se produce “chicha” en forma artesanal sin utilizar la adición de levaduras seleccionadas; por lo cual, la fermentación alcohólica lo realizan levaduras **nativas** y la flora microbiana acompañante propias de las materias primas que utilizan y se han ido instalando a través del tiempo en los recipientes de fermentación. Los productores artesanales inician un *batch* de producción con levaduras procedentes de un *batch* anterior. Sin embargo, este procedimiento no es adecuado debido a que el proceso de fermentación es llevado a cabo por una población mixta, además se debe tener en cuenta que las levaduras van degenerando y cambiando sus características con el tiempo, hecho que afecta su metabolismo.

De estas fermentaciones naturales, sin adición de inóculos específicos, es factible seleccionar levaduras nativas que son responsables de las fermentaciones espontáneas, las mismas que después de una adecuada evaluación pueden ser utilizadas en fermentaciones controladas y garantizar así la calidad del producto final; las levaduras que se logran seleccionar de muestras de “chicha” estarán mejor adaptadas a las condiciones de fermentación y permitirán dar identidad a la bebida que se produzca. Así, la “chicha” producida en Santiago de Chuco tendrá características particulares que la diferenciarán de las bebidas producidas en otras regiones del país, aun cuando se utilice la misma materia prima y se estandarice las condiciones de producción.

A partir de productos en proceso de fermentación, como la “chicha” es factible aislar levaduras productoras de etanol. Se han analizado poblaciones de levaduras durante procesos de fermentaciones alcohólicas espontáneas¹⁴⁻¹⁸. También se seleccionaron cepas nativas de *S. cerevisiae* para la producción de sidra en Uruguay y en la fabricación artesanal de licor “cocuy”^{19,20}.

Uno de los problemas en el proceso de elaboración de la chicha de jora es el no contar con inoculantes microbianos que sean utilizados para los procesos de fermentación y de esta manera elaborar una chicha de calidad, estandarizada en sus características organolépticas y bioquímicas. Por ello se considera de gran importancia para la producción de “chicha” aislar, a partir de ellas, levaduras productoras de etanol con la finalidad de seleccionar las más útiles para ser utilizadas en procesos controlados con la finalidad de mejorar la calidad del producto final. En la presente investigación se aisló, seleccionó, conservó e identificó levaduras nativas productoras de etanol a partir de “chicha” producidos en forma artesanal en el distrito de Santiago de Chuco.

Aun cuando la producción de “chicha” es una actividad tradicional, en la actualidad es un proceso fermentativo que merece la atención de los investigadores con la finalidad de mejorar la calidad del

producto, lo cual va permitir incrementar la rentabilidad del proceso con lo cual se beneficiarán los productores artesanales y los consumidores.

MATERIAL Y MÉTODOS

Colección de las muestras de “chicha de jora”

Las muestras de “chicha de jora” se recolectaron en frascos estériles de 200 mL de capacidad y fueron rotuladas según el código asignado al lugar de procedencia. Se acondicionaron adecuadamente y se trasladaron al Laboratorio de Microbiología Industrial de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo, para su procesamiento.

Procesamiento de las muestras

Las muestras se incubaron a temperatura ambiental para su enriquecimiento, hasta observar signos de fermentación. En la tapa de cada frasco se colocó una aguja hipodérmica para permitir la salida del CO₂.

Aislamiento y selección primaria de levaduras productoras de etanol

Del sedimento de los recipientes se tomaron alícuotas de 0,1 mL y se hicieron diluciones decimales con agua destilada estéril (ADE); posteriormente se sembraron por estría y en superficie en placas conteniendo Agar Sabouraud enriquecido con extracto de levadura (ASE) y se incubaron a 30°C durante 24 horas. Cumplido el tiempo de incubación, las colonias desarrolladas fueron analizadas macroscópicamente y microscópicamente. Este último incluyó coloración de Gram y observaciones en fresco, en el microscopio. Las colonias con características morfológicas de levadura, se aislaron en frascos conteniendo AS y se incubaron a 30°C durante 24 horas. Cumplido el tiempo de incubación se verificó su pureza mediante coloración de Gram. Los cultivos puros fueron sellados, rotulados y conservados en condiciones asépticas en refrigeración a 8°C aproximadamente.

Selección secundaria de levaduras productoras de etanol¹¹

Los cultivos conservados fueron sembrados en AS e incubados a 30°C durante 24 horas. Luego, se “cosecharon” con solución salina fisiológica estéril SSFE y se centrifugaron en tubos de ensayo estériles, previamente pesados, a 4000 g durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el tubo de ensayo con la biomasa fue nuevamente pesado. El peso de la biomasa se obtuvo por diferencia entre los dos pesos registrados. La capacidad fermentativa fue medida mediante el método de Davies-Griffith (1982)¹⁴ modificado utilizando caldo sabouraud Sacaroso al 10%. Además, se evaluó la capacidad fermentativa de *S. cerevisiae* MIT L51. Se realizaron los cálculos y se seleccionarán los cultivos que presentaron igual o mayor productividad de etanol que *S. cerevisiae* MIT L51.

Identificación de levaduras productoras de etanol

Los cultivos puros de las levaduras seleccionadas fueron analizados tanto en sus características macroscópicas como microscópicas. Las levaduras seleccionadas fueron sembradas en medios específicos y se realizaron estudios comparativos a *S. cerevisiae* MIT L51 que fue utilizado como cultivo control referente.

Conservación de levaduras productoras de etanol

Los cultivos de levadura fueron sembrados en AS y después de la incubación se acondicionaron en recipientes estériles y conservados a 8°C.

Análisis de Datos

El número de levaduras aisladas y seleccionadas a partir de las muestras de cada productor de “chicha” fueron procesadas y organizadas en tablas. La productividad de etanol de las levaduras aisladas fue comparada con los valores de productividad de etanol de *S. cerevisiae* MIT L51 que fue utilizado como cultivo control referente. Los valores de productividad de etanol de los cultivos nativos seleccionados y del cultivo control referente fueron analizados estadísticamente mediante la prueba de ANOVA utilizando el Programa SPSS. 21 para Windows, con un nivel de significancia de 0,05%.

RESULTADOS

En chicha de jora elaborada artesanalmente en Santiago de Chuco se encontró colonias redondeadas compatibles con las de levaduras, las cuales fueron convenientemente codificadas (Tabla 1). Estas, produjeron una biomasa, en g levadura, de 0,5866 a 1,0279 y CO₂ a las concentraciones de 0,0215 a

0,0600 por L (Tabla 2). 12 cultivos produjeron etanol en cantidades estadísticamente significativas mayores que las demás (Tabla 3).

Tabla 1. Características microscópicas y macroscópicas de las células y colonias de levadura nativas, aisladas de Chicha de Jora elaborada artesanalmente de ocho lugares de producción del distrito de Santiago de Chuco, La Libertad-Perú. Cultivadas en Agar-Sabouraud-Sacarosado (pH 5.6, a Temperatura Ambiente $25 \pm 1^\circ\text{C}$)

Características microscópicas	Características macroscópicas	Denominación del Cultivo (Código)
Células redonda u ovaladas estado con yemas	Colonias redondas, de aspecto cremoso y convexo.	SCH-L1
Células redonda u ovaladas estado con yemas	Colonias redondas, de aspecto cremoso y convexo	SCH-L2
Células alargada con proyecciones distales	Colonias redondas, de aspecto cremoso y plano	SCH-L3
Células alargada con proyecciones distales	Colonias redondas, de aspecto cremoso y plano	SCH-L4
Células alargada con proyecciones distales	Colonias redondas, de aspecto cremoso y plano	SCH-L5
Células alargada con proyecciones distales	Colonias redondas, de aspecto cremoso y plano	SCH-L6
Células redonda u ovaladas estado con yemas	Colonias redondas, de aspecto cremoso y convexo.	SCH-L7
Células redonda u ovaladas estado con yemas	Colonias redondas, de aspecto cremoso y convexo.	SCH-L8

SCH = Santiago de Chuco

L = Levadura

Tabla 2. Producción de biomasa (g), anhídrido carbónico (CO_2/L) y productividad en base a la capacidad fermentativa de los cultivos aislados de “Chicha de Jora” elaborada artesanalmente, del distrito de Santiago de Chuco, La Libertad-Perú. Cultivadas en Caldo-Sabouraud-Sacarosado (10%, pH 5.6, a Temperatura Ambiente $25 \pm 1^\circ\text{C}$).

Cultivos	Biomasa (g levadura)	CO_2 (L)	Productividad (g et/g lev. h)
SCH-L1	0,7846	0,0411	0,1084
SCH-L2	0,9288	0,0273	0,0626
SCH-L3	1,0279	0,0355	0,0324
SCH-L4	0,7517	0,0215	0,0258
SCH-L5	0,7438	0,0600	0,0555
SCH-L6	0,7785	0,0500	0,0440

SCH-L7	0,6636	0,0200	0,0705
SCH-L8	0,5866	0,0315	0,1003
MIT- L51	-	-	0,0365

SCH = Santiago de Chuco

L = Levadura

Tabla 3. Evaluación estadística de comparaciones múltiples, de la productividad de etanol de los cultivos nativos aislados de “Chicha de Jora” elaborada artesanalmente, del distrito de Santiago de Chuco, La Libertad-Perú y *Saccharomyces cerevisiae* MIT-L51, empleado como control.

	Cultivo	Diferencias de Medias	Error típico	Sig. (p - valor)
Cultivo SCH-L1	SCH-L2	,0458	,0120	,0604
	SCH-L3	,0760*	,0120	,0025
	SCH-L4	,0826*	,0120	,0014
	SCH-L5	,0529*	,0120	,0271
	SCH-L6	,0644*	,0120	,0079
	SCH-L7	,0380	,0120	,1462
	SCH-L8	,0081	,0120	,9979
	MIT - L51	,0450	,0120	,0665
Cultivo SCH-L2	SCH-L1	-,0458	,0120	,0604
	SCH-L3	,0302	,0120	,3322
	SCH-L4	,0368	,0120	,1660
	SCH-L5	,0072	,0120	,9991
	SCH-L6	,0186	,0120	,8091
	SCH-L7	-,0079	,0120	,9984
	SCH-L8	-,0377	,0120	,1512
	MIT - L51	-,0009	,0120	1,000
Cultivo SCH-L3	SCH-L1	-,0760*	,0120	,0025
	SCH-L2	-,0302	,0120	,3322
	SCH-L4	,0066	,0120	,9995
	SCH-L5	-,0231	,0120	,6183
	SCH-L6	-,0116	,0120	,9804
	SCH-L7	-,0381	,0120	,1446
	SCH-L8	-,0678*	,0120	,0056
	MIT - L51	-,0311	,0120	,3052
Cultivo SCH-L4	SCH-L1	-,0826*	,0120	,0014
	SCH-L2	-,0368	,0120	,1660
	SCH-L3	-,0066	,0120	,9995
	SCH-L5	-,0297	,0120	,3505
	SCH-L6	-,0182	,0120	,8242
	SCH-L7	-,0447	,0120	,0688
	SCH-L8	-,0744*	,0120	,0029
	MIT - L51	-,0377	,0120	,1512
Cultivo SCH-L5	SCH-L1	-,0529*	,0120	,0271
	SCH-L2	-,0072	,0120	,9991
	SCH-L3	,0231	,0120	,6183
	SCH-L4	,0297	,0120	,3505
	SCH-L6	,0115	,0120	,9818
	SCH-L7	-,0150	,0120	,9238
	SCH-L8	-,0448	,0120	,0676
	MIT - L51	-,0080	,0120	,9981

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Tabla 3. (Continuación) Evaluación estadística de comparaciones múltiples, de la productividad de etanol de los cultivos aislados de “Chicha de Jora” elaborada artesanalmente, del distrito de Santiago de Chuco, La Libertad-Perú y *Saccharomyces cerevisiae* MIT-L51, empleado como control.

	Cultivo	Diferencias de Medias	Error típico	Sig. (p - valor)
Cultivo SCH-L6	SCH-L1	-,0644*	,0120	,0079
	SCH-L2	-,0186	,0120	,8091
	SCH-L3	,0116	,0120	,9804
	SCH-L4	,0182	,0120	,8242
	SCH-L5	-,0114	,0120	,9818
	SCH-L7	-,0264	,0120	,4711
	SCH-L8	-,0562*	,0120	,0188
	MIT - L51	-,0194	,0120	,7752
Cultivo SCH-L7	SCH-L1	-,0380	,0120	,1462
	SCH-L2	,0079	,0120	,9984
	SCH-L3	,0381	,0120	,1446
	SCH-L4	,0447	,0120	,0688
	SCH-L5	,0150	,0120	,9238
	SCH-L6	,0265	,0120	,4711
	SCH-L8	-,0298	,0120	,3455
	MIT - L51	,0070	,0120	,9993
Cultivo SCH-L8	SCH-L1	-,0081	,0120	,9979
	SCH-L2	,0377	,0120	,1512
	SCH-L3	,0678*	,0120	,0056
	SCH-L4	,0744*	,0120	,0029
	SCH-L5	,0448	,0120	,0676
	SCH-L6	,0562*	,0120	,0188
	SCH-L7	,0298	,0120	,3455
	MIT - L51	,0368	,0120	,1660
MIT - L51	SCH-L1	-,0450	,0120	,0665
	SCH-L2	,0009	,0120	1,0000
	SCH-L3	,0311	,0120	,3052
	SCH-L4	,0377	,0120	,1512
	SCH-L5	,0080	,0120	,9981
	SCH-L6	,0195	,0120	,7752
	SCH-L7	-,0070	,0120	,9993
	SCH-L8	-,0368	,0120	,1660

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

DISCUSIÓN

La industria de la fermentación microbiana ha experimentado un crecimiento revolucionario en los últimos años que ha permitido la producción en gran escala de varias sustancias orgánicas entre ellas el etanol, de importancia económica para la pequeña y mediana industria de la producción de alcohol. El aislamiento y selección de levaduras productoras de etanol es una práctica que viene realizando el hombre desde hace miles de años, con el objeto de producir alcohol, bebidas alcohólicas, pan, y alimentos fermentados. Las propiedades de las bebidas fermentadas tradicionales como la “chicha de jora” son el resultado combinado de la actividad metabólica sinérgica de distintos tipos de levaduras y grupos microbianos, junto con las características del proceso de producción.

La Chicha de Jora, es una bebida fermentada elaborada artesanalmente en el distrito de Santiago de Chuco que por sus características de elaboración utilizan materias primas e insumos propios de la zona. En los procesos de fermentación, las levaduras brindan una contribución útil para el mejoramiento del sabor y aceptabilidad del producto^{21,22}). Quizá la especie más reconocida, tanto en

bebidas fermentadas espontáneas como inoculadas, es *S. cerevisiae*²³, siendo una de las de mayor interés a nivel comercial, ya que produce y tolera altas concentraciones de etanol y sintetiza compuestos volátiles que le brindan el sabor y aroma al producto final.

Estos conocimientos permitieron la investigación del aislamiento y selección de levaduras nativas productoras de etanol, así en esta experiencia, se aislaron cultivos nativos puros de levaduras que fueron evaluadas por el método de Davies-Griffith Modificado⁷, para determinar sus productividades de etanol. Seleccionándose ocho cultivos de levaduras nativas que mostraron diferentes productividades (en g etanol/g lev. h), y con diferencias estadísticamente significativas entre algunas de ellas (Tabla 3). Estas levaduras nativas no superaron estadísticamente la productividad alcanzada por el cultivo control de alta productividad *S. cerevisiae* MIT-L51 utilizada como referente, quien fermentó en las mismas condiciones que las levaduras seleccionadas, pero sí tuvieron una productividad similar ya que según la evaluación estadística de comparaciones múltiples realizada no muestran diferencia significativa con el cultivo control, este hallazgo muestra una información relevante ya que los aislados realizados son levaduras de altas productividades con potencial uso industrial.

Por otro lado comparando investigaciones se encontró que Centurión²⁴ realizó un trabajo sobre las selecciones secundarias de levaduras “nativas” productoras de etanol aisladas de frutos de la Región La Libertad-Perú, en *Fragaria sp.* “fresa”, *Spondias purpurea* “ciruela” y *Vitis vinifera* “uva” y determinó que sus productividades superaban, en todos los casos, al cultivo control *S. cerevisiae* MIT L51, y por ende a los cultivos seleccionados en este trabajo, pero a diferencia de esta investigación que se utilizó Caldo sabouraud Sacaroso al 10% (CSS), él utilizó una Solución Azucarada Bufferada Enriquecida (SABe), que incluye sales de K₂HPO₄ (0.2 g %) y NaH₂PO₄ (0.2 g%).

Es importante saber que las condiciones medio ambientales y las fuentes nutritivas en los medios de aislamiento, selección y evaluación de microorganismos (y para este caso la determinación de la capacidad fermentativa), juegan un rol importante en la comparación de datos y la reproducibilidad de los mismos. Por ello en la presente investigación, se ha tenido en cuenta mantener las condiciones constantes para todas las evaluaciones, toda vez que durante este proceso, pueden haber factores que pueden influir sustancialmente, como es el caso de los diluyentes, esto en razón de que se ha encontrado que los diluyentes, como agua peptonada y destilada tienen influencia en los recuentos de levaduras²⁵. En conclusión: (i) se aislaron, seleccionaron y conservaron ocho cultivos nativos de levadura de alta productividad de etanol, a partir de "chicha de jora" elaborados artesanalmente en el distrito de Santiago de Chuco, La Libertad-Perú, (ii) se identificaron macroscópicamente y microscópicamente ocho cultivos nativos de levaduras nativas productoras de etanol, aisladas de “chicha de jora” elaborados artesanalmente en el distrito de Santiago de Chuco, (iii) se determinó de acuerdo al análisis estadístico de comparaciones múltiples, diferencia significativa entre las productividades de algunos de los ocho cultivos nativos de levaduras productoras de etanol (Tabla 3), aislados a partir de "chicha de jora" elaborada artesanalmente en el distrito de Santiago de Chuco y (iv) no se encontró diferencia significativa entre el cultivo control referente de *S. cerevisiae* MIT-L51 y los ocho cultivos nativos de levaduras productoras de etanol aislados a partir de "chicha de jora" elaborada artesanalmente en el distrito de Santiago de Chuco.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Madigan M, Martinko J, Parker J. Brock Biología de los Microorganismos. 10ª ed. Madrid, España: Pearson Prentice Hall. 2004.
2. Suárez, B., R. Pando, R. Fernández, A. Querol y R. Madrera. Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. Food Microbiol. 2007; 24:24-31
3. Doran P. Principios de Ingeniería de Bioprosesos. Zaragoza. España: Edit. Acribia, S.A. 1998.

4. Prescott L, Harley J, Klein D. Microbiología. 5ª ed. Madrid, España: McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U. 2004.
5. Becker J, Caldwell G, Zachgo E. Biotecnología Curso de Prácticas de Laboratorio. Zaragoza, España: Edit Acibia S.A. 1999.
6. Torija M. Ecología de levaduras: Selección y adaptación a fermentaciones vínicas. [Tesis de Doctor en Bioquímica]. Departamento de Bioquímica y Biotecnología. Facultad de Enología. Tarragona. España. 2002.
7. Villanueva E. Selección secundaria de bacterias productoras de amilasas. En: Villanueva E, H. Robles y M. Otiniano (eds.). Guía de Prácticas de Microbiología Industrial. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. 2008.
8. Villanueva E, Requejo H. Aislamiento y selección primaria de levaduras productoras de etanol a partir de frutos de la Región La Libertad, Trujillo-Perú. En: I Jorn Investig Farmacéutica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. 2006; pp.221-230.
9. Torija M, Rozes N, Poblet M, Guillamon J, Mas A. Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: Comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2001; 79:345-352.
10. Zarpán L, Villanueva E. Optimización de factores en la elaboración de vino de dos variedades de *Opuntia ficus-indica* "tuna" empleando *Saccharomyces cerevisiae*. En: I Cong Peruano de Biotecnología y Bioingeniería. Trujillo. Perú. 1998; p.19.
11. Villanueva E. Efecto de variables físico-químicas sobre el crecimiento y proteinogramas de dos cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* productores de etanol aislados de frutos de la región La Libertad-Perú. [Tesis de Doctora en Ciencias Biológicas]. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. 2007.
12. Vásquez V. Avances de investigaciones en Biotecnología Agroindustrial en la Universidad Nacional de Trujillo. En: I Seminario: Procesos Agroindustriales y Aseguramiento de la Calidad. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. 2002; p.48
13. Salinas C. Fenotipo "killer" en levaduras productoras de etanol aisladas de frutos de *Vitis vinifera* de la Región La Libertad, Perú. [Tesis de Biólogo-Microbiólogo]. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. 2009.
14. Le Jeune C, Ernya C, Demuytera C, Lolliera M. Evolution of the population of *Saccharomyces cerevisiae* from grape to wine in a spontaneous fermentation. *Food Microbiol*. 2006; 23(8):709-716
15. Beltrán G, Torija M, Novo M, Ferrer N, Poblet M, Guillamón J, Rozés N, Mas A. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study. *System Appl Microbiol*, 2002; 25 (1):287-293.
16. Coton E, Coton M, Levert D, Casagerola G, Dohier D. Yeast ecology in French cider and blank olive natural fermentation. *Int J Food Microbiol*. 2006; 108(1):130-135.
17. Ganga A. Recolección y caracterización de cepas autóctonas de levaduras para la diferenciación e identidad organoléptica de los vinos chilenos. Centro de estudios en Ciencia Tecnología de los Alimentos (CECTA). Universidad de Santiago de Chile. Santiago de Chile. Chile. 2000.
18. Epifanio S, Gutiérrez A, Santamaría M, López R. The influence of enological practices on the selection of wild yeast strains in spontaneous fermentation. *Am. J. Enol. Vitic*. 1999; 50(1):219-224.
19. Paolino G, Esterovich J, Vescarra S, Garmendia G, Vero S. Selección de una cepa nativa de *Saccharomyces cerevisiae* para la producción nacional de sidra. Universidad de la República. Uruguay. En: XIV Cong de la Asociación de Universidades. AUGM. Brasil. 2006; p.35
20. Yegres F, Fernández-Zeppenfeldt G, Padin C, Rovero L, Richard-Yegres N. *Saccharomyces cerevisiae* en la fabricación de licor "cocuy". *Rev. Ven. Microbiol*. 2003; 23 (1):51-54
21. Banigo EOI, De Man JM, Duitschaever CL. Utilization of high-lysine corn for the manufacture of ogi using a new improved processing system. *Cereal Chemistry* 1974; 51:559-572.
22. Odunfa SA, Adeyele S. Microbiological changes during the traditional production of Ogi-baba, West African fermented sorghum gruel. *J Cereal Science* 1985; 3:173-180
23. Jespersen L. Occurrence and taxonomic characteristics of strains of *Saccharomyces cerevisiae* predominant in African indigenous fermented foods and beverages. *FEMS Yeast Research* 2003; 3:191-200

24. Centurion AN. Selección secundaria de levaduras “nativas” productoras de etanol aislada de frutos de la Región La Libertad-Perú. [Invest. Título de Biólogo-Microbiólogo]. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú. 2008.
25. Valverde DR. Efecto del diluyente en el recuento de células viables de *Saccharomyces cerevisiae* MIT-L51. [Invest. Título de Biólogo-Microbiólogo]. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú. 2009.

Correspondencia: aqdperu@gmail.com