UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS
DEL CENTRO DE LA REPÚBLICA
(PROPAC)

Aislamiento, selección e identificación de levaduras enológicas nativas no-*Saccharomyces* en viñedos establecidos en Querétaro

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Presenta

I.I.A. Eunice Ortiz Barrera

Dirigido por

Dr. RAMÓN ÁLVAR MARTÍNEZ PENICHE

Santiago de Querétaro, Qro. México Noviembre del 2013

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestro en ciencia y tecnología de alimentos

Aislamiento, selección e identificación de levaduras enológicas nativas no-*Saccharomyces* en viñedos establecidos en Querétaro

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Presenta:
Eunice Ortiz Barrera

Dirigido por:
Ramón Álvar Martínez Peniche

SINODALES

Dr. Ramón Álvar Martínez Peniche
Presidente — Firma

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar
Secretario — Firma

Dra. Sofía María Arvizu Medrano
Vocal — Firma

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga
Suplente — Firma

M.C. Kruskaia Karenia Caltzonzin Fernández
Suplente — Firma

M.S.P. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad

Dr. Ireneo Torres Pacheco
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Noviembre 2013
México

RESUMEN

El estado de Querétaro ocupa el 2° lugar en producción de vino en México, con 300 ha de viñedos. Un grupo de vitivinicultores locales desea incrementar la superficie vitícola y producir vinos de calidad, la cual depende del *terroir* y del proceso tecnológico donde las levaduras vínicas juegan un papel crucial. Éstas se clasifican como *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* (nS). Las primeras son las principales responsables de la producción de etanol, mientras las segundas se consideran responsables de enfermedades en el vino; sin embargo, algunas nS pueden sintetizar metabolitos que aportan un carácter distintivo a los vinos. El presente trabajo tuvo como objetivo aislar, seleccionar e identificar levaduras no-*Saccharomyces* nativas de la región vitivinícola de Querétaro. De 197 levaduras aisladas de la fermentación espontánea de mosto de uva de la región sin sulfitar, ocho (NB1, NA4, NB27, NB31, NB39, NR77, NR90, NB108) que crecieron en medio-lisina, que mostraron actividad β-glucosidasa (medio EGA) y que en pruebas realizadas en un analizador turbidimétrico automatizado Bioscreen® C toleraron a 30 mg/L de anhídrido sulfuroso total y fueron sensibles a etanol (6 %), se seleccionaron. Éstas se sometieron a ensayos de microvinificación por termovinificación en presencia de K-1 (*Saccharomyces cerevisiae*). En general no se observan diferencias en la fermentación entre las nS + K-1 y la K-1 sola, lo que muestra que las primeras no compiten por nutrientes con K-1. Los rangos de pH (3.44 a 3.51), acidez total titulable (6.3 a 7.5 g/L de ácido tartárico), acidez volátil (0.10 a 0.21 g/L de ácido acético), grado alcohólico (11.2 a 13.6 % etanol v/v), azúcares residuales (2.5 a 3.5 g/L) obtenidos se encuentran dentro de lo considerado normal, sin haber diferencias entre levaduras. Los vinos obtenidos con las distintas levaduras mostraron niveles aceptables de ácido acético (< 0.5 g/L). Por otro lado, N39 obtuvo valores mayores de glicerol (7.45 g/L) que con el resto (5.39 a 6.5 g/L). Finalmente, las ocho levaduras fueron identificadas, pertenecientes al género *Hanseniaspora* siendo NR90 *H. glillermondi* y el resto *H. uvarum*. Se concluye que en Querétaro existen nS prometedoras capaces de mejorar la calidad de vinos elaborados localmente.

Palabras clave: no-*Saccharomyces*, β-glucosidasa, microvinificaciones, termovinificación.

SUMMARY

Querétaro State is the 2nd wine producer in México, with 300 ha of vineyards. A local group of winemakers' wishes to increase the vineyard area and produced quality wines, which depends on *terroir* and technological process, where yeasts play an important role. Enological yeasts species are used to be classified as *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces (nS)*. The first ones are the main responsibles of the ethanol production, while the seconds are considered as promoters of diseases in wine; nevertheless, some nS are able to synthesize certain secondary metabolites, providing a distinctive character to wine. The aim of this study was to isolate, select and identify native non-*Saccharomyces* yeasts from the wine region in Queretaro. From 197 yeasts isolated from spontaneous fermentations of non sulfited musts obtained from grapes of the region. Eight (NB1, NA4, NB27, NB31, NB39, NR77, NR90, NB108) were able to grow in Lysine medium, showing β-glucosidase activity (Medium EGA) and which showed tolerance to 30 mg/L total sulfur dioxide and to ethanol (6 %) in tests performed in an automated turbidimetric analyzer Bioscreen C, were selected. Selected yeasts were then evaluated in micro-thermowinemaking essays, in presence of K-1 (*Saccharomyces cerevisiae*). In general, differences in fermentation between nS + K-1 and K-1 (alone) were not apparent, which shows that nS tested do not compete for nutrients with K-1. Ranges of pH (3.44 to 3.51), titratable acidity (6.3 to 7.5 g/L tartaric acid), volatile acidity (0.10 to 0.21 g/L acetic acid) and alcohol content (11.2 to 13.3 % ethanol v/v) obtained by the nS tested are situated at normal levels. Wines obtained with the different nS yeast showed lower acceptable levels of acetic acid (< 0.5 g/L). Moreover, N39 obtained higher value of glycerol in the wine (7.45 g/L) than the other *nS* yeasts (5.39 a 6.50 g/L). Finally, the eight yeasts were identified as belonging to the genus *Hanseniaspora*; NR90 was recognized as *H. glillermondi* and the other yeasts as *H. uvarum*. We conclude that Querétaro counts on *nS* promising yeast able to improve the local quality wine.

Keywords: non-*Saccharomyces* , β-glucosidase , microvinifications , thermovinification

Dedicatorias

A mi Dios, mi padre incondicional quien ha estado conmigo, salvándome y ayudándome para poder cumplir con esta meta, que fue sueño y a hora es realidad. GRACIAS POR TODO.

A mi madre y a mis hermanos Maricela y Elias

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Querétaro y a la Facultad de Química

Al Programa de postgrado en alimentos del centro de la república(PROPAC) y su plan de la Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos.

A CONACYT por la beca nacional y mixta otorgada.

A mi asesor, el Dr. Ramón Álvar Martínez Peniche por aceptarme para ser parte de su equipo y por sus conocimientos otorgados, GRACIAS.

A mis sinodales: Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar , Dra. Sofía María Arvizu Medrano, Dra. Montserrat Hernández Iturriaga, y M.C. Kruskaia Karenia Caltzonzin Fernández, por su ayuda incondicional para la realización de este proyecto al permitirme usar sus laboratorios, equipos, ideas,gracias por su conocimiento otorgado.

A los propietarios y personal de el viñedo “El Rosario”, “El Barreno”, y “Viñedos Azteca”, especialmente a Antonino Sierra, Alejandro Zendejas, Jorge Ferreira por el material experimental que nos donaron, y por confiar y creer en nosotros y el proyecto. Además a su personal Don Luis y Don Pablo quienes nos nutrieron de conocimiento, por su trato amable y cordial hacían el viñedo lugar interesante para aprender y querer regresar.

A la Dra. Guadalupe Flavia Loarca Piña por permitirme utilizar sus equipos para realizar este proyecto y por su amistad. Al Dr.Mercado y sus alumnos (Dalia, David, Gisella y Humberto) por el apoyo académico y su amistad.

A mis profesores que me impartieron clases durante la maestría por su conocimiento y su ejemplo siempre positivo.

A Dalia que por suerte fue mi compañera de laboratorio y que se convirtió en una GRAN AMIGA, a ella por todos los momentos que compartimos en el laboratorio, en la estancia en

Tarragona, en la casa, en la alegría, en los malos ratos, GRACIAS, POR TODO TU APOYO, AYUDA, Y TU AMISTAD INCONDICIONAL. Te quiero babe.

A Alex, al chino de lA RISA de los quesos, por ser un gran compañero de casa y más que eso un GRAN AMIGO, porque estuviste en las buenas, en las malas sacándome una sonrisa, fuiste amigo y profesor de biología molecular, para poder cumplir el último objetivo de esta tesis, por quedarte hasta tarde esperando a que Dalia y yo saliéramos del lab y dándonos un empujón GRACIAS POR TU AYUDA Y AMISTAD. Te quiero babe.

A ti Mami, por tu sonrisa y tus lágrimas de amor, por tus abrazos, tus consejos, tú ayuda. Para mi eres mi ejemplo, por ser mi heroína y mi pilar; tu fortaleza, inteligencia y valentía me hacen querer ser por lo menos la mitad de la gran mujer que eres tú. Gracias ayudarme, por creer en mí, por tus palabras de aliento que me hace seguir sin pensar en rendirme. TE AMO MAMÁ.

A mis hermanos Maricela y Jesús Elias, por sus abrazos reconfortantes cada que regreso y me voy de casa, a ustedes que siempre viajan conmigo en mi corazón. Me siento tan orgullosa de ser su hermana, son un ejemplo de vida para mí, son mi fuerza, mi inspiración para ser mejor para ustedes, su amor es indispensable para mí. Los admiro por la valentía, fortaleza y alegría con que viven cada día. GRACIAS por su amor, por el apoyo que me han brindado durante la maestría y por todos los momentos que hemos pasado juntos LOS AMO TANTO GRACIAS POR SU SONRISA QUE ME ILUMINA DONDE QUIERA QUE ESTÉ.

A mis Abuelos Irma Bravo y Rodolfo Barrera por su amor, paciencia, ejemplo, por sus cuidados, por su apoyo de toda la vida, por sus consejos y enseñanzas. A mis tíos, primos, y toda la familia quienes me dan su cariño y apoyo para seguir.

A Antonio, tu que llegaste cuando ya estaba en esta aventura de la maestría y decidiste incorporarte a mi lado en este camino conociendo los riesgos, por ser un gran novio y amigo, por llevarme de cenar para seguir la jornada en el laboratorio, y apoyarme incondicionalmente

acompañándome en esta etapa tan importante para mí, aunque a veces un mar nos separaba, por esperarme, tu que creíste en mí, compartiste mis lágrimas y con tanto amor me regalaste un abrazo de aliento, por tu comprensión, paciencia, consejos. Me has hecho muy feliz TE AMO.

A Aurora, Carrasco, Mario, Irasema, Ruth, por compartir conmigo esta travesía en el laboratorio, compartiendo tantos momentos inolvidables, gracias por su amistad.

A Boris, por tu gran amistad incondicional, por tus consejos, tu confianza y tu apoyo, te quiero amiga.

A mis asesores y amigos en la estancia, Ricardo, Montse, Gema, Anna, David, Miquel, Àngels, ChunXiao, Jenny, Gemma, Flor, Luis, gracias por su apoyo, amistad que nunca olvidaré.

A mis amigos y compañeros de la maestría por su apoyo y amistad desinteresada: Dany Humberto, Marely, Nayeli, Diego, Omar, Jonathan, Gisella, Andrea, Liz, Karen, Mayra, Mireya, Emmanuel, Luis, Fer, Gaby, Anabel, Martita, señora Martha.

A mis amigos Alejandro Cabello, Adriana L.Tokman y Fabiola Garibay por sus consejos, su ayuda y su gran amistad que con el paso de los años se fortalece y siguen cuidándome y apoyándome.

,

Índice

RESUMEN i

SUMMARY ii

Dedicatorias iii

Agradecimientos iv

Índice de tablas vii

Índice de Figuras viii

I. INTRODUCCIÓN 1

II. REVISIÓN DE ANTECEDENTES 3

2.1 El vino 3

2.1.1. Definición 3

2.1.2 Antecedentes históricos 3

2.1.2.1 A nivel mundial 3

2.1.2.2 En México 4

2.1.3 Importancia económica 5

2.1.3.2 En México 6

2.1.4 Clasificación de los vinos 7

2.2. Las vinificaciones 8

2.2.1. Composición de la materia prima 8

2.2.2. Seguimiento de la maduración 10

2.2.3. Operaciones prefermentativas 12

2.2.4. Encubado 13

2.2.4.1. La maceración 14

2.2.4.2. Termovinificación 15

2.2.4.3. La fermentación alcohólica 15

2.2.5. Descube 16

2.2.6. Fermentaciones terminales 16

2.2.7. Maduración 17

2.2.8 Clarificación y conservación del vino 18

2.3 Las levaduras 19

2.3.1 Definición 19

2.3.2 Clasificación 19

2.3.3 Características generales 20

2.3.4 La vida de las levaduras 21

2.3.4.1 Multiplicación asexual 21

2.3.4.2 Multiplicación sexuada 22

2.4 Levaduras vínicas 24

2.4.1 Sucesión de levaduras 24

2.4.4. Diferentes fuentes de levaduras para la fermentación 27

2.4.4.1. No inoculadas 27

2.4.4.2. Inoculadas 27

2.5. Criterios de selección de levaduras 28

2.6. Identificación de levaduras 33

2.6.2. Criterios morfológicos 33

2.6.3. Métodos bioquímicos 33

2.6.4. Métodos moleculares 33

OBJETIVOS 35

Objetivo general 35

Objetivos particulares 35

III. MATERIALES Y MÉTODOS 36

3.1 Localización del sitio experimental 36

3.2 Material biológico 37
3.2.1. Frutos 37
3.2.2. Levaduras 37
3.3. Seguimiento de la maduración 38
3.4. Aislamiento de las cepas de levadura 38
3.5. Diferenciación de levaduras 39
3.6. Selección de las levaduras nS con cualidades enológicas 39
3.6.1. Detección de actividad β glucosidasa 39
3.6.2. Tolerancias 39
3.6.3. Activación y multiplicación de levaduras 40
3.6.4. Ensayos de microvinificación 40
3.6.5. Comportamiento fermentativo 40
3.6.6. Cinética de las levaduras 41
3.6.7. Determinación de las características químicas de los vinos obtenidos 41
3.7. Identificación de las especies de levaduras seleccionadas 43
3.7.1. Extracción de ADNr 44
3.7.3. Secuenciación e identificación 44
3.7.4. Construcción del dendrograma 44
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 46
4.1. Seguimiento de la maduración de la uva 46
4.2. Aislamiento y diferenciación de levaduras 49
4.3. Selección de levaduras 50
4.3.1. Actividad β glucosidasa 50
4.3.2. Tolerancia a Etanol 53
4.3.3. *Tolerancia a dióxido de azufre (SO_2)* 53
4.3.4. Levaduras seleccionadas 55

4.4. Ensayos de microvinificación 56
4.4.1. Comportamiento fermentativo 56
4.4.1. Seguimiento de la fermentación 56
4.4.2. Cinética de las levaduras 60
4.5.1. Grado alcohólico 70
4.5.2. Acidez total titulable y pH 72
4.5.4. Azúcares residuales 76
4.5.5. Anhídrido sulfuroso 77
4.5.6. Glicerol 79
4.6. Identificación de las levaduras seleccionadas 80
V. CONCLUSIONES 84
VI . BIBLIOGRAFÍA CITADA 87
ANEXOS 93

Índice de tablas

Tabla **Página**

3.1 Características de las variedades de vid utilizadas en este estudio……..…. 37

4.1 Claves de levaduras no-*Saccharomyces* obtenidas de tres viñedos establecidos en el estado de Querétaro en el 2012, por viñedo ...…… 50

4.2 Levaduras con β-actividad glucosidasa detectadas en este estudio por viñedo. 52

4.3 Porcentaje de sólidos solubles totales expresados en ºBrix de la microvinificaciones al final de la fermentación de mostos de dos variedades de vid en presencia de ocho cepas de levaduras nS en inóculos mixtos con S. 59

4.4 Porcentaje de etanol en vinos de dos cultivares obtenidos con ocho cepas de levaduras no-*Saccharomyces* en inóculos mixtos con la levadura K1…… 71

4.5 Grado alcohólico, acidez total titulable y pH de vinos obtenidos mediante fermentación con ocho levaduras nS en cultivo mixto con K1, con variedades de vino confundidas……..…….. 74

4.6 Grado alcohólico, acidez total titulable (ATT) y pH de vinos elaborados con dos variedades, con el efecto de la levadura confundido…….….. 74

4.7. Grado alcohólico, acidez total titulable (ATT) y pH de vinos elaborados con dos variedades, con el efecto de la levadura confundido…… 76

4.8 Azúcares residuales g/L de vinos obtenidos con uva de dos cultivares obtenidos con ocho cepas de levaduras no-*Saccharomyces* cada una de ellas inoculada con la cepa K1 de *Saccharomyces* …… 77

4.9 Anhídrido sulfuroso libre y total en mg/L de vinos de dos cultivares obtenidos con ocho cepas de levaduras no-*Saccharomyces* cada una de ellas inoculada con la cepa K1 de *Saccharomyces*…… 78

4.10 Contenido de glicerol en vinos de dos cultivares obtenidos con ocho cepas de levaduras no-*Saccharomyces* cada una de ellas inoculada con la cepa K1 de *Saccharomyces*…….... 80

4.12. Levaduras seleccionadas y su similitud con secuencias del BLAST…….. 81

Índice de Figuras

Figura	**Página.**
2.1 Diagrama de la estructura de una levadura…….....	20
2.2 Esquema de distintas formas de levaduras……	21
2.3 Esquema del proceso de gemación de las levaduras……..	22
2.4 Pseudomicelio formado por una levadura……..	22
2.5 Fases de esporulación de la levadura……..	23
2.6 Esquema del ciclo de vida de una levadura ascosporada……	23
2.7 Dinámica de levaduras durante la fermentación…….	25
2.8 Estructura química de glicerol……	26
3.1 Mapa de localización de los sitios de muestreo (viñedos El Rosario, El Barreno y Viñedos Azteca) en el estado de Querétaro, México ..…….....	36
4.1 Evolución de la maduración entre julio y agosto de 2012, medida en términos de la relación azúcar / acidez de tres variedades de vid establecidas en el `El Barreno´……	46
4.2 Evolución de la maduración entre julio y agosto de 2012, medida en términos de la relación azúcar / acidez de tres variedades de vid establecidas en el `El Rosario´....……	47
4.3 Evolución de la maduración entre julio y agosto de 2012, medida en términos de la relación azúcar / acidez de tres variedades de vid establecidas en `Viñedos Aztecas´....……	48
4.4 Caja de Petri con medio EGA (Agar msculina glicerol) dividida en nueve secciones inoculadas con diversas cepas de levaduras……..…….	51
4.5 Tiempos de detección en Bioscreen C en horas de diversas levaduras no *Saccharomyces* en medios YPD líquido ajustado a ajustado a pH 3.5, 20º B conteniendo etanol (6 %) y dióxido de azufre (30 mg/L total) señalandose con un recuadro las cepas seleccionadas.)……	55
4.6 Evolución del peso del mosto de `C.Sauvignon´ y `Merlot´ durante la fermentación de mostos inoculados con diferentes levaduras no-*Saccharomyces* + K1…….	57

4. 7 Evolución de la densidad de mostos de dos variedades de vid `C.Sauvignon´ y `Merlot´ en función de la levadura nS de fermentación en inóculos mixtos.. 58

4.8 Cinética poblacional de la levadura K1 cuando se encontraba en combinación con cada una de las ocho levaduras nS durante la fermentación en mostos de `C.Sauvignon´ y `Merlot´…….. 61

4.9 Evolución de las poblaciones de dos cepas de levaduras nS cuando se encontraban en combinación durante la fermentación de mosto de dos cultivares de vid `C.Sauvignon´ y `Merlot´……... 61

4.10 Cinética poblacional de la levadura K1 durante la fermentación en mostos de `C.Sauvignon´ y `Merlot´ en ausencia de levaduras nS…… 62

4.11 Evolución de las poblaciones de dos cepas de levaduras NB1 y K1 durante la fermentación de mosto de dos cultivares de vid `C.Sauvignon´ y `Merlot´. 63

4.12 Evolución de las poblaciones de dos cepas de levaduras NA4 y K1 durante la fermentación de mosto de dos cultivares de vid `C.Sauvignon´ y `Merlot´. 64

4.13 Evolución de las poblaciones de dos cepas de levaduras NB27 y K1 durante la fermentación de mosto de dos cultivares de vid `C.Sauvignon´ y `Merlot´ 65

4.14 Evolución de las poblaciones de dos cepas de levaduras NB31 y K1 durante la fermentación de mosto de dos cultivares de vid `C.Sauvignon´ y `Merlot´……... 66

4.15 Evolución de las poblaciones de dos cepas de levaduras NB39 y K1 durante la fermentación de mosto de dos cultivares de vid `Cabernet Sauvignon´ y `Merlot´……... 66

4.16 Evolución de las poblaciones de dos cepas de levaduras NR77 y K1 durante la fermentación de mosto de dos cultivares de vid `C.Sauvignon´ y `Merlot´ 67

4.17 Evolución de las poblaciones de dos cepas de levaduras NR90 y K1 durante la fermentación de mosto de dos cultivares de vid `C.Sauvignon´ y `Merlot´……... 68

4.18 Evolución de las poblaciones de dos cepas de levaduras NB108 y K1 durante la fermentación de mosto de dos cultivares de vid `C.Sauvignon´ y `Merlot´…… 69

4.19. Dendrograma de las ocho levaduras seleccionadas y las secuencias similares en el BLAST con su respectivo origen de aislamiento…… 82

I. INTRODUCCIÓN

El estado de Querétaro ocupa el 2° lugar en producción de vino en México, estimándose la superficie establecida con viñedos en 300 ha. Recientemente, un grupo de vitivinicultores entusiastas se ha dado a la tarea de incrementar la superficie vitícola y producir vinos de calidad, pero la agroindustria vitivinícola tiene ciertas deficiencias, como la mala aplicación de las técnicas de cultivo y enológicas. Además, el periodo de vendimia coincide con la época de lluvias, lo cual trae como consecuencia una baja calidad de la materia prima, al incrementar las proliferación de hongos y disminuyendo el contenido de sólidos solubles totales.

El vino se define como el producto de la fermentación parcial o total de mosto de uva llevado a cabo por levaduras y ocasionalmente por bacterias. Su elaboración implica una serie de prácticas específicas, como el seguimiento de la maduración, la vendimia, las operaciones prefermentativas, la inducción y seguimiento de la fermentación alcohólica, la conservación y la clarificación del vino, entre otras (André, 2008). La fermentación alcohólica es un fenómeno anaeróbico en el que intervienen una serie de microorganismos, principalmente levaduras. Las principales especies identificadas en diferentes nichos asociados con el crecimiento de la uva y la producción de vino pueden ser divididas en dos grupos: el de *Saccharomyces* (S) y el de "no *Saccharomyces"* (nS). Las primeras proceden principalmente de la cava, pero también están presentes en las uvas, o bien pueden ser aportadas a partir de cultivos iniciadores.

Las nS que han sido identificadas en la fermentación de los vinos incluyen a los géneros *Candida, Kloeckera, Hanseniaspora, Zygosaccharomyces, Schizosaccharomyces, Torulaspora, Brettanomyces, Saccharomycodes, Pichia* y *Williopsis*, y predominan en las uvas y en el mosto recién procesado y, en menor cantidad, en el equipo de las bodegas de procesamiento. Éstas normalmente prevalecen en las primeras etapas de la fermentación alcohólica mientras que, en la etapa final, predomina *S. cerevisiae* (Jolly *et al*., 2006).

Su contribución a la calidad del vino ocurre de diversas formas, como en la producción de glicerol por *Candida stellata,* o de ésteres por *C. pulcherrima*, mientras que otras, como *Kloeckera apiculata*, están asociadas con la producción de ácido acético que puede resultar perjudicial para el vino. La mayoría de las nS presentan un bajo poder alcohógeno y baja tolerancia al etanol, así que su población decae conforme la de *Saccharomyces* incrementa (Jolly *et al*., 2006).

Las fermentaciones espontáneas de vino conllevan un alto riesgo de deterioro, pero son generalmente recompensadas con una mejor textura e integración de los sabores en el vino en comparación con aquellos inoculados con cepas comerciales. La predominancia de *S. cerevisiae* junto con una tasa de crecimiento notable de levaduras no *Saccharomyces* indígenas durante los primeros días de la fermentación del vino contribuye significativamente a las propiedades aromáticas de los vinos. (Rementeria *et al*., 2003). La adición de levaduras nS a un cultivo iniciador con *S. cerevisiae* constituye una estrategia para mejorar la calidad del vino, con relación a lo que ocurre en fermentaciones espontáneas (Rojas *et al*., 2001).

En la industria vinícola mexicana, las levaduras utilizadas para inocular los mostos provienen de importación, lo que implica una dependencia tecnológica y una fuga de divisas. Además, éstas han sido seleccionadas de acuerdo a las necesidades de los países que las han obtenido y patentado, por lo que no necesariamente responden a las necesidades de los vinos mexicanos.

Aparentemente, en México no se cuenta con tecnología para la selección de levaduras nativas enológicas, por lo que el objetivo de este trabajo fue aislar, evaluar algunas características enológicas, como la producción de glicerol, actividad β glucosidasa entre otras y, finalmente, identificar cepas nS nativas seleccionadas en la región vitivinícola de Querétaro.

II. REVISIÓN DE ANTECEDENTES

2.1 El vino

2.1.1. Definición

El vino es el alimento, producto de un complejo de interacciones biológicas y bioquímicas entre el jugo de la uva y diferentes microorganismos (hongos, levaduras, bacterias acido lácticas, bacterias acido acéticas), obtenido exclusivamente por fermentación alcohólica, total o parcial, de uva fresca, estrujada o no, o de mosto de uva (BOE, 2003; Jolly *et al*., 2006).

2.1.2 Antecedentes históricos

2.1.2.1 A nivel mundial

Los primeros testimonios del cultivo de la vid datan del año 12 000 a.C., en Asia menor, en las regiones cercanas al mar Caspio y al mar Negro. En el año 3000 a.C. los egipcios ya contaban con conocimientos para la elaboración de vinos (Gimeno, 2007). En China en el año 2285 a.C., se castigaba a quienes adulterarán el vino de uva (André, 2008). Los griegos convirtieron el vino en un artículo de comercio muy importante, habiéndose encontrado ánforas de vino griego por todo el Mediterráneo, Egipto y el Oriente Medio.

Los romanos extendieron la cultura del vino, los métodos de cultivo de la vid y posiblemente también algunas variedades de vid durante sus conquistas por Europa. Éstos hicieron avances vinícolas importantes, como la primera clasificación de variedades de vid, inventaron el barril de madera y sometían al vino a calor en habitaciones llenas de humo, lo que podría considerar como un procedimiento primitivo de pasteurización (Valencia, 2010). Después de la caída del imperio romano, durante la época medieval, la iglesia fue la depositaria de los conocimientos de la civilización y durante siglos fue propietaria de muchos de los grandes viñedos de Europa (España, 2004).

2.1.2.2 En México

México es considerado el productor más antiguo de vino de América. En la época precolombina los indígenas utilizaban las vides silvestres para hacer una bebida a la que le agregaban frutas y miel. La vinicultura mexicana se originó como tal en el siglo XVI con la llegada de los españoles al nuevo mundo. Los conquistadores y los misioneros mandaron traer vides europeas a México, pues eran parte de su dieta cotidiana y en las celebraciones eucarísticas. El viñedo de la Nueva España se extendió a partir de la capital del virreinato hacia las regiones septentrionales, Baja California y Sonora, las vides se adaptaron y se volvieron lo suficientemente productivas para la elaboración de vino y aguardiente, así que la corona prohibió la plantación de más viñas en México, por temor a que se volviera competencia para el vino peninsular, permitiendo el uso de las viñas existentes para el consumo local, lo que propició un gran retroceso en el desarrollo de la vitivinicultura mexicana. Posteriormente, el desarrollo vitivinícola se detuvo con la guerra de independencia, el Porfiriato y la época revolucionaria, estos acontecimientos marcaron la época negra de la vitivinicultura nacional, una de las etapas más dramáticas y decadentes de esta actividad, no fue sino hasta 1917 que México comenzó a producir vinos de manera seria. En 1948 se formó la asociación Nacional de vitivinicultores por las empresas productoras de vino más importantes (Contreras y Ortega, 2005).

Durante la década de los 70´s las principales empresas de brandies incrementaron la elaboración de vinos de mesa en respuesta a las medidas creadas por el gobierno para disminuir el consumo de bebidas alcohólicas, propiciando que la calidad de los vinos mexicanos mejoraran, debido a la implantación de uvas seleccionadas, la instalación de cavas de vinificación y la integración de los procesos de la ciencia enológica moderna (Gimeno, 2007).

La crisis económica en los años 80´s provocó problemas de implantación de mercancías, aumentando el consumo de vinos nacionales. Esta condición positiva no duró mucho, ya que reabrieron las fronteras como consecuencia de los tratados de libre comercio con América del Norte y Chile se comenzó a comercializar vinos extranjeros de manera amplia e indiscriminada, originando el cierre de más de 50 compañías productoras de vino, este fracaso fue atribuido al poco apoyo otorgado por parte de las autoridades mexicanas, pero la verdadera razón por la que se suscitó este problema fue que las casa vinícolas mexicanas antes de preocuparse por la calidad del vino, se enfocaban al volumen (Gimeno, 2007).

En la década de los 90´s, México empezó a expandirse en mercados internacionales gracias al esfuerzo de un gran número de productores der vino mexicano de alta calidad, esto fue en la segunda oleada de vinos del nuevo mundo, que de acuerdo a la Asociación Nacional de vitivinicultores estos vinos son los que se producen en lugares que no necesariamente cuentan con una tradición vitivinícola centenaria de alta calidad (Gimeno, 2007).

Actualmente existen algunas zonas naturales apropiadas para la producción del vino en los estados de Baja California, Coahuila, Zacatecas, Aguascalientes, Querétaro, Chihuahua y Durango (Contreras y Ortega, 2005). En el primero, donde se elaboran los vinos más conocidos de México (Duhart y Corona, 2010)

En el Estado de Querétaro, México, situado en la zona centro del país, se distinguen al menos dos regiones vitívinicolas, una de ellas corresponde al Valle de San Juan del Río y la otra se encuentra dentro de los municipios de Tequisquiapan y Ezequiel Montes.Después de haber sufrido una severa crisis en los años ochenta y noventa debida a los altos costos de producción, bajos precios de la uva, desconocimiento de la tecnología de producción y las importaciones, la industria vitivinícola queretana ha resurgido, con una tendencia al incremento en la superficie establecida y a la mejora de la calidad de sus uvas y sus vinos, fundamentalmente tintos, para lo cual se han establecido nuevas plantaciones con variedades finas, como `Merlot´,`Cabernete Sauvignon´, `Syrah´, `Tempranillo´, etc., sin embargo, debido al desconocimiento del potencial de las distintas regiones para la producción de vinos de calidad, este crecimiento no ha sido ordenado (De la Cruz *et al.*, 2012).

2.1.3 Importancia económica

2.1.3.1 Mundial

En 2012 el viñedo mundial alcanzó una superficie total de 7.575 millones de hectáreas. De este total, Europa representa alrededor de 44 % de la producción mundial de uva. Asia aproximadamente un tercio (28,7 %) y América alrededor de un quintil (21 %); África 5,9 % y Oceanía 3 % (OIV, 2013).

La estimación de la OIV (Organización internacional de la viña y el vino) de la producción mundial de vino en 2012 puede situarse en 251 millones de hectolitros, 15,8 millones menos que en 2011. El primer país productor de vino es Francia, con 42,2 millones de hL (16,8%

mundial), seguido por Italia, con 40,1 millones de hL (16% mundial), y España, con 29,7 millones de hL (11,8% mundial y 21% de la UE). Ya con menor volumen, la producción crece en Portugal (+500.000 hl), Grecia (+400.000 hl) y Alemania (+368.000 hL), y decae en Hungría (-876.000 hL), Austria (-703.000 hL) y, Bulgaria (-197.000 hL) (ICEX, 2013). El consumo mundial de vino en el 2012 se estimó de 245,3 millones de hectolitros, teniendo un retroceso del 10% comparado con el año 2011(OIV 2013).

2.1.3.2 En México

La industria vitivinícola mexicana produce 1.5 millones de cajas de vino al año, de las cuales 1.2 millones se quedan en el mercado nacional y más de 300 mil se exportan (alrededor de 20 %) la mayor parte al mercado europeo (ICEX, 2010).

En el país existen cerca de 3,350 ha destinadas al cultivo de la vid para la producción de vino, destacando los estados de Baja California, Zacatecas, Coahuila y Querétaro, con aproximadamente 38 mil toneladas de uva en cada ciclo agrícola. A pesar de que México es considerado el productor más antiguo de vino en Latinoamérica, la industria de vinos de calidad en el país es relativamente reciente (ICEX, 2010).

En la actualidad la producción de vino en México sigue siendo inferior a la cantidad de vino importado. Aproximadamente, 75 % del vino que se consume en México es procedente del exterior. El consumo de vino, a pesar de haber aumentado en los últimos años hasta alcanzar los 600 mL *per capita*, sigue siendo muy reducido en comparación con países eminentemente productores como España, Italia o Francia, donde el consumo se estima en 50 L *per capita* (ICEX, 2013).

En el Estado de Querétaro, situado en la zona centro del país, se distinguen al menos dos regiones vitícolas, una de ellas correspondiente al Valle de San Juan del Río, y la otra región está situada dentro de los municipios de Tequisquiapan y Ezequiel Montes, donde se han establecido nuevas plantaciones con variedades finas como ‘Merlot’, ‘Cabernet Sauvignon’, ‘Syrah’, ‘Tempranillo’, etc., y en la actualidad la superficie establecida con viñedos es de 212 ha (De la Cruz *et al*., 2012).

2.1.4 Clasificación de los vinos

Los vinos se clasifican con base en distintos criterios, entre los más importantes tenemos el color, el contenido de azúcar, de alcohol y de gas carbónico. Por lo que respecta al color, la clasificación más aceptada es la siguiente (Navarre, 1998):

- Blancos. Son aquellos cuyo color es amarillo, con tonos que van de paja al verduzco. Su contenido alcohólico varía entre 8.5 a 11.5 % y el de azúcares residuales es inferior a 2 g/L. Estos vinos se elaboran con uvas blancas o con uvas rojas de pulpa blanca, evitando en este último caso la difusión del color de los hollejos.

  -Rosados. Los vinos de mesa cuya coloración es rosada, se elaboran a partir de la uva tinta o mezcla de uvas tintas y blancas, cuyo mosto fermenta sin orujo, del mismo modo que un blanco, en ausencia de partes sólidas, adquiriendo su color característico en una etapa de maceración prefermentativa del mosto junto con sus hollejos.

- Claretes. Es un vino cuyo color es rojo ligero y pálido. Su composición general lo asemeja a la del vino tinto. Procedente de mostos de mezclas de uvas blancas y tintas o de sus mostos y cuya fermentación se hace en presencia de los hollejos tintos. Los claretes más conocidos son elaborados con un 80% de mosto blanco y 20% de la vendimia tinta.

  -Tintos. Son aquellos cuyo color es el rojo que puede incluir tonos de rubí a púrpura. Su graduación alcohólica se sitúa entre 8.5 y 12.5% y su contenido en azúcares residuales menor a 2 g/L. Estos se elaboran con uvas rojas, con un tiempo de maceración adecuado para permitir la extracción suficiente de la materia colorante de los hollejos.

Por lo que respecta al contenido de gas carbónico, podemos considerar inicialmente dos grupos (Gil *et al.*, 2009):

-Los vinos espumosos, es decir aquellos que presentan una concentración importante de gas carbónico y que, por lo tanto, son efervescentes.

-Los vinos tranquilos, son aquellos que no presentan gas carbónico de manera importante.

Además, los vinos también se clasifican por su contenido de azúcar en (Hernández *et al.*, 2003; OIV-MA-AS311-01A):

-Secos. Como aquellos que no contienen azúcar, su contenido máximo de azúcar residual es 5 g/l y el contenido de ácido (expresado como ácido tartárico) debe ser, a lo sumo, 2 g/l más bajo que el de azúcar residual.

- Semidulces. Su contenido máximo de azúcar residual es 5 a 25 g/L y el contenido de ácido (expresado en ácido tartárico) no sobrepasa 18 g/l.

-Dulces. El contenido de azúcar es de forma natural o por adición, Su contenido mínimo de azúcar residual es 25 g/l.

De acuerdo a la graduación alcohólica (porcentaje de alcohol en volumen) los podemos clasificar como (Gil *et al.*, 2009):

- Vinos de mesa son aquellos de graduación inferior a 14.5°.
- Vinos de licor, licorosos, generosos o fortalecidos su porcentaje de alcohol en volumen iría aproximadamente desde los 15° a los 23°.

2.2. Las vinificaciones

La vinificación es el conjunto de operaciones llevadas a cabo para transformar en vino las uvas y sus mostos. Los diferentes tipos de vino tienen procedimientos diferentes de vinificación e instalaciones, incluso cambia de un lugar a otro según el vino que se quiere obtener y las costumbres y tradiciones del lugar. Los grandes grupos de vinificaciones son: en vino blanco, rosado y tinto, que corresponden siempre a patrones generales. Los diferentes tipos de vinificación se componen en términos generales de las etapas que acontinuación se describen desde la materia prima hasta obtener el producto (Peynaud, 1977).

2.2.1. Composición de la materia prima

Desde el punto de vista enológico, un racimo de uvas lo podemos dividir en dos partes (Gallego, 2011):

a) Raquis o raspón: es un soporte leñoso y absorbente. De él se sostienen los granos. Corresponde aproximadamente a 3 a 6 % del peso total del racimo. Aporta taninos y agua. Es un elemento que puede o no estar presente en la elaboración del vino, dependiendo de la técnica de vinificación que se emplee. Su composición es la siguiente:

- Polifenoles o Taninos (3 %): Son las sustancias responsables del color, el gusto amargo, la astringencia, la capacidad de envejecer y el cuerpo del vino.
- Agua (78 a 80 %)
- Materiales minerales (2 a 3 %). Un medio de este porcentaje pertenece a sales de potasio

b) Baya o grano: es el auténtico fruto. Se encuentra unido al raspón por el pecíolo, que es un pequeño segmento vegetal. El contenido del grano es la pulpa y representa de 80 a 85 % del peso del racimo. Los elementos de la uva influyen directamente en el sabor y fineza del vino y son (Gallego, 2011; Pérez 2001):

- Epicarpio: También se le llama hollejo o piel. Es una fina capa esférica que rodea la pulpa, teniendo una función de protección. Es muy resistente y aislante, así como impermeable. Sobre ella se encuentra pruina, sustancia sobre al cual se adhieren las levaduras. Representa aproximadamente 8 % del peso total de la baya. Su contenido es alto en celulosa, pectina, proteínas y taninos, pero sobre todo en sustancias aromáticas y precursores de colorantes: Flavonas (variedades blancas) y antocianos (uvas tintas)

  Composición química:
  - Materias colorantes:
  - Antocianos (color rojo-blancas y tintas)
  - Flavonoides (color amarillo-sólo tintas)
  - Aromas varietales: propios de cada cepaje de uva
  - Sustancias pépticas: polisacáridos que a veces presentan problemas en la vinificación.
  - Taninos
  - Enzimas
- Semillas: Son cuerpos duros que se encuentran en el centro de la pulpa. Están dispuestas de forma simétrica y su número es variable. Representan en torno a 3% del peso, Son las semillas de la uva y son ricas en sustancias aceitosas. Contienen:
  - Taninos 5 a 8%

- Aceites 10-12%

Durante las operaciones mecánicas de vinificación, trituración, prensado, es recomendable no aplastarlos, a fin de evitar que exceso de disolución de los taninos que puedan dar un sabor muy astringente y una cierta cantidad de aceite de semilla, que puede afectar a la calidad del vino

- La pulpa: Representa la parte más importante del racimo, que es extraída en el estrujado de la uva y que después de la fermentación se transformará en vino. Se compone de células grandes con paredes muy delgadas, con grandes vacuolas coresponde solución acuosa de azúcares, ácidos y otras sustancias. Representa del 80-85% del peso total del racimo. Y está compuesta de (Gallegos, 2011):

- Azúcares
  - Glucosa
  - Fructosa
- Ácidos orgánicos.
  - Ácido tartárico. Tartárico que da astringencia y logra la fineza y redondez del vino.
  - Ácido málico. Actúa como preservador y desaparece en la maduración.
  - Ácido cítrico
- Materiales minerales
  - Aniones (SO_4^{-2}, Cl^{--} , PO_4^{---})
  - Cationes (K^{+}, Ca^{++} ,Mg^{++} ,Fe^{++})
- Sustancias nitrogenadas (ácidos, péptidos, sales de amonio)
- Sustancias pécticas
- Enzimas(hidrolasas,oxidasas)
- Vitaminas. (A, complejo B y C)
- Agua. (ocupa 70 a 85 %)

2.2.2. Seguimiento de la maduración

La maduración se suele definir como el periodo comprendido entre el envero y la vendimia (duración de 40 a 53 días). Entre la madurez fisiológica y la madurez enológica, se aprecia generalmente una leve pérdida de peso de l as bayas que corresponde a la pérdida de

agua, que resulta ser más elevada cuanto más cálido y seco es el clima. El estado de maduración de la uva condiciona en gran manera la calidad e incluso el tipo de vino (blanco seco, suficientemente ácido, afrutado o uno de acidez débil, poco aromático y con cierta cantidad de azúcares) (Blouin y Guimbertrau, 2002).

La formación del grano de uva comprende cuatro periodos (Aleixandre, 2006):

1° El periodo herbáceo (50 a 60 días).Va desde el cuajado, momento en que se forma el grano, hasta el envero, momento en que la uva cambia de color. El grano de uva se comporta como los otros órganos vegetativos de la plata participando, por lo tanto, en la fotosíntesis. Durante este periodo los azúcares empiezan a aparecer en el grano en concentraciones del orden de 10 a 20 g/L. y los ácidos se van acumulando en el grano.

2° El envero. Corresponde a la etapa fisiológica de la coloración de la uva. El grano engorda y adquiere elasticidad. Un grano de uva envera en un sólo día. El azúcar de las uvas aumenta de modo repentino y brusco, debido a una intensa migración de azúcar de las partes vegetativas de la planta hacia el grano, aumentando su concentración de 20 a 100g/L, mientras la acidez empieza a disminuir.

3°La maduración. Comprende desde el envero al estado de madurez fisiológica, que corresponde a la parada de migración de azúcares hacia el grano. Durante los 40 ó 50 días que dura, la uva continúa engordado, acumula azúcar y pierde acidez.

4° La sobremaduración. Sigue al periodo de la maduración cuando la uva permanece mucho tiempo en la cepa. El fruto vive de sus reservas pierde agua y el contenido del grano se concentra.

La cantidad de azúcares formados por la fotosíntesis y acumulados por la uva, depende de la duración de la insolación durante el periodo de maduración. Por eso los climas más cálidos, y por lo tanto más soleados, son los que dan las uvas más ricas en azúcares y los vinos más alcohólicos (Aleixandre, 2006).

La maduración puede llevar consigo la evolución de seis variables principales (Flanzy, 2003):

- Acumulación de azúcar
- Disminución de la acidez (consecuencia de la combustión y de la dilución del ácido málico, del ácido tartárico y en la acumulación de potasio)

- Aumento de volumen
- Hidrólisis de ciertos constituyentes que participan en la estructura de la pared celular (polisacáridos principalmente, responsables del reblandecimiento del fruto; durante este tiempo, las semillas evolucionan de una manera opuesta: esclerificación, lignificación y depósito de una cutícula externa lipídica)
- Acumulación de taninos y de antocianos en la piel de las variedades coloradas
- Biosíntesis de los precursores de aromas.

La acidez de la uva disminuye durante la maduración. Los ácidos orgánicos de la uva (tartárico y málico) son degradados por fenómenos de respiración. El ácido málico se transforma en azúcar hacia el final de la maduración. Esta es la causa más importante del aumento del azúcar. Cuanto más cálido es el verano, más disminuye el contenido de ácido málico de la uva, ocurriendo lo contrario si el verano es más fresco. Este comportamiento pone de manifiesto las diferencias de acidez que existen entre vinos elaborados con uvas de diferentes climatologías (Aleixandre, 2006).

La baya de uva madura contiene la misma cantidad de ácido tartárico que el grano de uva verde. La sequía hace disminuir su contenido en el grano de uva, que vuelve a aumentar en periodo húmedo porque sigue la migración de agua en la planta (Palacios, 1997).

2.2.3. Operaciones prefermentativas

a) Estrujado. Consiste en romper el hollejo de la uva de modo que libere la pulpa y el zumo, sin romperse la semilla. El estrujado puede ser más o menos intenso según que el hollejo sea simplemente aplastado o triturado. La estructura de la pulpa puede permanecer casi intacta o, por lo contrario las gruesas vacuolas de las células liberaran todo el zumo. En vinificación de tintos ha de ser del todo eficiente esa operación, ya que los componentes del hollejo han de intervenir de forma importante en la constitución del color y el cuerpo del vino (Peyaud, 1977; García Junco, 2001).

b) Despalillado (descobajar). Consiste en separar los granos de uva de la parte leñosa del racimo. En la actualidad esta operación se realiza después del estrujado, al contrario de lo que sucedía antiguamente, cuando el despalillado se hacía a mano (Peyaud, 1977).

c) Sulfitado. Consiste en aplicar una cantidad de anhídrido sulfuroso a la vendimia ya que opera como antioxidante y antioxidásico. Este compuesto activa la difusión de color en la maceración, es bactericida y fungicida, selecciona levaduras y las activa. Las dosis están en función de la calidad de la vendimia, madurez, sanidad y acidez. Las dosis de SO_2 se expresan en cantidades añadidas, es decir, en SO_2 total. Se expresa en gramos de SO_2 por hectolitro de mosto o de vendimia estrujada o despalillada. En los casos del sulfitado de vendimias enteras (en el camión de recepción en ausencia de estrujado), la dosis se expresa por hectolitro de mosto al obtener.

-La dosis básica es de 5 g/hl de SO_2 (50 ppm). Una vendimia calurosa, poco ácida, puede sulfitarse de 7 a 8 g/hl mientras que una vendimia fresca, muy sana, puede sulfitarse solamente con 3 a 4 g/hl.

-Los sulfitados inferiores a 3 g/hl son casi todos insuficientes puesto que no pueden controlar las levaduras propias de la uva y las oxidasas de los racimos que pueden aumentar provocando fuertes formaciones de SO_2 endógeno. Sólo la elaboración de vinos procedentes de orujos puede hacerse sin sulfitar.

-Los sulfitados superiores a 8 o 10 g/hl correspondería a una vendimia alterada y a una higiene dudosa, incompatibles con los vinos de calidad (Blouin y Peynaud, 2003).

d) Inoculación de levaduras

Es la operación de incorporar levadura al mosto, en la actualidad se agregan cultivos puros y seleccionados, con el fin de asegurar un inicio del proceso en el momento deseado (Hernández, 2003).

2.2.4. Encubado

Esta etapa comprende desde la introducción de la vendimia estrujada y despalillada o en la cuba de fermentación, hasta el descube (Gil *et al*., 2009).

Se conducen mosto y hollejos mediante una bomba a depósitos cerrados de acero inoxidable o madera, se llenarán a un 80 % para evitar desbordamientos cuando se inicie la fermentación, se suele realizar un sulfitado, se producirá la fermentación alcohólica y la maceración, esta última que, tendrá como consecuencia la difusión de la materia colorante y de todos sus elementos sápidos y aromáticos de estos en el líquido, manteniendo una temperatura

entre 25 y 28 °C en este proceso para evitar pérdida de aromas por evaporación y muerte de levaduras.

También, el gas carbónico que se produce en la fermentación tenderá a empujar los hollejos hacia la parte superior del depósito y estos formaran el sombrero (que si se deja, forma una dura costra), que habrá de sumergir frecuentemente en el mosto, homogeneizando la masa y facilitando las extracciones de aromas y color (Blouin y Peynaud, 2003). Para ello, los depósitos más modernos incluyen sistemas mecánicos de aspas, que mueven periódicamente el interior del mismo. Sin embargo, el sistema más tradicional, supone el realizar las siguientes operaciones:

-Remontado. Sacar el mosto que está fermentando, por la parte inferior y regar con él la parte superior donde se encuentra el sombrero con los orujos. Al principio se realizan con más frecuencia para facilitar el trabajo de las levaduras, disminuyéndose su frecuencia al final de la fermentación.

-Bazuqueo. Ejercer presión para romper y hundir el sombrero. Esta operación se hace normalmente dos veces al día.

Este proceso, que se denomina fermentación tumultuosa, finalizará en un plazo a determinar por el enólogo (suelen ser de 7 a 10 días). Aunque este período puede variar en función de si el vino va a tener un mayor o menor grado de crianza. Los vinos dedicados a crianzas largas, necesitan concentraciones de color y taninos superiores que lo otros, pues eso les garantiza su conservación en el tiempo (García, 2011).

2.2.4.1. La maceración

Es una extracción fraccionada de sustancias que se encuentran en la parte sólida de la uva al permitir el contacto del mosto con los hollejos. El vino tinto es un vino de maceración, está constituido por sustancias del zumo de la uva, pero también por las que se encuentran en la parte sólida: turbios de la pulpa, hollejos y pepitas. Es preciso fraccionar todo los componentes útiles de la uva, es decir los que estan dotados de buen aroma y buen sabor. En la piel y en las pepitas hay sustancias de sabor herbáceo, vegetal, acre, amargo, sustancias con olor y sabor a hojas. La maceración debe ser suave y conducida de tal modo que no se disuelvan dichos componentes. La maceración se lleva a cabo comúnmente utilizando las operaciones de remontado y bazuqueo (Peynaud, 1977; García Junco, 2001).

2.2.4.2. Termovinificación

La técnica de la termovinificación consiste en el calentamiento de la vendimia, antes de la fermentación, con el fin de extraer los componentes fenólicos rápidamente al destruir las células de los hollejos. Se suelen utilizar temperaturas entre los 60 °C y los 70 ºC, suele ser de 20 a 80 minutos, sin embargo algunos autores mencionan que se puede llevar a cabo en tiempos inferiores a 3 horas. Inmediatamente, terminado este proceso, la uva se enfría y se prensa, continuando la fermentación sin las partes sólidas de la uva (Fischer *et al*., 2000).

Este sistema por lo tanto, permite ahorrar espacio en los depósitos de fermentación. Este hecho justifica por sí mismo el interés puesto en esta técnica. El calentamiento de la uva mejora el rendimiento del prensado y aumenta la extracción de compuestos fenólicos entre un 20 y un 40 %, obteniéndose en un primer momento mostos con una elevada intensidad colorante y concentración de antocianos (Fischer *et al*., 2000). Al mismo tiempo, se destruyen las levaduras nativas, facilitando el desarrollo de los cultivos iniciadores, y se inactivan las enzimas oxidativas, especialmente la lacasa producida por *Botrytis cinerea* (Blouin y Peynaud, 2003). Por lo tanto, se pueden procesar mediante esta técnica vendimias alteradas por mohos, impidiendo su oxidación (Ribéreau-Gayon *et al*., 2006).

Esta técnica no está exenta de inconvenientes, pudiendo resumirse en uno sólo: la baja calidad del producto final. Los vinos obtenidos mediante termovinificación presentan problemas de tipo sensorial: pérdida de aromas primarios, aparición de aromas extraños, amilíticos y amargos y pérdida de frescor y astringencia. Si hay un exceso en la temperatura o en el tiempo de tratamiento, pueden formarse aromas procedentes de la reacción de Maillard. También, se ha demostrado que aunque en un primer momento el color del mosto aumenta con respecto a la vinificación tradicional, éste no es estable desapareciendo las diferencias durante la fermentación o la maduración del vino. Todos estos problemas han provocado que en la actualidad este sistema apenas se utilice (Hidalgo, 2003).

2.2.4.3. La fermentación alcohólica

Es la conversión glucosa y fructosa en etanol y dióxido de carbono como metabolitos principales por acción de las levaduras. El desarrollo de la fermentación alcohólica está ligado a la fase de crecimiento de las levaduras (Hidalgo, 2010).

La velocidad de fermentación, expresada como cantidad de azúcar trasformado en unidad de tiempo, es muy variable al depender de una gran cantidad de factores, no obstante la velocidad de desprendimiento de anhídrido carbónico oscila entre 0.4 a 2.8 g/L·h, que corresponde a una velocidad de consumo de azúcar de 0.9 a 6.0 g/L·h.

La temperatura es uno de los factores que más influyen en la cinética de las fermentaciones, siendo más activa cuando ésta es más elevada y hasta el límite vital de las levaduras. Una temperatura alta al principio de la fermentación, aumenta efectivamente la velocidad fermentativa, pero puede conducir a una parada de la fermentación hacia el final de la misma. La temperatura es un parámetro de cuidado en la fermentación, debe esta debe estar alrededor de 26 °C y 18 °C para vino tinto y blanco respectivamente.

Las condiciones de anaerobiosis deben ser conservadas y proveer un suministro de oxígeno necesario para la levadura con los remontados (Hidalgo, 2003).

2.2.5. Descube

Una vez terminada la fermentación principal, se separa por gravedad el mosto-vino de los hollejos y lías (depósito de materias sólidas compuesto principalmente por restos celulares, tártaro, levaduras, etc.), vaciando el tanque, del cual el vino constituye el 85 % del contenido total y se almacena en otro depósito, donde realizará la fermentación lenta o de acabado (García, 2011). Para mejor aprovechamiento se prensan los hollejos para extracción del líquido embebido (Aleixandre, 2006).

Cuando se prensa antes del final de la fermentación, al pasar el mosto sin hollejo a otro recipiente la fermentación continúa. Cuando la fermentación finaliza y los residuos caen al fondo del recipiente se procede al segundo descube. Se puede sacar el líquido por un grifo (ubicado debajo del recipiente pero por encima del nivel máximo de altura de las impurezas) o se puede utilizar un sifón o bomba en la parte superior del recipiente (Aleixandre, 2006).

2.2.6. Fermentaciones terminales

En el momento en que el vino tinto nuevo es descubado del envase en el cual se ha desarrollado la fermentación tumultuosa todavía no está terminado. Tiene que pasar aún por otras transformaciones biológicas, modificaciones que suceden lentamente pero cualitativamente

importantes a esta fase, se le llama de acabado y corresponde a las fermentaciones secundarias, de acabado o de afinamiento, tal y como lo es la fermentación maloláctica llevada a cabo por bacterias lácticas presentes en el vino o adicionadas, las cuales transforman el ácido málico en ácido láctico y ácido carbónico. Esta es la causa directa de la disminución de acidez en el vino (Peynaud, 1977; Vincent *et al.,* 2006).

2.2.7. Maduración

Durante el almacenamiento acontecen en el vino una serie de cambios químicos y físicos. Estas transformaciones son cuando el vino empieza a desarrollar sus cualidades gustativas, adquiriendo la limpidez, la estabilidad, y que se conoce como crianza o maduración del vino, es anterior al embotellado. El tiempo de maduración depende de la clase de uva, el tipo de trasiego, el tamaño, la clase de la cuba, y la temperatura de la bodega (Hernández, 2003).

El periodo de envejecimiento propiamente dicho, se hace en botellas y proporciona al vino la calidad óptima.

Durante la fase de maduración el vino permanece en contacto, más o menos intermitente, con el aire. Por ejemplo, durante los trasiegos y diversos tratamientos a que se ve sometido. El tonel, forma de almacenamiento tradicional, no es totalmente hermético y no limita el contacto con el oxígeno. Por el contrario, en la segunda parte del envejecimiento, la penetración del aire en la botella puede considerarse nula y el vino envejece completamente protegido del aire (Aleixandre, 2006)

El ritmo de estas transformaciones, el tiempo durante el cual el vino se desarrolla y permanece agradable para beber, caracteriza la vejez del vino, variable según los tipos, el origen y las características de la cosecha. Algunos vinos envejecen rápidamente, no se conservan, y otros, por el contrario, no envejecen, permanecen en el mismo estado en que se encontraban en el momento de su embotellado. La riqueza en compuestos fenólicos, especialmente en taninos, asegura la longevidad de los vinos tintos, aunque no es el único factor (Peynaud, 1977).

Las transformaciones globales de la maduración y del envejecimiento pueden descomponerse en un determinado número de fenómenos: oxidaciones, modificaciones de la constitución de las materias colorantes y modificaciones de los elementos del aroma (Peynaud, 1977).

2.2.8 Clarificación y conservación del vino

Una vez que el vino ha sido obtenido es necesario que pase por procesos de estabilización por medio de prácticas como la clarificación que impida que el vino sufra accidentes es decir que mantenga su color y limpidez, que no sufra quiebras de naturaleza microbiológica o química. Al obtener un vino estable se debe conservar en barrica o en botella (García-Junco, 2001).

La clarificación del vino consiste en la eliminación de macromoléculas que contiene el vino en pequeña concentración, pero que lo hacen ver opalescente o ligeramente turbio. Se puede clasificar en espontánea e inducida (Valencia, 2008).

*2.2.8.*1 *Clarificación espontánea o autoclarificación*

En los primeros tiempos de la vida del vino, ayudándose con los trasiegos (operación de separar el vino claro de los depósitos o lías que se forman en la parte inferior de barriles o cubas) de un envase a otro, que se realizan varias veces al año (Navarre, 1998).

- En el primer trasiego del primer año su objetivo es separar rápidamente el vino de sus lías. Se lleva a cabo de 15 días a tres semanas después del descube.
- En segundo trasiego se hace en invierno, poco después de los primeros fríos que provocó la precipitación de bitartrato de potasio.
- Tercer trasiego (marzo a abril): se produce a principios de primavera
- Cuarto trasiego (junio a julio) a veces se hace antes de que las altas temperaturas inicien.
- En el segundo año, el vino se trasiega de una a dos veces.

La presencia de heces (restos precipitados producto de la fermentación) en contacto con el vino clarificado puede tener desventajas, ya que estas pueden contener microorganismos de alteración, pueden ser resuspendidas en cualquier momento devolviéndole turbidez al vino y son sitio de reacciones químicas, en particular la reducción puede dar lugar a H_2S (sabor a huevos podridos). La velocidad de esta autoclarificación depende de la riqueza del vino en coloides protectores. Los vinos tintos clarifican más rápidamente, los blancos tardan mucho más tiempo en clarificar y a veces no se consigue nunca. Hoy en día es difícil esperar a que se produzca esta autoclarificación por su lentitud, sobre todo en vinos que se requieren comercializar jóvenes (Navarre, 1998).

2.2.8.2 Inducida

Añadiendo coloides proteicos (gelatinas, albúminas, la caseína, también se utiliza la "cola" mineral, la bentonita), por regla general, son proteínas capaces de coagularse en él y de producir grumos y su sedimentación clarifica el vino (Molina, 2000).

a) Filtración. Por tamizaje, adsorción y las dos anteriores combinadas.
b) Centrifugación. Centrifugas clásicas para pre filtración (500 a 8000 g) y las ultracentrífugas utilizadas antes de clarificación por colas (14000 a 15 000 g).

2.3 Las levaduras

2.3.1 Definición

Las levaduras son hongos unicelulares eucariótidos pertenecientes al reino *Fungi* (la mayoría pertenecientes a las clases *Ascomycete*, *Basidiomycete*), se dividen asexualmente por gemación o fisión binaria y el tamaño de una célula individual varía de 2 a 3 µm y de 20 a 50 µm de largo y de ancho de 1 a 10 µm. (Kavanagh, 2011).

2.3.2 Clasificación

Las levaduras son un grupo diverso filogenéticamente de hongos. Sus estados sexuales (telemorfos) pueden ser clasificados principalmente en dos clases, los *Ascomycetes* y los *Basidiomycetes.* A continuación se muestran las familias de relevancia enológica (Hidalgo, 2003).

Ascomicetos

Familia *Schizosaccharomycetaceae*:

Género *Schizosaccharomyces*.

Familia *Metschnikowiaceae*:

Género *Metschinikowia*.

Familia *Saccharomycetaceae*:

Géneros *Saccharomyces, Debaryomyces, Dekkera, Kluyveromyces, Pichia,* Zygosaccharomyces y Torulaspora.

Familia *Saccharomycodaceae*:

Género *Hanseniaspora y Saccharomycodes*.

Familia *Candidaceae*:

Género *Brettanomyces, Candida y Kloeckera.*

Basidiomicetos

Familia *Sporobolomycetaceae*:

Género *Rhodotorula*.

Familia *Cryptococcaceae*:

Género *Cryptococcus*.

2.3.3 Características generales

La estructura de una levadura es la de una típica célula eucariota (Figura 2.1), su morfología es característica de cada especie, la levadura típica tiene forma ovoide, sin embargo podemos encontrar alargadas, esféricas, de forma de pera o de limón o incluso triangulares (Figura 2.2). En un cultivo puro se puede observar que existe variación en el tamaño y forma de las células, estas diferencias dependerán de la edad del cultivo y del medio donde se encuentren. No poseen flagelos ni otro órgano de locomoción y algunas pueden presentar un material viscoso, compuesto de polisacáridos, que rodea la célula. (García, 2004).

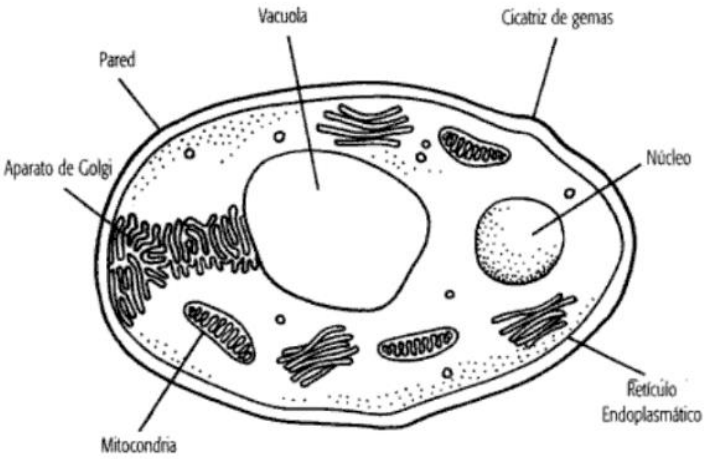


Figura 2.1 Diagrama de la estructura de una levadura

Ovaladas Apiculadas Alargadas Piriformes

Figura 2. 2 Esquema de distintas formas de levaduras

Las levaduras son capaces de crecer como anaerobios facultativos, si disponen de oxígeno las levaduras realizan una respiración aeróbica para metabolizar los azúcares hasta dióxido de carbono y agua, si carecen de oxígeno fermentan azúcares produciendo etanol y dióxido de carbono (Santamarina *et al.*, 1997). El rango de tolerancia de pH que tienen las levaduras va desde 2 hasta 8. Crecen generalmente a temperaturas en un rango de 0 a 50 ° C, sin embargo la mayoría tiene temperaturas óptimas de crecimiento entre los 20 y 30°C. Pueden desarrollarse en medios con concentraciones relativamente altas de solutos, además existe un grupo de levaduras que tolera cantidades de soluto aún mayores, por lo que se denominan osmófilas (García, 2004).

2.3.4 La vida de las levaduras

2.3.4.1 Multiplicación asexual

Las levaduras se reproducen asexualmente por medio de gemación, proceso en donde se forma una pequeña protuberancia en la periferia de la célula, la protuberancia se agranda, al llenarse de material citoplasmático proveniente de la célula madre, hasta alcanzar casi el tamaño de esta. El material nuclear se replica por mitosis y una parte pasa a la célula hija. Luego se forma la pared que divide a las dos células y la célula hija se desprende de la madre (García, 2004) (Figura 2.3).

La producción de las yemas puede ocurrir en uno o en ambos extremos de la célula, conocida como gemación polar, o puede producirse en diferentes lugares de la superficie celular (gemación multilateral o multipolar). En el lugar donde se formó una yema queda una cicatriz en la pared de la célula madre. En ocasiones, las células pueden permanecer unidas y formar yemas

nuevas, y así sucesivamente, formando cadenas de levaduras conocidas con el nombre de pseudomicelio (García, 2004) (Figura 2.4). Cuando se encuentran reproduciéndose de este modo se dice que son anamórficas (Jolly *et al.*, 2006).

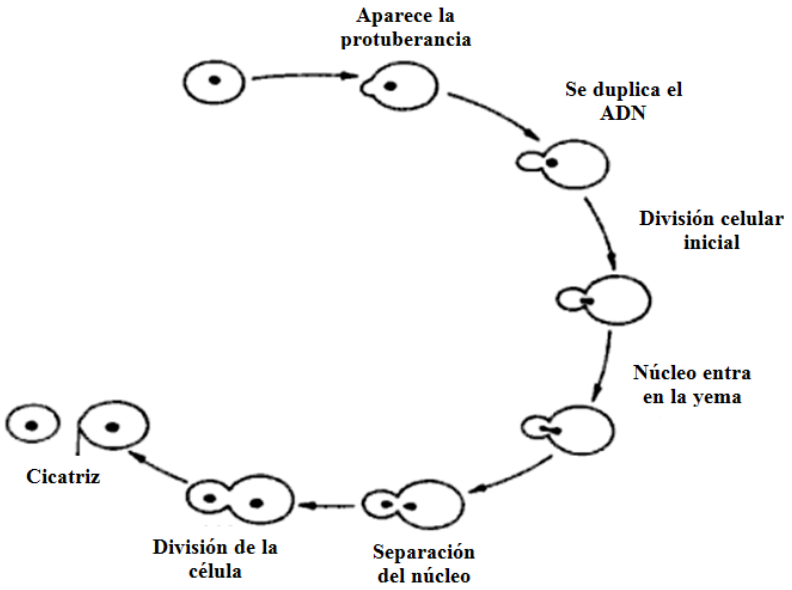


Figura 2.3 Esquema del proceso de gemación de las levaduras

Figura 2.4 Pseudomicelio formado por una levadura

2.3.4.2 Multiplicación sexuada

Cuando las células diploides de las levaduras esporógenas se encuentran en un medio que les es hostil cesan de multiplicarse por gemación. En seguida ocurre la fusión de dos células vegetativas compatibles, que al ponerse en contacto, sus paredes se disuelven produciendo la fusión de plasmas, después se unen los núcleos, originando una célula diploide (cigótica) que puede seguir reproduciéndose asexualmente por gemación (ciclo diploide), o puede entrar en un proceso meiótico, lo que da lugar a la formación de cuatro núcleos, estos son rodeados de

citoplasma y de pared propia, para convertirse en cuatro esporas o ascosporas haploides dentro de ascas con una gruesa pared celular (Figura 2.6) (García, 2004). La forma de las esporas varía según especies de levaduras (Hidalgo, 2003). Cuando se encuentran reproduciéndose de este modo se dice que son telemórficas (Jolly *et al.*, 2006). Cuando las ascosporas son liberadas, estas germinan y se reproducen asexualmente produciendo el ciclo haploide (Figura 2.5) (Hidalgo, 2003).

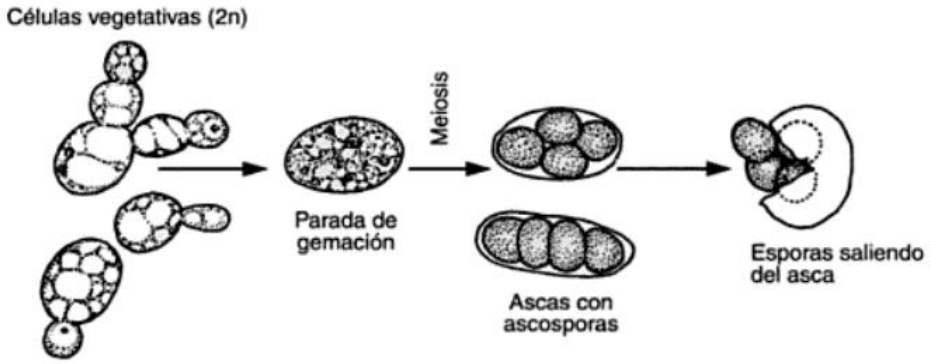


Figura 2.5 Fases de esporulación de las levaduras

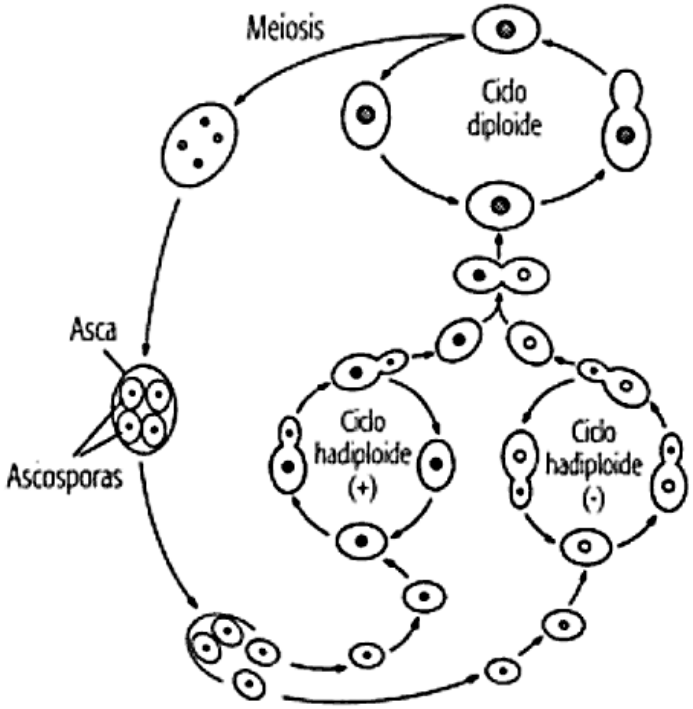


Figura 2.6 Esquema del ciclo de vida de una levadura ascosporada

2.4 Levaduras vínicas

Las especies de levaduras encontradas en diferentes nichos asociados a la uva (viñedos) y la producción de vino (bodegas, mosto, fermentación y vino) se dividen en dos grupos, el de *Saccharomyces* (S) y el grupo de *no-Saccharomyces* (*nS*) (Jolly *et al.*, 2006).

2.4.1 Sucesión de levaduras

Las diferentes especies de levaduras se relevan durante el curso de la fermentación. En la primera fase de la fermentación se encuentran las levaduras apiculadas, pertenecientes a los géneros *Candida*, *Debarymyces*, *Dekkera*, *Hanseniaspora*, *Metschnilowia*, *Pichia*, *Torulaspora* y *Zigosaccharomyces.* Carentes de esporas o con difícil formación de esporas se encuentran ya en la uva en estado de levaduras activas. Llamadas también de bajo poder fermentativo, pues a ellas se debe el primer grado de alcohol, no pueden formar más de 3 ó 4 grados de alcohol, sin embargo *Torulopsis bacillaris* puede formar de 10 a 11 grados de alcohol. Son sensibles a anhídrido sulfuroso, su participación es más reducida cuando las vendimias han sido sulfitadas. El crecimiento de estas especies de levaduras está limitado a los primeros días de la fermentación debido a su baja tolerancia a etanol. Estas levaduras producen reacciones en el mosto que aumentan el aroma y sabor final de los vinos (Peynaud, 1977; González *et al*., 2007).Después el medio es invadido por levaduras del género *Saccharomyces* (Navarre, 1998), debido al incremente de la concentración de alcohol y de las condiciones de anaerobiosis, pasa a ser la levadura dominante, pues las levaduras de la primera fase han desaparecido. *Saccharomyces* es la responsable de la fermentación desde las primeras etapas hasta su finalización (Figura 2.7). Este género se caracterizan de poder alcohógeno variado de 8 a 16 ° GL, inclusive pueden sobrepasar 18 ° GL en condiciones especiales (Peynaud, 1977). Durante la fermentación alcohólica las cepas que predominan son las mejor adaptadas a crecer en las condiciones del mosto (alto contenido en azúcares y presencia de anhídrido sulfuroso, entre otras).Debido a estas peculiaridades, durante las fermentaciones vínicas no inoculadas, se ha visto una sucesión de cepas de levaduras de la especie de *S. cerevisiae*, reduciéndose el número de cepas conforme va finalizando la fermentación alcohólica (González *et al.*, 2007).

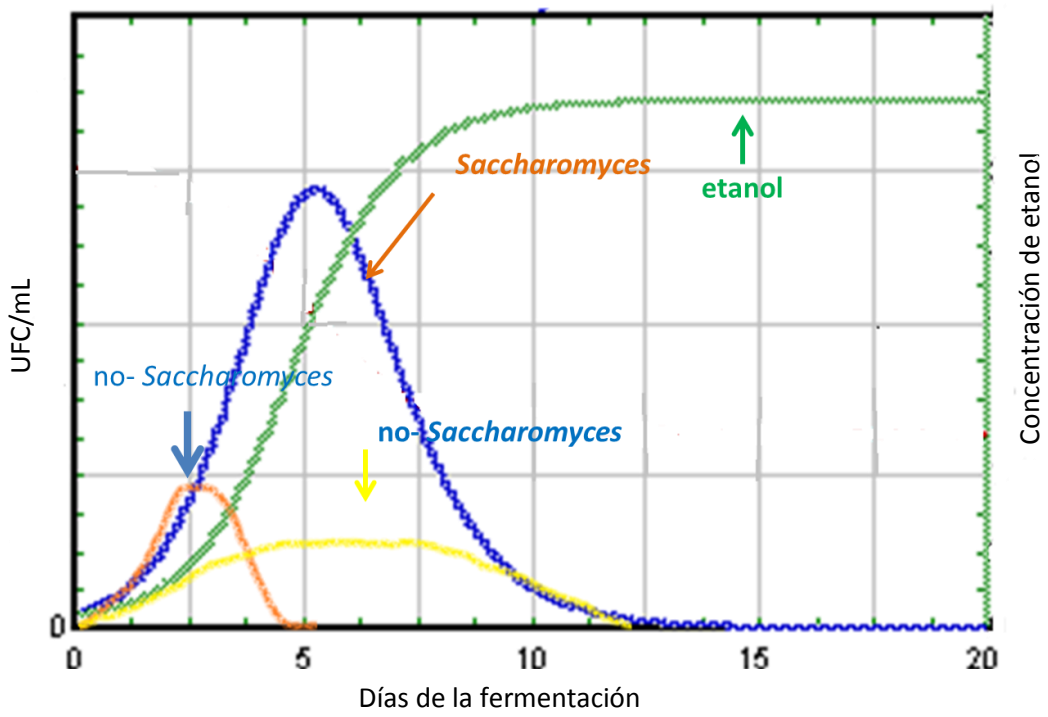


Figura 2.7 Dinámica de levaduras durante la fermentación

2.4.2. Levaduras *Saccharomyces*

Estas levaduras son las principales responsables de la fermentación alcohólica de los mostos, incluyendo especies como *Saccharomyces cerevisiae* con elevado poder fermentativo, vigorosas y resistentes al etanol y dióxido de azufre (Navarre, 1998). Pero a pesar de su competitividad fermentativa no presentan gran difusión ambiental, y en el mosto y principalmente en la uva es generalmente minoritaria respecto a otras especies. Las células tienen formas variadas: ovaladas, redondas y alargadas, con tamaños también diferentes de 3 a 10 µm x 5 a 12 µm. Se multiplican por gemación múltiple, y forman esporas redondeadas u ovaladas, conteniendo un asca generalmente de una a cuatro esporas.

Estas levaduras son capaces de fermentar casi todos los azúcares, excepto los de cinco átomos de carbono, produciendo la enzima invertasa, capaz de desdoblar la sacarosa en glucosa y fructosa aproximadamente en partes iguales, y no asimilan los nitratos.

Dentro de este género podemos encontrar a: *Saccharomyces bailii, Saccharomyces bayanus, Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces oviformis* (Hidalgo, 2003).

2.4.3. Levaduras no-*Saccharomyces (nS)*

Las especies nS que han sido investigadas en la elaboración de vino, incluyen a los géneros de las levaduras apiculadas ya mencionadas anteriormente (Jolly *et al*., 2006), las cuales predominan en las primeras etapas de la fermentación alcohólica. Los productos metabólicos resultado del crecimiento de n*S* incluye glicerol, acetaldehído, ácido acético, ácido succínico, alcoholes superiores y esteres de ácidos grasos (Jolly *et al*., 2006).

Las nS contribuyen a la calidad del vino de diversas formas, como en la producción de glicerol por *Candida stellata* o de ésteres por *C. pulcherrima* mientras que, otras especies como *Kloeckera apiculata*, están asociadas con la producción de ácido acético que puede resultar perjudicial. La mayoría de estas especies presentan un bajo poder alcohógeno, por lo que su población decae conforme avanza la fermentación (Jolly *et al*., 2006).

El glicerol mencionado anteriormente es un triol (Figura 2.8) incoloro, inodoro y con elevada viscosidad, comercialmente conocido como glicerina. Es el componente más abundante en el vino después del etanol y se forma durante la fermentación alcohólica como consecuencia de la oxidación de los azúcares llevada a cabo por las levaduras (Scanes *et al.,* 1998).

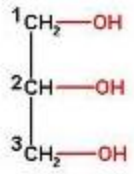


Figura 2.8 Estructura química de glicerol

Análisis sensoriales han mostrado que el glicerol proporciona dulzor por encima de unos 5,2 g/L en vino blanco seco. Las concentraciones de glicerol en vinos secos y semi-dulces varían entre 5 y 14 g/L, aunque pueden encontrarse concentraciones superiores (hasta 21 g/L) en vinos blancos elaborados con mosto cuyas uvas han sido infectadas por el hongo *Botrytis cinerea* (Martorell *et al*., 2012).

Aunque el glicerol no tiene un impacto directo en las características aromáticas del vino, sí que contribuye al sabor y cuerpo final del vino, proporcionando dulzor, de ahí que en algunos países europeos se utilice como indicador de calidad en el vino. Por estas razones, el glicerol es añadido en ocasiones de forma fraudulenta en el vino disminuyendo así su calidad.

Teniendo en cuenta que la adición de glicerol al vino es una práctica no permitida por las regulaciones de la Comisión Europea, resulta de gran interés utilizar una cepa de levadura que, tras su adición al mosto de uva, produzca un incremento de la concentración de glicerol durante la fermentación alcohólica (Martorell *et al*., 2012).

2.4.4. Diferentes fuentes de levaduras para la fermentación

2.4.4.1. No inoculadas

Tradicionalmente, el vino se produce por la fermentación natural causada por el desarrollo de levaduras procedentes de la uva y de la bodega. La fermentación del mosto de uva, realizada de manera artesanal (sin inoculación de cultivos iniciadores), es el resultado de la acción combinada de varias especies o cepas de levaduras más o menos características, que crecen en sucesión durante la fermentación vínica. La aparición de la microbiota levaduriforme en las uvas va ligada a las condiciones climatológicas de la zona, a los tratamientos del mosto, a la temperatura de fermentación y a la variedad de uva y al terreno donde se haya cultivado (González *et al.*, 2007).

2.4.4.2. Inoculadas

a) Levaduras secas activas comerciales

Son levaduras seleccionadas que se comercializan en forma liofilizada (LSA o levaduras secas activas). Es necesario añadir un número de células activas aproximadamente de cien veces mayor que las presentes naturalmente en el mosto (2 a 3 x 10^6 células/mL). Debe añadirse de manera oportuna para evitar la multiplicación de la flora ya preexistente en el mosto (De la Rosa, 1997).

La inoculación con LSA favorece un inicio más rápido de fermentación (normalmente se reduce la fase de latencia) y un consumo total de los azúcares fermentables, reduciendo los posibles problemas de fermentación. Además permite un mayor control microbiológico, lo que no es posible en fermentaciones espontáneas. Asimismo, se ha demostrado que se obtiene un producto de una calidad más uniforme a lo largo de las diferentes campañas (Torija, 2002).

La mayoría de las cepas de levaduras comerciales disponibles en el mercado, generalmente necesitan de la adición de sales de amonio, debido a que ellas no han sido adaptadas a las condiciones naturales de muchas uvas provenientes de viñedos de alta calidad que poseen entre 100 y 250 mg N/L de nitrógeno asimilable. El exceso de nitrógeno debe evitarse, ya que promueve la formación de compuestos de riesgo para la salud como el etil-carbamato, y el incremento de aminoácidos residuales tales como histidina, precursor de histamina. Por otro lado un exceso de nitrógeno residual facilita la contaminación de los vinos durante la maduración, con cepas de levaduras del tipo *Brettanomyces*, conlleva a fermentaciones alcohólicas más rápidas y demandan más energía para el enfriamiento de los mostos-vinos con la consiguiente pérdida de aromas durante este proceso, el incremento en la adición de amonio, cambia el perfil típico de los aminoácidos presentes en variedades tales como Sauvignon blanc y algunas tintas, cambiando y/o alterando la tipicidad varietal (Medina *et al.*, 2007).

b) *Levaduras nativas seleccionadas*

El uso de cultivos puros de levaduras que procedan de la zona vitivinícola donde se van a utilizar, lo que se conoce como levaduras locales seleccionadas, es más efectivo que las levaduras comerciales para realizar fermentaciones ya que se cree que las levaduras que se encuentran en una microzona son específicas del área, están totalmente adaptadas a las condiciones climáticas de la zona, a la materia prima, es decir al mosto a fermentar y son responsables parcialmente de las características únicas de los vinos obtenidos. Por lo que las características propias de una zona como mostos con alto o bajo contenido en azúcares, grado alcohólico, tipo de vinos elaborados, temperatura de fermentación, etc. pueden ser entre otros, aspectos interesantes para la selección de levaduras. La importancia de estos parámetros puede ser relativa dependiendo del producto para el cual quieren ser utilizados (Mas *et al.*, 2002).

2.5. Criterios de selección de levaduras

La selección de la cepa adecuada para cada tipo de fermentación es una estrategia muy importante para garantizar por un lado una fermentación correcta, así como para mejorar las características del vino final, ya que aunque es evidente que la calidad del vino va estar claramente unida a la de la variedad y calidad de la uva, las levaduras pueden producir compuestos que den un toque de distinción al producto obtenido (Mas *et al.*, 2002).

Las características generales que una cepa de levadura debe presentar para ser seleccionada para vinificaciones son las siguientes (Mas *et al.*, 2002; Suarez e Iñigo, 2004):

a) Elevado poder fermentativo

Se refiere a la producción y tolerancia al etanol y está dado por la cantidad de azúcar que es transformada en alcohol, independiente del tiempo empleado en ello. (Hidalgo 2010; García-Junco, 2001).

Las levaduras apiculadas pueden producir hasta 5° de etanol y conforme aumenta la concentración mueren, *Torulopsis bacillaris* tolera alrededor de 10 ° de etanol, mientras que *Saccharomyces* tolera hasta 17° de etanol (Navarre, 1998).

En el caso de las levaduras nS es importante no compita con nutrientes en específico azúcares para la producción de etanol con la levadura *Saccharomyces*. Es por eso que se busca que la levadura nS sea fructofílica y no tolere etanol (mayor a 5 %), con excepción si degrada ácido málico con el propósito de disminución de acidez del vino.

b) Baja Acidez volátil

La acidez volátil del vino lo dan el conjunto de ácido acético, propionico, butírico y sulfúrico. Si la acidez volátil presente en el vino es muy elevada el vino se picará (avinagrará) con el paso del tiempo. Es conveniente que la acidez volátil de un vino sea lo más baja posible. Se considera que un vino se ha estropeado cuando tiene 1.4 g de ácido acético por litro (García, 2011). Se prefiere aquellas nS que resulten bajas productoras de acidez volátil es decir menor a 0.5 g/L de ácido acético y que al final de la fermentación no rebase del l.2g/L ácido acético (OIV, 2011; OIV-OENO 370, 2012)

.

c) Rápido arranque de fermentación

La energía fermentativa o la capacidad de una cepa de levadura para iniciar una rápida y pronta fermentación del mosto, es la cantidad de azúcar transformada por unidad de tiempo, que equivale a la velocidad de consumo de azúcar (Hidalgo 2010; García-Junco, 2001).

Es importante conocer la cinética fermentativa de la levadura en cuestión, ya que se conoce que tan rápido inicia la fermentación (fase de latencia a una temperatura dada) y cuando

acaba, la duración de la fermentación, la regularidad fermentativa, resistencia a estrés fermentativo (Suarez e Íñigo, 2004):

Las levaduras de la uva, de la bodega y/o las añadidas, se multiplican aeróbicamente, sin signos exteriores hasta tener una población alrededor de 1 millón de levaduras/mL.

El estrés fermentativo es cuando se presentan condiciones de bajo potencial de oxidoreducción en la fermentación, lo que impide a las levaduras la producción de ácidos grasos insaturados para formación de membranas celulares, aumentando así la proporción de ácidos grasos saturados lo que supone un incremento de la rigidez de las membranas, que acaba perjudicado al metabolismo celular.

Es indispensable que la levadura nS se adapte inmediatamente al medio y sea capaz de producir metabolitos que favorecerán a la calidad del vino como puede ser la producción de etanol, glicerol, enzimas entre otros, antes de ser inactivadas por la falta de oxígeno y presencia de etanol en concentraciones toxicas para estas.

d) Resistencia al SO_2

El anhídrido sulfuroso ejerce sobre los microorganismos en general una acción de simple ralentización del crecimiento, antiséptica, o letal, esterilizante, según las cantidades empleadas. No todas las especies de levaduras ofrecen la misma sensibilidad o tolerancia al sulfuroso. Las levaduras nS son muy sensibles, otras como *Saccharomycodes ludwigii* y *Zigosaccharomyces bailii* pueden tolerar más de 500 ppm. Una tolerancia de este tipo está determinada genéticamente, y se trasmite de generación en generación, incluso en ausencia de sulfuroso (Suárez e Íñigo, 2004).

La levadura nS debe ser resistente a anhídrido sulfuroso para poder tener un inicio rápido en la fermentación. Las cepas que garantizan una ferentación completa cuando resisten a concentraciones de dióxido de azufre superiores a 30 mg/L (OIV-OENO 370-2012)

e) Ausencia de defectos olfativos

La nS no debe aportar metabolitos que comprometan la calidad olfativa como es el caso de la producción de olor a huevo podrido generado por el sulfuro de hidrógeno (S_2H) por la reducción de compuestos azufrados. La producción de S_2H se debe al metabolismo de la levadura y está estrechamente relacionada con la disponibilidad insuficiente de nitrógeno asimilable. Para

evitar la generación de S_2H, los enólogos tienen dos opciones, aumentar los niveles de nitrógeno en el mosto añadiendo nutrientes (fosfato diamónico (DAP) y combinados) durante la fermentación y/o la aplicación de cobre (en forma de sulfato o derivados) en vino terminado para eliminar el S_2H.

Ambas opciones tienen problemas inherentes: a pesar de la adición de nutrientes, en algunas condiciones las levaduras todavía se encuentran deficitaria y producen SH_2. El empleo de cobre en cualquiera de sus formas es una medida controvertida, no solo desde el punto de vista legal, si no también afecta sensorialmente al vino, eliminando moléculas aromáticas de interés como los derivados azufrados de carácter tiólico (Hidalgo, 2011).

f) Factor *killer*

Las levaduras pueden clasificarse en tres fenotipos distintos: *killer*, sensible y neutras. Las levaduras de fenotipo *killer* sintetizan toxinas (factor *killer*) que son letales para las células sensibles que no sintetizan la toxina ni son resistentes a la misma. Las levaduras con fenotipo neutro no la sintetizan, pero son resistentes a su acción (Gutiérrez *et al.*, 1995). La levadura nS puede tener el fenotipo *killer* que afectara a flora asociada excepto a *Saccharomyces* empleada en dicha fermentación o que fuese neutra a la toxina que produjera *Saccharomyces* .

g) Producción de glicerol

El glicerol cuantitativamente es el segundo componente mayoritario del vino después del etanol y agua. Se encuentra en cantidades de 6 a 10 g/L. Se genera a partir de la fosfodihidroxiacetona por reducción y de fosforilación de la misma (Olivero 2006), el glicerol es más abundante en el vino blanco que en tinto y, también presente en las uvas afectadas por *Botrytis*. Su papel edulcorante es muy discreto y moderado, pero influye en la sensación final de persistencia y, su presencia contribuye a transmitir a los vinos, cuerpo, consistencia y redondez. Se forma al principio de la fermentación (García, 2011), y es por lo que se seleccionaría aquella nS que produjera glicerol (OIV-OENO 370, 2012).

h) Actividad β-glucosidasa

Enzima pertenece a la familia de las β-glucanasas, y son responsables del catabolismo de una amplia gama de hidratos de carbono. Esta enzima es conocida también como glucohidrolasa β-D glucosido.

El aroma y el color son dos cualidades importantes del vino. La incidencia de los monoterpenos libres en su aroma varietal está actualmente bien establecida, no obstante en el jugo de uva una gran proporción de estos terpenos se encuentran bajo la forma de conjugados no volátiles e inodoros, β-D-glucopiranósidos y diglicósidos, desde donde pueden ser liberados por glicosidasas. Actualmente la presencia de este tipo de actividades es utilizada como criterio de selección de cepas de levaduras para cultivos iniciadores vínicos (Arévalo, 2006).

En la actualidad en la elaboración del vino se usan preparados enzimáticos no definidos (mezcla de glucanasas: actividades exo β-glucanásica, endo- β -1,3-glucanásica, exo- β -1,6-glucanásica y actividad β -glucosidásica) comerciales de origen fúngico procedentes de *Aspergillus spp*. , los cuales se adicionan para incrementar la liberación de aromas. Su uso puede resultar en un inconveniente, ya que son inespecíficos, por lo que pueden desencadenar otras reacciones de hidrólisis colaterales. En un estudio se demostró que la actividad β-glucanásica, sólo era responsable únicamente de 3 % de la liberación de los precursores del aroma, por otro lado, una enzima β-glucosidasa específica hidrolizó la totalidad (Riou *et al.*, 1998).

Una alternativa al empleo de los preparados enzimáticos de origen fúngico, sería el uso de enzimas específicas de levaduras de ecosistemas vínicos que se encuentran adaptadas a su medio ecológico. Dichas enzimas liberarían los terpenos conjugados sin afectar al resto de los componentes y se conseguiría aumentar la tipicidad de los vinos, tendencia actual cada vez más valorada por los consumidores (Arévalo, 2006).

Por lo anterior se seleccionará una nS con actividadad β-glucosidasa si se requiere una riqueza aromática como es el caso de los vinos blancos, y en cuanto a vinos tintos se prefiere que tengan actividad nula o liberación mínima ya que algunas cepas con actividad β-glucosidasa extracelular pueden hidrolizar los antocianos en aglicones que son más inestables. Esto puede influir en la estabilidad cromática (OIV-OENO 370, 2012).

2.6. Identificación de levaduras

La identificación de las levaduras se puede llevar a cabo atendiendo a tres criterios que son morfológicos, bioquímicos y genéticos (Linares y Solís, 2007). Al identificar cepas de levadura se cubre la necesidad de diferenciar grupos y especies que taxonómicamente están muy cerca, pero que tienen propiedades muy diferentes en lo que respecta a sus aptitudes fermentativas y organolépticas.

2.6.2. Criterios morfológicos

Los criterios macroscópicos tienen en cuenta el aspecto de las colonias de levaduras al crecer en los diferentes medios de cultivo. La mayoría de los organismos levaduriformes crecen fácilmente en un gran número de medios de cultivo, sin embargo existen algunos que son específicos para un tipo de levaduras como lo es el agar lisina donde solo pueden crecer las nS ya que las S no pueden metabolizar la lisina como fuente de nitrógeno. Los criterios de características microscópicas son los más utilizados, un ejemplo es la prueba del tubo germinal, el tubo germinal es una extensión filamentosa de la levadura, sin estrechamiento en su origen, cuyo ancho suele ser la mitad de la célula progenitora y su longitud tres o cuatro veces mayor que la célula madre (Linares y Solís, 2007).

2.6.3. Métodos bioquímicos

Estos métodos se basan en la detección de determinadas actividades enzimáticas de las levaduras mediante la hidrólisis específica de un sustrato cromogénico en presencia de un indicador de la enzima. Una de las principales ventajas de estos ensayos es permitir diferenciar fácilmente los cultivos mixtos. Estos medios pueden ser utilizados como medios de aislamientos primarios o con fines de identificación, después del aislamiento de los organismos levaduriformes en los medios convencionales (Linares y Solís , 2007).

2.6.4. Métodos moleculares

Los métodos moleculares de identificación de levaduras y microorganismos en general, se basan en el estudio de las moléculas de ADN y ARN. En levaduras se iniciaron con el estudio

de complementariedad del ADN nuclear, determinándose la existencia de relaciones coespecíficas entre cepas cuyos caracteres fisiológicos y morfológicos considerados determinantes para discernir que entre especies, por ejemplo el género *Torulopsis,* que carece de pseudohifas, es coespecífico con *Candida* que sí las forma; *Hansenula*, que asimila el nitrato, es coespecífico de *Pichia*, que no lo asimila.

Una técnica muy utilizada para identificación de levaduras ha sido el análisis del dominio D1/D2 del ARNr 26S, una región altamente variable, entre especies de hasta una única base. Esta región ha permitido separar todas las especies de ascomicetes de fase levaduriforme existentes, incluso las altamente relacionadas. En la misma línea, está el diseño de métodos específicos para la identificación de especies de un mismo género, como el Método de los Cuatro Cebadores de Kurtzman y Mannarelli (1998), el cual se basa en el uso de dos cebadores universales empleados como control positivo y dos internos específicos de especie derivados de la región D1/D2.

Una vez obtenido el fragmento mediante PCR, se realiza la secuenciación. La posterior comparación de la secuencia obtenida con los que están disponibles en bases de datos permite la identificación (Orberá, 2004).

OBJETIVOS

Objetivo general

Aislar, seleccionar con base en sus cualidades enológicas, e identificar cepas de levaduras *no Saccharomyces* nativas de la región vitivinícola de Querétaro.

Objetivos particulares

- Aislar levaduras enológicas "no-*Saccharomyces*" de diversos viñedos comerciales establecidos en la región vitivinícola de Querétaro
- Evaluar la producción de glicerol, la actividad β-glucosidasa y determinar la tolerancia a etanol y anhídrido sulfuroso de las levaduras no-*Saccharomyces* aisladas.
- Determinar las principales características físicas y químicas de vinos obtenidos en presencia de diversas levaduras *no-Saccharomyces* seleccionadas en fermentación mixta con una *Saccharomyces.*
- Identificar las levaduras seleccionadas con potencial enológico.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización del sitio experimental

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Fermentaciones y Fisiología de Frutas de la UAQ, así como en tres viñedos comerciales establecidos en el estado de Querétaro. La primer viña es "El Rosario" ubicada en el municipio de El Marqués a 3 km de la Comunidad de "La Griega", y a aproximadamente a 30 km de la ciudad de Querétaro (la temperatura media anual de 16.7 ºC en el 2012 Altitud 1850 msnm); la segunda viña es "El Barreno" en el municipio de San Juan del Rio a 51 km de la capital del estado (Altitud de 1920 msnm, y cuenta con una temperatura anual en el 2012 de 16.7 °C), la tercera corresponde a "Viñedos Azteca", ubicada en la carretera San Juan del Río–Cadereyta, en Ezequiel Montes, a 59 km de la ciudad de Querétaro(altitud de 1950 msnm en el 2012 su temperatura media anual fue de 16.1 ºC) (De la Cruz *et al.*, 2012). La localización de los tres sitios de muestreo se ilustra en la Figura 3.1.

Figura 3.1 Mapa de localización de los sitios de muestreo (viñedos El Rosario, El Barreno y Viñedos Azteca) en el estado de Querétaro, México (De la Cruz *et al.*, 2012).

3.2 Material biológico

3.2.1. Frutos

Se utilizaron cantidades variables de frutos de *Vitis vinifera* de los cultivares 'Merlot', 'Cabernet Sauvignon', 'Sirah' y 'Cabernet Franc'para realizar el seguimiento de la maduración del fruto y para realizar las microvinificaciones se utilizó 'Merlot', 'Cabernet Sauvignon'. Las principales características de los cultivares utilizados en el presente trabajo se resumen en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1 Características de las variedades de vid utilizadas en este estudio

Característica	'Cabernet Sauvignon'	'Cabernet Franc'	'Merlot'	Sirah
Racimo				
Tamaño	Pequeño	Medio		
Compacidad	Medio-compacto	Medio		
Longitud pedúnculo	Corto			Medio
Baya				
Tamaño	Pequeña	Pequeña	Pequeña	Pequeña-Media
Color Epidermis	Negra-azul	Negra-azul	Azul-negra	Azúl-negra
Forma	Circular	Circular	Elíptica-ancha	Circular
Separación pedicelo	Difícil			
Grosor piel	Gruesa	Media-gruesa	Gruesa	Media gruesa
Pigmentación pulpa	Ausente o muy débil			
Consistencia pulpa	Ligeramente dura			
Suculencia pulpa	Muy jugosa		Ligeramente jugosa	
Sarmiento				
Color	Marrón amarillento		Marrón oscuro	Marrón-amarillento
Relieve superficie	Estriada	Lisa	Lisa	Estriada

(Fuente: MAGRAMA, 2013)

3.2.2. Levaduras

Como cepa de referencia se utilizó *Saccharomyces cerevisiae* (V-1116) K1, cepa comercial de la distribuidora de productos biológicos "Lallemand. Ontario, Canadá."

Especificaciones: Presenta efecto killer. Se adapta a diferentes condiciones de fermentación, produce una fermentación rápida en el mosto, tolerante a altas temperaturas, elevado poder alcohógeno que asegura fermentaciones completas de hasta 14 % de etanol con un rendimientos de 16.7-17 g de azúcar por 1 % de alcohol, produce una acidez volátil de 0.16 g/L de ácido acético, 0.26-0.19 g/L de ácido sulfúrico.

Además se utilizaron también todas las levaduras no-*Saccharomyces* aisladas de los viñedos anteriormente mencionados.

3.3. Seguimiento de la maduración

Se recolectaron racimos al azar de cada una de las variedades anteriormente mencionadas. Se despalilló y se estrujo para obtener el jugo de la uva y se evaluó acidez total y sólidos solubles totales para obtener la relación de azúcar/acidez (g de dextrosa/ g ácido tartárico). Se realizaron cuatro muestreos, iniciando en el mes de julio y finalizando en el mes de agosto con la vendimia efectuada en 2012.

3.4. Aislamiento de las cepas de levadura

Las levaduras utilizadas en el presente estudio se obtuvieron a partir de mostos de uva adquirida en los viñedos arriba descritos, esto se realizó antes y durante la vendimia, a los cuales se determinó: acidez total titulable y azúcares totales, y se indujeron fermentaciones espontáneas sin sulfitado a 25 ºC (Navarre, 1998).

La recuperación de las levaduras se llevó a cabo utilizando la técnica de vertido en placa. Se tomaron alícuotas del mosto en fermentación cada 48 horas, se realizaron diluciones decimales de las cuales se tomaron 1 mL de muestra que se sembraron en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (APD), adicionado con rosa de bengala (60 µg/mL) y ampicilina (100 µg/mL); al solidificar el medio se incubaron a 25°C entre tres y cinco días (Sandoval *et al*., 2011).

Las levaduras que desarrollaron en las cajas se separaron con base en su morfología colonial y se purificaron mediante transferencias a placas de "Agar nutritivo-dextrosa para levaduras" (NYDA: 8 g de caldo nutritivo, 5 g de extracto de levadura, 10 g de dextrosa, 20 g de agar y 1000 mL de agua) adicionado de solución de ampicilina (100 µg/ mL de medio) (Sandoval *et al*., 2011).

3.5. Diferenciación de levaduras

Las levaduras purificadas fueron colocadas en medio medio lisina (Oxoid, Hampshire, UK) con el fin de diferenciar a las cepas de los géneros no-*Saccharomyces* de las del género *Saccharomyces*, pues se consideran no-*Saccharomyces* a aquellas cepas que crezcan en este medio después de dos resiembras consecutivas. Las levaduras se incubaron a 25 °C durante cuatro días (Martín, 2011).

3.6. Selección de las levaduras nS con cualidades enológicas

3.6.1. Detección de actividad β glucosidasa

Se inoculó una gota de levadura (10 µL) proveniente de medio de cultivo líquido NYDB (8 g de caldo nutritivo, 5 g de extracto de levadura, 10 g de dextrosa y 1000 mL de agua) y se incubó a 25 °C en medio Agar Esculina-Glicerol (EGA: 1 g/L de esculina, 0.3 g/L de cloruro férrico, 1 g/L hidrolisado de caseína, 25 g/L de extracto de levadura, 8 mL/L de glicerol, 20 g/L de agar) ajustado a un pH de 6.0, se esterilizó a 121 °C por 15 min y se vertió en placas petri. Las cepas con actividad β-glucosidasa hidrolizan el sustrato para formar un color marrón alrededor de la colonia (Pérez *et al*., 2011).

3.6.2. Tolerancias

a) Tolerancia al etanol

Se llevó a cabo utilizando analizador turbidimétrico automatizado Bioscreen® C por medio de la medición de la densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 600 nm. Medio líquido YPD (levadura-peptona-dextrosa ajustado a pH 3.5, 20 °B, 6 % de etanol), se distribuyó en placas de 100 fosas. Asimismo, se prepararon fosas con el mismo medio pero sin etanol (testigos). Las fosas se inocularon (5 log10 UFC/ fosa) con cada cepa de levadura. por fosa cada una de las levaduras que presentaron actividad β- glucosidasa

b) Tolerancia al anhídrido sulfuroso (SO_2)

Se realizó por medio de un analizador turbidimétrico automatizado Bioscreen ® C, donde las fosas de una placa se llenaron con medio YPD líquido ajustado (pH 3.5, 20 °B, 30 mg de SO_2 total/L), mediante adición de alícuotas de una solución estéril de metabisulfito potásico.

Asimismo, se prepararon fosas con el mismo medio a los que no se les adicionaron SO_2, y que actuaron como testigos (0 mg SO_2/L). Las distintos fosas conteniendo las diversas concentraciones de SO_2 total/L fueron inoculados con 5 $\log_{10}$ UFC por fosa cada una, con cada de las levaduras que presentaron actividad β- glucosidasa. La placa se incubó a 25 ºC durante 72 h; el grado de resistencia al SO_2 se determinó frente a las fosas testigo por la medición de la densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 600 nm.

3.6.3. Activación y multiplicación de levaduras

Las cepas de levaduras evaluadas se cultivaron en medio NYDB en tubos de ensayo durante 72 h a 24 °C y 200 rpm de agitación, después se realizaron recuentos en la cámara de Neubauer y se ajustó la concentración a requerida para cada experimento, comprobando la viabilidad mediante vertido en placa en medio NYDA (Sandoval *et al*., 2011).

3.6.4. Ensayos de microvinificación

Se realizó en matraces con capacidad de 1 L estériles conteniendo 700 mL de mosto de uva previamente tratado por termovinificación (Apéndice A2), se ajustó a pH 3.5 y 21 ^{0}B. Se evaluaron 8 levaduras, en dos variedades de frutos de *Vitis vinifera* cvs. 'Merlot' y 'Cabernet Sauvignon'. Se inoculó 3 x10^6 UFC/mL de cada una de las cepas de levadura autóctona seleccionada no-*Saccharomyces* y una hora después se inoculó 1x10^6 UFC/mL de la levadura *Saccharomyces* K1; se incluyó un matraz inoculado con 1x10^6 UFC/mL de la levadura *Saccharomyces* K1. Los matraces se incubaron a 25 ºC hasta que finalizó la fermentación. Al vino obtenido se le evaluaron polifenoles totales (Cuadro A5).

3.6.5. Comportamiento fermentativo

La energía fermentativa se evaluó mediante pesadas diarias de los matraces inoculados hasta obtener un valor constante; se determinaron los gramos de CO_2 desprendidos/día (pérdida de peso) y se efectuaron las correcciones necesarias con un frasco testigo. El poder fermentativo, que corresponde a los g/L azúcar necesarios para producir 1° alcohólico, fue determinado mediante la medición del porcentaje de volumen de etanol y el contenido de azúcar inicial en el mosto (Hidalgo y Fernández, 2005).

3.6.6. Cinética de las levaduras

Se realizó durante (desde la inoculación inicial correspondiente a nS hasta finalizada la fermentación) las fermentaciones inoculando nS + S y la de S (sola) mediante la técnica de extensión en superficie en placa. Se tomó una muestra de 100 µL de cada tratamiento, se prepararon diluciones decimales según la fase de la fermentación y se sembraron placas de medio NYDA y en medio Lisina, las cajas fueron incubadas a 35 ºC por 48 h.

3.6.7. Determinación de las características químicas de los vinos obtenidos

a) pH (OIV-MA-AS313-15, 2011).

Se evaluó potenciométricamente, el equipo utilizado fue calibrado previamente a su uso, la medición de la muestra se realizó a una temperatura 20ºC

b) Sólidos solubles totales (OIV-MA-AS2-02,2012)

Fueron evaluados por refractometría; la medición se realizó a una temperatura de 20° C de la muestra con previa calibración del refractómetro, la lectura se expresó en grados Brix.

c) Grado alcohólico (OIV-MA-AS312-01, 2009)

Se tomaron 130 ml de vino, se eliminó el CO_2 de la muestra y se neutralizó con hidróxido de calcio, enseguida se vertieron 100 ml (20 ºC) de la muestra en un matraz volumétrico aforado, y se vaciaron (enjuagando dos veces con agua destilada) en un matraz de destilación de 100 ml aforado. Se destilaron ¾ de la muestra aproximadamente, el producto recolectado se vació a un matraz volumétrico aforado de 100 mL que se aforó con agua destilada, determinándose la densidad de éste líquido a 20ºC por medio de picnometría haciendo una relación con tablas de la CEE para obtener el grado alcohólico (CEE, 1990).

d) Acidez total titulable

Se llevó a cabo por titulación con una solución de NaOH 0.1M (valorada con una solución de ácido clorhídrico 0.1M). Se tomaron alícuotas de 5 mL de mosto, éstas se diluyeron con agua destilada a un volumen de 50 ml y se titularon con la solución de NaOH 0.1M (valorada con una solución de ácido clorhídrico 0.1M) hasta alcanzar un pH de 8.2 utilizando un potenciometro. La acidez se expresó en g/L de ácido tartárico (Flores, 2000).

e) Acidez volátil

Se realizaron por el método García-Tena (1976) el cual se basa en una destilación fraccionada del vino, una vez eliminado el dióxido de carbono y una posterior valoración ácido-base del destilado. En un matraz de destilación se colocaron 11 mL de vino desprovisto de dióxido de carbono y se conectó al aparato de destilación. A la salida del refrigerante se colocó la probeta de 5.1 mL y se procede a la destilación. Cuando el destilado alcanza el trazo superior de la probeta se sustituye por la de 3.2 mL, dándose por terminada la destilación cuando se alcanza este volumen. El destilado fue recogido en la probeta de 3.2 mL se vertió en un matraz Erlenmeyer y se valoró con solución de hidróxido de sodio (0.02M), en presencia de unas gotas de fenolftaleína, hasta obtener un color ligeramente rosado. Siendo v el volumen de hidróxido de sodio consumido. La acidez volátil se expresó en g/L de ácido acético y con dos decimales (Gacía, 1976).

$$\text{Acidez volátil g/L} = 0{,}366 \times v$$

v = mL de hidróxido de sodio 0,02M consumidos en la valoración

f) SO_2 o Dióxido de azufre (OIV-MA-AS323-04B, 2009)

Anhídrido sulfuroso libre (OIV-MA-AS323-04B, 2009)

La cantidad de anhídrido sulfuros libre, total y combinado en las muestras de vino se determinó por el método de Rippert. Se colocaron 50 mL de vino en un matraz Erlenmeyer, al cual se agregaron 5 ml de H_2SO_4 y 3 ml de una solución de almidón al 2.0%; la mezcla se virtió enseguida por medio de una bureta graduada a una solución de yodo 0.02 N, hasta obtener el vire a color violeta. La concentración de SO_2 libre en el vino en mg/L f se inoculó de la siguiente forma:

$$\text{g/L de } SO_2 \text{ LIBRE} = Vl_2 \times 12.8$$

Vl_2 = Volumen de yodo (mL)

Anhídrido sulfuroso total (OIV-MA-AS323-04B, 2009)

Se colocaron en un matraz Erlenmeyer 25 mL de una solución KOH y 50mL de vino dejándose reposar durante 15 minutos; enseguida se agregaron 10 mL de H_2SO_4 y 3 mL de una solución de almidón al 2.0 %, después de lo cual se tituló con yodo 0.02 N de la misma forma que para SO_2 libre. El resultado se expresó de igual forma que para lo anterior.

Anhídrido sulfuroso combinado (OIV-MA-AS323-04B, 2009)

Se calcula mediante de la diferencia del anhídrido sulfuroso total menos el anhídrido sulfuroso libre.

g) Azúcares residuales

Se defecaron las muestras por acetato neutro de plomo según el tipo de vino como se indica en el método OIV-MA-AS311 (2009), en caso de ser necesario se utilizó carbón activado si el color del vino es intenso e impide realizar el presente análisis.

La muestra tratada se vertió en una bureta. En paralelo, 10 ml de licor de Fehling fueron adicionados de 30 ml de agua destilada y calentados con agitación hasta ebullición, momento en que se inició la titulación, al tornarse la solución verdosa se adicionaron tres gotas de azul de metileno, se continuó la titulación hasta el vire a color amarillo. Los resultados se expresaron en g/L de azúcares reductores (Flores, 2000).

h) Glicerol (OIV-MA-AS312-05, 2009)

Se realizó utilizando una serie enzimática (ENZYTEC ^{TM}).El cual se fundamenta en que el glicerol es fosforilado por la adenosina-5'-trifosfato (ATP) a L-glicerol-3-fosfato en la reacción catalizada por gliceroquinasa (GK). La adenosina-5'-difosfato (ADP) formado en la reacción anterior se reconvirtió en ATP por fosfoenolpiruvato (PEP) con la ayuda de la piruvato quinasa (PK) con la formación de piruvato. En la presencia de laenzima L-lactato deshidrogenasa enzima (L-LDH), a piruvato se reduce a L-lactato por la reducción de dinucleótido de nicotinamida-adenina (NADH) con la oxidación de NADH a NAD. La cantidad de NADH oxidada en la reacción anterior es estequiométrica con la cantidad de glicerol. NADH se determinó por medio de su absorción de luz a 365 nm. Este se realizó en un equipo Multiskan ascent (Thermo Electron Corporation®).

3.7. Identificación de las especies de levaduras seleccionadas

Las cepas de levadura que manifestaron destacados aportes enológicos en los experimentos se identificaron mediante la amplificación del dominio D1/D2 del gen que codifica para la subunidad 26S del ARNr empleando las condiciones propuestas por Maomura *et al*. (2005).

3.7.1. Extracción de ADNr

Las células de levaduras utilizadas para la extracción de ADN se hicieron crecer durante 24 h a 25 °C en 50 ml de medios líquido NYDB en un agitador rotatorio a 200rpm y fueron recuperadas por centrifugación. La extracción se llevó acabo tomando1 ml de cultivo joven (24-48 h) de la levadura y se realizó de acuerdo a la técnica señalada por Aldrete y colaboradores (2013) (Datos por publicar) modificada (Sin vidrio) donde se rompieron las células aplicó calor a las células, después fenol cloroformo, seguido de una precipitación con etanol y se resuspendieron en solución amortiguadora TE.

3.7.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en Inglés)

Se amplificó el dominio D1/D2 del segmento 26S del ADNr mediante los oligonucleotidos NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAC-3') y NL4 (5'-GGTCCGT GTTTCAAGACGG-3'). La reacción de PCR se realizó de acuerdo a las condiciones siguientes: 95 °C 2 min, 35 ciclos (95 °C 30 s - 56.75 °C 1 min- 72 °C 1 min), 72 °C 10 min (Guamán *et al*., 2009).

3.7.3. Secuenciación e identificación

El resultado fue un fragmento amplificado el cual fue enviado a la "Unidad de Síntesis y Secuenciación" del Instituto de Biotecnología, UNAM para su secuenciación. Las secuencias obtenidas se introdujeron en el banco de datos mediante el programa Blast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) para buscar homología con secuencias de levaduras reportadas (Altschul *et al*., 1990).

3.7.4. Construcción del dendrograma

Las secuencias obtenidas, junto con secuencias de levaduras que presentaron la más alta homología reportadas en el banco de datos, fueron alineadas de manera múltiple utilizando el método ClustalW del programa BioEdit 7.2, y se llevó a cabo la construcción del árbol filogenético, utilizando el método neighbor joining (NJ), un máximo de parsimonia y el modelo de evolución Jukes-Cantor en el programa Mega 4.0 (Criminger *et al*., 2007).

3.8. Diseño de los experimentos y análisis de los datos

Para los ensayos de microvinificación se realizó el siguiente planteamiento estadístico

3.8.1. ***Diseño de tratamientos***: Unifactorial, siendo el factor de estudio las cepas de levaduras

3.8.2. ***Diseño experimental***: Bloques al azar con dos repeticiones, siendo las repeticiones las variedades`Cabernet Sauvignon´ y otro`Merlot´.

3.8.3. ***Tratamientos***: Ocho levaduras inoculadas cada una en conjunto con una *Saccharomyces cerevisiae.*

3.8.4. ***Unidad experimental*:** Un matraz de 1 L con 700 mL de mosto

3.8.5. ***Variables evaluadas***

a) Grado alcohólico

b) pH

c) Sólidos solubles totales

d) Acidez total titulable

e) Acidez volátil

f) Anhídrido sulfuroso libre, combinado y total

g) Glicerol

3.8.6. ***Análisis de los datos.***

Los datos fueron sometidos a análisis de varianza de Fisher utilizando la prueba de medias de Tuckey, mediante el Programa estadístico JMP 9.0

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Seguimiento de la maduración de la uva

Para dar seguimiento a la maduración de las uvas y determinar la fecha óptima de vendimia se tomaron racimos al azar en los tres viñedos considerados (El Rosario, El Barreno, Viñedos Aztecas) en cuatro muestreos sucesivos durante los meses de julio y agosto del 2012, éstos se llevaron al laboratorio de Fisiología de frutas y hortalizas de la UAQ donde se les evaluó la acidez total titulable y los sólidos solubles totales. Como era lógico, la relación azúcares/acidez (g de dextrosa/g de ácido tartárico) incrementó conforme avanzó el tiempo. La evolución de la concentración de azúcar y acidez durante el proceso de maduración de los frutos de vid que se utilizaron en este estudio, difirió en cada variedad y en cada viñedo, tal como se aprecia a continuación (Cuadro A1).

4.1.1. Viñedo El Barreno

'El Barreno' cuenta con suelos predominantemente arcillosos, y los viñedos se encuentran conducidos en cordón unilateral, estando las variedades injertadas sobre SO4 para Merlot y 333 EM para `Cabernet Sauvignon´ (De la Cruz *et al.*, 2012).

La variedad que maduró primeramente, caracterizada por una relación azúcares/acidez de 34.4 para el 17 de agosto, fue 'Cabernet Sauvignon' seguida de 'Merlot' (26.2) y 'Cabernet Franc' (18.0). Los solubles totales respectivos fueron de 20.2, 21.9 y 18.3 en ºBrix (Figura 4.1).

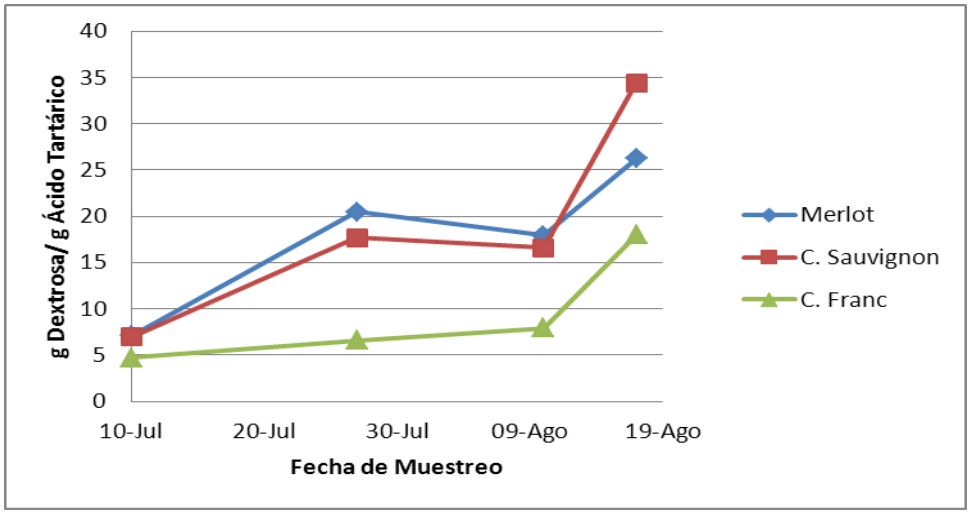


Figura 4.1 Evolución de la maduración entre julio y agosto de 2012, medida en términos de la relación azúcar / acidez de tres variedades de vid establecidas en el `El Barreno´.

4.1.2. Viñedo El Rosario

En el caso de este viñedo, establecido en el municipio de El Marqués, fue ‘Merlot quien maduró primero, seguida de `Cabernet Sauvignon´ y finalmente `Syrah´, con valores respectivos de azúcares/acidez de 27.84, 22.33 y 15.29 para el 17 de agosto del 2012, y de sólidos solubles totales de 19.3, 19.9 y 15.9. Los valores de relación azúcar-acidez resultan inferiores a los obtenidos en El Barreno, 34.4 para ‘Cabernet Sauvignon’, 26.23 para ‘Merlot’ y `Cabernet Franc´(17.97(Figura 4.2) .

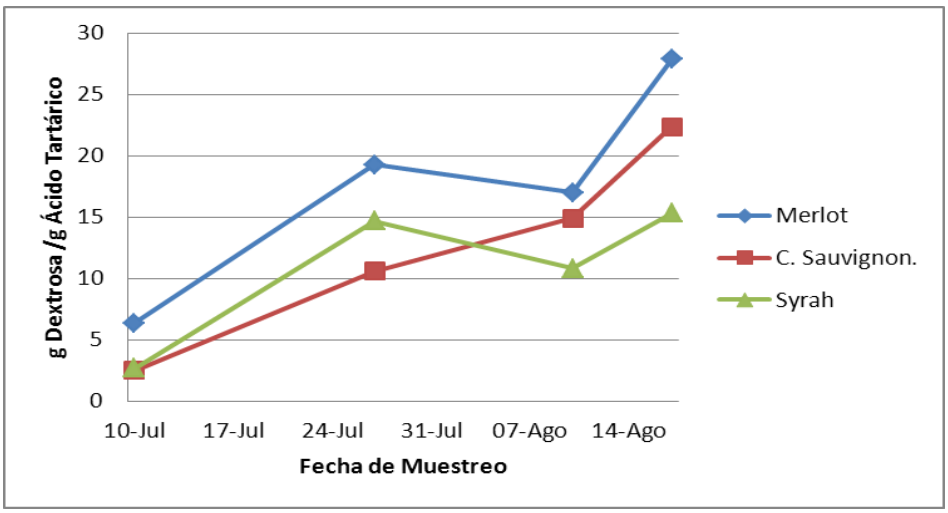


Figura 4.2 Evolución de la maduración entre julio y agosto de 2012, medida en términos de la relación azúcar / acidez de tres variedades de vid establecidas en el `El Rosario´.

El hecho de que `Merlot´ haya madurado primeramente en el Barreno que en el Rosario puede deberse a la diferencia de los portainjertos de la vid en cada viñedo.

4.1.3. Viñedos azteca

En Viñedos Azteca `Merlot´ y `Cabernet Sauvignon´ maduraron primero que `Cabernet Franc´, con relaciones de azúcar-acidez respectivos de 30.37 para `Merlot´, 26 para `Cabernet Sauvignon, y 18 para `Cabernet Franc´ para el 17 de agosto del 2012, y de sólidos solubles totales de 20.22, 21.9 y 19 respectivamente (Figura 4.3).

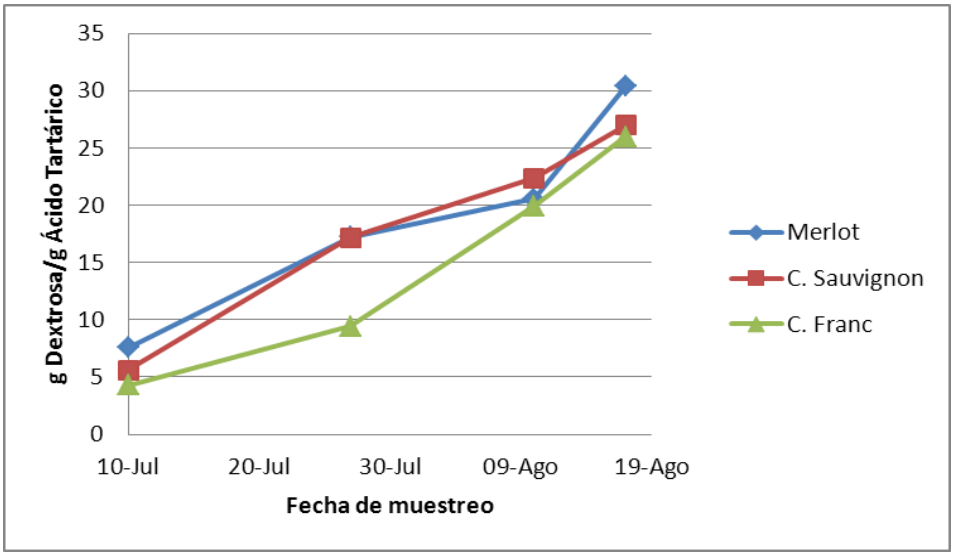


Figura 4.3 Evolución de la maduración entre julio y agosto de 2012, medida en términos de la relación azúcar / acidez de tres variedades de vid establecidas en Viñedos Aztecas.

`Cabernet Franc´ alcanzó la madurez primero en viñedos `Viñedos Azteca´ (relación azúcar acidez 18, 19 ºBrix, 7.71 g/L ácido tartárico) que en `El Barreno´(relación de azúcar acidez de 18, 18 ºBrix, 10.18 g/L ácido tartárico); así mismo, `Cabernet Sauvignon´ de `El Barreno´ tuvo el mayor índice de relación azúcar acidez que en `Viñedos Azteca´ (34.4 relación azúcar acidez, 21.9 º Brix, 6.36 g/L ácido tartárico) *vs.* (26.97 relación azúcar acidez, 20.6 º Brix, 7.63 g/L ácido tartárico) y `El Rosario´ (22.33 relación azúcar acidez, 19.9 º Brix, 8.91 g/L ácido tartárico). Finalmente, `Merlot´ tuvo un mayor índice de relación azúcar acidez en `Viñedos Azteca´ (30.38 relación azúcar acidez, 21.7 º Brix, 7.14 g/L ácido tartárico), que en `El Barreno´ (26.24 relación azúcar acidez ,20.23 º Brix, 7.7 g/L ácido tartárico) y en `El Rosario´ (27.84 relación azúcar acidez ,19.3 º Brix, 6.93g/L ácido tartárico).

García–Junco en el 2001 obtuvo valores de sólidos solubles totales para Cabernet Sauvignon del municipio de Ezequiel montes y obtuvo 21 ºBrix al momento de la cosecha al igual para Malbec (Ezequiel Montes, Querétaro), y para Ruby Cabernet 19 ºBrix proveniente de San Luis de la Páz, Guanajuato.

4.2. Aislamiento y diferenciación de levaduras

Recordemos que la uva obtenida en los viñedos fue llevada al laboratorio, y a partir del mosto de ésta se realizaron fermentaciones espontáneas sin sulfitado, con el fin de inducir el desarrollo en los mostos de las levaduras nativas de los distintos viñedos arriba mencionados.

A partir de dichas fermentaciones se aislaron un total de 197 cepas las cuales fueron desarrolladas en medio lisina, partiendo de la base de que aquellas levaduras que desarrollaran en éste medio después de dos resiembras consecutivas serían consideradas como no-*Saccharomyces*, mientras que aquellas que no desarrollaron se le consideraría del género *Saccharomyces*.

Como resultado obtuvimos 146 cepas que desarrollaron en el medio lisina (74 % del total). Los resultados aquí obtenidos coinciden con Jolly (2003) quien encontró que el grupo no-*Saccharomyces* predomina en el epicarpio de la uva, mientras que *Saccharomyces* prevalece preferentemente en ambiente de bodega (Fernandez, 2003).

A cada una de estas levaduras se asignó una clave de identificación, la cual inicia con `N´ (de no-*Saccharomyces*), por haber crecido en medio lisina, seguida de la inicial del nombre de viñedo de origen, `A´ para `Viñedos Azteca´, `B´ para `El Barreno´ y `R´ para `El Rosario´; el último carácter es un número al azar conforme la levadura en cuestión fue siendo aislada (Tabla 4.1).

La mayoría de las levaduras no *Saccharomyces* de este estudio provienen del viñedo `El Barreno´ (85 correspondiendo a 58 %), seguido de `El Rosario´ (41 correspondiendo a 28 %) y en minoría `Viñedos Aztecas´ (20 correspondiendo a 14%) (Tabla 4.2). La microflora de las uvas (levaduras, hongos, bacterias) es afectada por diversos factores, en los cuales se incluye la altitud, condiciones climáticas (temperatura, lluvia, humedad), variedad de la uva, espesor de la piel de la uva, prácticas de cultivo (fertilización, irrigación, fungicidas), estado de desarrollo y sanitario de las uvas (daño físico, insectos), entre otros (Pretorius, 2000; Jolly, 2003).

Tabla 4.1 Claves de levaduras no-*Saccharomyces* obtenidas de tres viñedos establecidos en el estado de Querétaro en el 2012, por viñedo.

Viñedo	**Número de levaduras**	**Clave***
Barreno	85	NB1-NB3, NB6-NB10, NB13, NB14, NB16-NB18, NB23-NB25, NB27, NB31, NB32, NB37, NB39, NB43, NB45, NB46, NB48, NB50-NB54, NB57- NB69, NB71, NB73, NB79, NB81, NB82, NB85, NB108- NB136, NB141-NB146.
El Rosario	41	NR5, NR11, NR12, NR15, NR19-NR21, NR28-NR30, NR33, NR35, NR55, NR74, NR77, NR84, NR86-NR107, NR137-NR140
Viñedos Aztecas	20	NA4, NA22, NA26,NA34,NA36, NA38, NA40-NA42, NA44, NA47, NA49, NA56, NA70, NA72, NA75, NA76, NA78, NA80, NA83

*Clave: N` de no- *Saccharomyces*; el segundo carácter corresponde a la inicial del viñedo de origen, `A´ para `Viñedos Aztecas´, `B´ para `El Barreno´ y `R´ para `El Rosario´; el último carácter es un número destinado al azar.

4.3. Selección de levaduras

Las levaduras aisladas fueron sometidas a un proceso de selección para posteriormente ser evaluadas en ensayos de microvinificación. Los ensayos de selección realizados fueron: actividad β glucosidasa en medio EGA (Agar esculina-glicerol), tolerancia a etanol y tolerancia a dióxido de azufre.

4.3.1. Actividad β glucosidasa

Se sabe que las levaduras tienen un efecto en la composición aromática del vino, ya sea modificando los compuestos típicos de cada variedad o sintetizando a partir de los nutrientes del mosto los llamados aromas fermentativos (Swiegers *et al*., 2005). Se ha demostrado que a pesar de la baja capacidad fermentativa de las cepas no-*Saccharomyces* su impacto en los vinos finales sobre algunos compuestos aromáticos puede ser más importante que el efecto de las *Saccharomyces* (Erten, 2002). Lo anterior se debe a que las primeras pueden incrementar la concentración de compuestos volátiles responsables de aromas frutales por acción de la enzima

β-glucosidasa, ya que esta enzima es capaz de hidrolizar ciertos compuestos glicosídicos (ligados a azúcares), con lo que se obtiene la liberación de compuestos volátiles que pueden modificar el perfil aromático en el vino (Arévalo *et al.*, 2005). Estos precursores aromáticos son de gran interés en la industria vitivinícola y varios esquemas de desarrollo biotecnológico (Carrau, 2005).

De las 146 cepas reconocidas como no-*Saccharomyces*, 90 resultaron β-glucosidasa positivas (62 % de las levaduras nS)en medio EGA. En la Figura 4.4 se observan algunas de las levaduras probadas. Aquellas que muestran la actividad presentan una coloración marrón oscuro. Asimismo en la Tabla 4.2 se consigan todas aquellas no-*Saccharomyces* que resultaron β glucosidasa positivas.

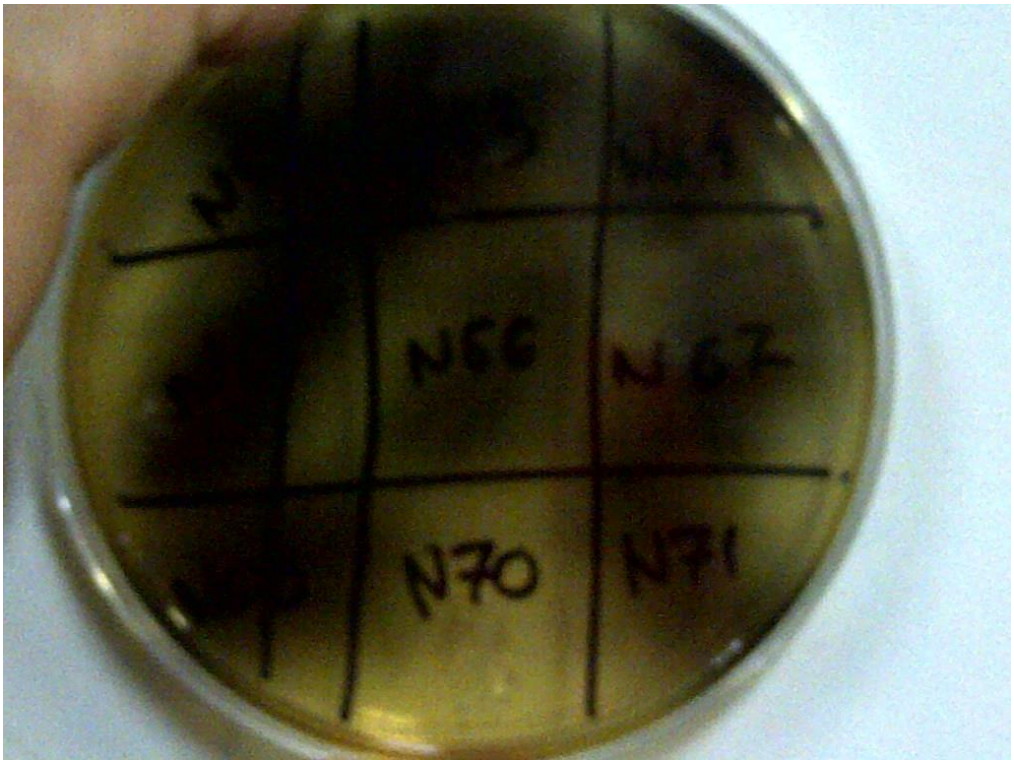


Figura 4.4 Caja de Petri con medio EGA (agar esculina glicerol) dividida en nueve secciones inoculadas con diversas cepas de levaduras.

La prueba utilizada para la detección de la actividad β glucosidasa fue sólo cualitativa. Se sabe que algunas levaduras no-*Saccharomyces* tienen diferentes grados de actividad β glucosidasa. Pérez *et al*. (2011) usaron el mismo medio (EGA) para detección de esta enzima, evaluaron en microvinificacion la cantidad de glúcidos al inicio y final de una fermentación

llevada a cabo por una cepa productora de la enzima previamente caracterizada. Posteriormente identificaron y cuantificaron los compuestos volátiles generados por medio de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas. Otros autores determinaron cuantitativamente la actividad de la enzima usando como sustrato p-nitrofenil-β-D-glucopiranosido. Después de incubación el sobrenadante fue evaluado espectrofotométricamente en p-nitrofenol (Maturana *et al.*, 2012).

También se sabe que la β-glucosidasa puede ser inhibida por la presencia de glucosa y de etanol, sin embargo, se ha encontrado que la enzima liberada por las levaduras no-*Saccharomyces* no es inhibida en las condiciones anteriormente mencionadas (Jolly *et al.*, 2006). Se desconoce si las levaduras que mostraron actividad enzimática positiva en medio EGA en este estudio produzcan enzima que sea inhibida o no en condiciones vínicas.

Todas las levaduras fueron preservadas, independientemente de su actividad β glucosidasa, y se encuentran formando parte de la colección de levaduras del laboratorio de Fermentaciones y Fisiología de Frutas y Hortalizas. Éstas pueden ser sometidas a estudios de vinificación para evaluar su potencial en otras variables de calidad del vino.

Tabla 4.2. Levaduras con β-actividad glucosidasa detectadas en este estudio por viñedo

Viñedo	**Levaduras**	**Número**
El Barreno	NB1 , NB2, NB3, NB7, NB8, NB9, NB10, NB13, NB14,NB16, NB17, NB18, NB23, NB24,NB25, NB27,NB31, NB39, NB45, NB46, NB48, NB51, NB52, NB53, NB54, NB59, NB60, NB61,NB62,NB63, NB64, NB65, NB66, NB71, NB73, NB143, NB108, NB109, NB110,NB111, NB114, NB116, NB117, NB118, NB119, NB120, NB121, NB123, NB124, NB129, NB130, NB131, NB132, NB133, NB143, NB146, NB147,NB148	58
El Rosario	NR12, NR20, NR21, NR28, NR33, NR74, NR77, NR84, NR86, NR87, NR90, NR94, NR96, NR98, NR99, NR100, NR104, NR105, NR106, NR107, NR139.	21
Los Aztecas	NA4 , NA22, NA26, NA36, NA38, NA41, NA42, NA56, NA72, NA75, NA80	11
Total		90

4.3.2. Tolerancia a Etanol

Las levaduras no-*Saccharomyces* convierten durante la fermentación alcohólica natural los azúcares en etanol, dióxido de carbono y un sinnúmero de compuestos volátiles y no volátiles que contribuyen a la composición química y la calidad sensorial de las bebidas que fermentan (Fleet y Heard, 1992; Lambrechts y Pretorius, 2000). Estas levaduras forman parte de la microbiota que predomina durante los dos o tres primeros días de la fermentación alcohólica espontánea, sin embargo, algunas de ellas (género *Kloeckera*, *Candida*, etc.), debido a su elevada sensibilidad al etanol (5 a 6 % v/v en la mayoría de las especies), su crecimiento declina rápidamente y mueren al verse afectada la integridad de su membrana citoplasmática y pérdida de la actividad de ciertas enzimas de la glucólisis de las levaduras (Ricci *et al.*, 2004). Subsecuentemente, levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, al ser más resistentes al etanol, toman el control de la fermentación hasta el agotamiento de los azúcares, o bien, hasta que algún componente esencial para el crecimiento se agote o hasta que aparezca algún efecto inhibidor propiciado por ciertos metabolitos producidos durante la fermentación (Escalante *et al.*, 2011).

Para conocer la tolerancia al alcohol de las 90 cepas de levaduras nS que habían resultado β-glucosidasa positivas se llevó a cabo un estudio en el analizador turbidimétrico automatizado Bioscreen® C . Se utilizó un medio medio YPD líquido ajustado a ajustado a pH 3.5, 20 ºB conteniendo 6 % de etanol total. Después de la incubación, se seleccionaron aquellas cepas que mostraron los mayores tiempos de detección, es decir, que les tomó más tiempo iniciar la fase exponencial, lo que indica una baja tolerancia a etanol. Todas las levaduras evaluadas presentaron tiempos de detección por encima de 18 horas.

Los rangos de tiempo de detección de las levaduras evaluadas en el medio conteniendo etanol fluctuaron entre 18.17 h y 72.02 h (Figura 4.5). Las levaduras seleccionadas fueron NB1 (47.75 h), NB27 (34.5 h), NR90 (18.17 h), NB108 (54.5h), NB31 (39h), NB39 (72.08 h), NR77 (26.58 h) y NA4 (24 h).

4.3.3. *Tolerancia a dióxido de azufre (SO_2)*

El dióxido de azufre es un agente antiséptico y antioxidante utilizado en Enología para obtener estabilidad microbiológica y caracterizar levaduras fermentativas en fermentaciones espontáneas (Navarre, 1998; Ribérau-Gayon *et al.*, 2003).

Cantidades moderadas (30 a 100 mg/L de SO_2 total) alargan la fase de inducción de levaduras en uno o dos días, mientras que cantidades elevadas (mayores a 200 mg/L), retrasan el inicio de la fermentación e incluso pueden llegar a inhibirla. El SO_2 ejerce una acción selectiva entre las levaduras. Las especies no-*Saccharomyces* son generalmente más sensibes a las altas concentraciones de sulfuroso que las *Saccharomyces* de manera que, cantidades moderadas de anhídrido sulfuroso eliminan la mayoría de las especies débilmente fermentativas y muchas de las perjudiciales para la vinificación (Zambonelli, 1998).

La tendencia mundial es a disminuir la dosis de anhídrido sulfuroso total en los vinos, por medio del mejoramiento de la sanidad de la vendimia y de las técnicas de vinificación (Rogodón, 1997). Cuando se adiciona poco anhídrido sulfuroso al mosto es recomendable la utilización de levaduras seleccionadas, evitando el desarrollo excesivo de las bacterias y levaduras apiculadas. En este sentido, se pueden seleccionar levaduras productoras de SO_2 en cantidades suficientes para mantener el vino estable (Villarroel, 2005).

Las cepas que garanticen una fermentación completa cuando las concentraciones de dióxido de azufre libre y total en superiores a 30 mg/L y 50 mg/L, respectivamente, son adecuadas para vinificación (OIV-OENO 370, 2012). Por ello, lo que se buscó en este estudio fue el detectar cepas que toleraran anhídrido sulfuroso.

Cabe recordar que la evaluación de la tolerancia a anhídrido sulfuroso se realizó mediante el analizador turbidimétrico automatizado Bioscreen® C en el medio YPD líquido ajustado a ajustado a pH 3.5, 20º B con una concentración de 30 mg/L de dióxido de azufre total. En esta fase se evaluaron las 90 levaduras nS clasificadas anteriormente como β-glucosidasa positivas y se seleccionaron aquellas que obtuvieron bajos tiempos de detección durante su incubación, lo que significa una mayor capacidad de desarrollo de la cepa en presencia de SO_2 que el rango obtenido de tiempo de detección de las levaduras evaluadas fue 2.87 h a 20.25h (Cuadro A3).

En la Figura 4.5 se observa en el eje de la abscisa el tiempo de detección de las levaduras evaluadas en medio nutritivo con presencia de SO_2. Se advierten diferencias importantes entre ellas, destacando NB1 (12.37 h), NB27 (12.37 h), NR90 (2.87 h), NB108 (4 h), NB31 (7.75 h), NB39 (12.25 h), NR77 (3.87 h) y NA4 (8.75 h).

Como se esbozó anteriormente, una de las características que se requiere en una nS como potencial levadura comercial, es su tolerancia a SO_2, lo que en principio le permitiría

iniciar la fermentación rápidamente, con lo cual estaría realizando una mayor aportación de los elementos que de ésta se requieren, antes de que su actividad se vea limitada por el aumento de etanol en el medio propiciado por el desarrollo dominante de *Saccharomyces.*

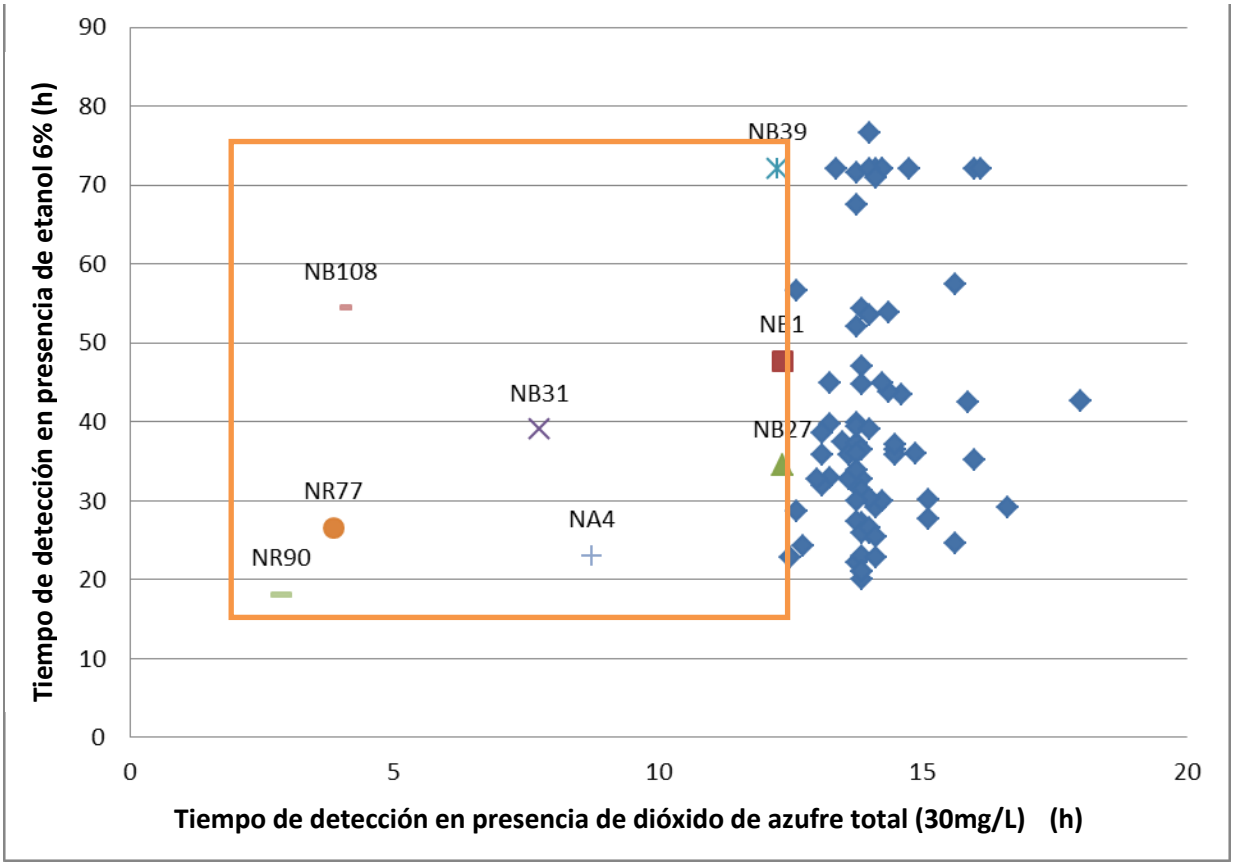


Figura 4.5 Tiempos de detección en Bioscreen C en horas de diversas levaduras no *Saccharomyces* en medios YPD líquido ajustado a ajustado a pH 3.5, 20º B conteniendo etanol (6 %) y dióxido de azufre (30 mg/L total) señalandose con un recuadro las cepas seleccionadas.

4.3.4. Levaduras seleccionadas

Recapitulando, podemos mencionar que de las 146 levaduras no- *Saccharomyces* obtenidas en los distintos viñedos, 90 presentaron actividad β-glucosidasa. Las 90 levaduras fueron sometidas a dos pruebas de tolerancia; en cuanto a etanol (6 %), todas resultaron poco tolerantes (tiempos de detección mayor a 18 horas) y, por lo que respecta a dióxido de azufre (30 mg/L de dióxido de azufre total), se seleccionaron aquellas ocho que resultaron las más

tolerantes (tiempos de detección cortos), dentro de éstas tenemos una gran variabilidad en su tolerancia a anhídrido sulfuroso (entre 2.87 y 12.37 h).

4.4. Ensayos de microvinificación

4.4.1. Comportamiento fermentativo

Como se recordará, las levaduras fueron evaluadas en ensayos de microtermivinificación. Para ello, mostos de `Cabernet Sauvignon´ y `Merlot´ fueron sometidos a 60 ºC durante 20 min, para después diminuir su temperatura a 20 ºC en menos de 5 min y posteriormente prensadas en condiciones aséptica. Los mostos obtenidos se ajustaron a 21 ºB y pH 3.5, y se inocularon con cada una de las levaduras seleccionadas. Una hora después los mostos fueron inoculados con la levadura de referencia K1 (*Saccharomyces cerevisiae*), y uno más de los mostos fue únicamente inoculado con K1.

4.4.1. Seguimiento de la fermentación

a) Pérdida de peso

Durante la fermentación y, debido al desprendimiento del gas carbónico, el mosto sufre una pérdida de peso por la transformación de azúcares en dióxido de carbono, etanol y otras sustancias. En una fermentación mixta de no-*Saccharomyces* en combinación con *Saccharomyces*, es importante que el producto de la fermentación obtenido o propiciado por esta última (principalmente la producción de alcohol a expensas de los azúcares presentes) no se vea afectado por la acción de las primeras (Raynal *et al.*, 2011).

La evolución del peso del vino durante la fermentación tuvo un comportamiento diferente en función de la variedad de la uva al inicio de la fermentación, mientras que en ‘Cabernet Sauvignon’ se observa una tendencia clara en la disminución constante de peso, en `Merlot´ disminuye muy poco antes de las 24 horas, después de este tiempo se ve una tendencia clara en la disminución. Lo anterior puede atribuirse a que en `Merlot´ la levadura tardo más en adaptarse que en `C.Sauvignon´. Las fermentaciones en `C.Sauvignon´ y `Merlot´ finalizaron en siete días (Cuadro A4).

Asimismo, dicho peso evolucionó de manera muy similar en los ocho inóculos mixtos o cuando se inoculó únicamente *Saccharomyces* como se puede observar en la Figura 4.6. El comportamiento similar es debido a que mayor conversión de azúcares a etanol y dióxido de

carbono lo realiza *Saccharomyces* presente en todas las microvinificaciones, ésta es una respuesta positiva debido a que podemos decir que la no-*Saccharomyces* no retrasaría la fermentación.

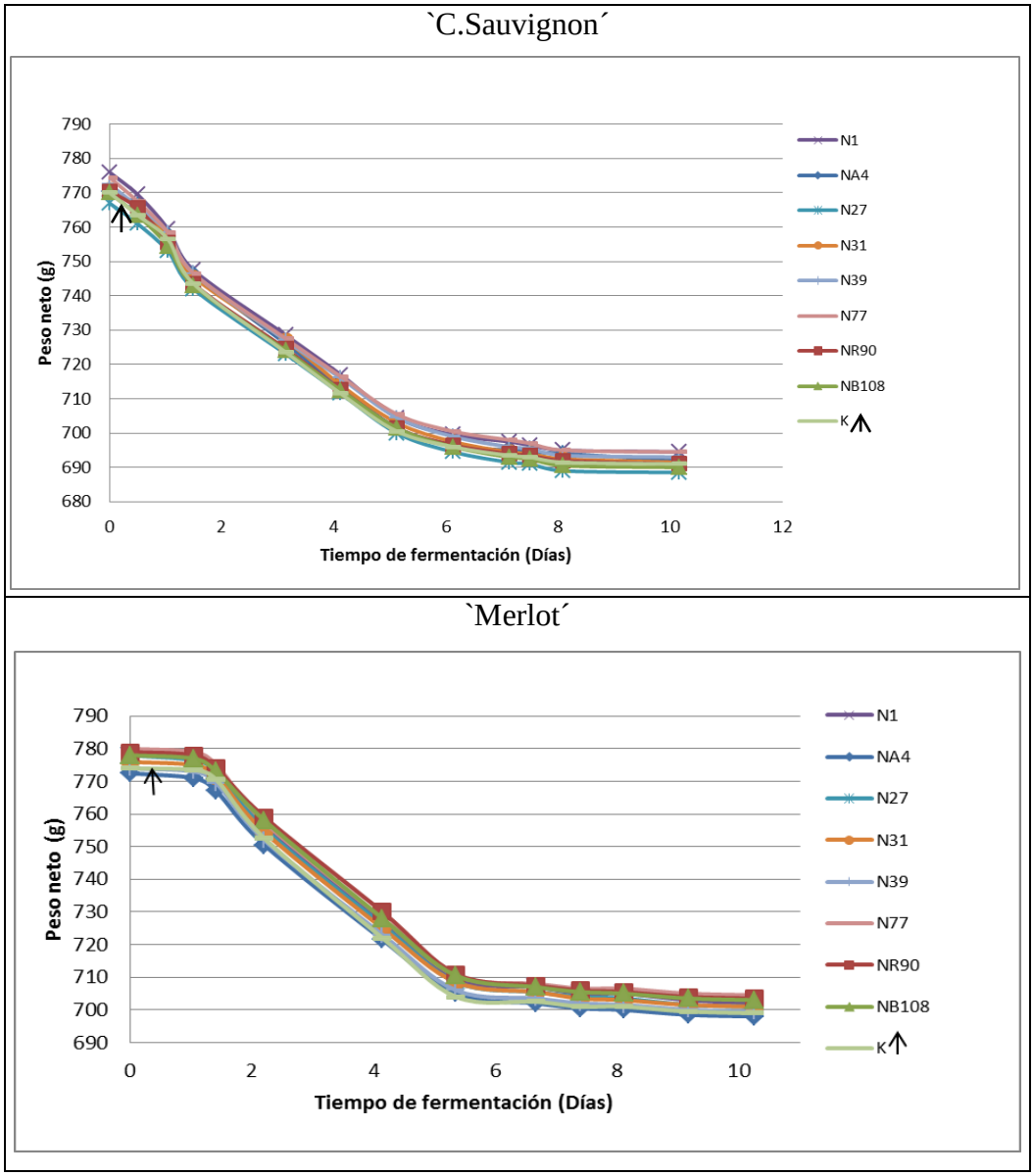


Figura 4.6 Evolución del peso del mosto de `C.Sauvignon` y Merlot durante la fermentación de mostos inoculados con diferentes levaduras no-*Saccharomyces* + K1.

b) Densidad

La densidad de los mostos durante la fermentación va disminuyendo en forma paulatina para estabilizarse lentamente. La densidad del mosto se ubica, por lo general, entre 1.070 y

1.120 g/L y va a ser función de la concentración de azúcares. La del vino debe estar entre 990 y 998 g/L y es normalmente superior en los tintos que en los blancos.

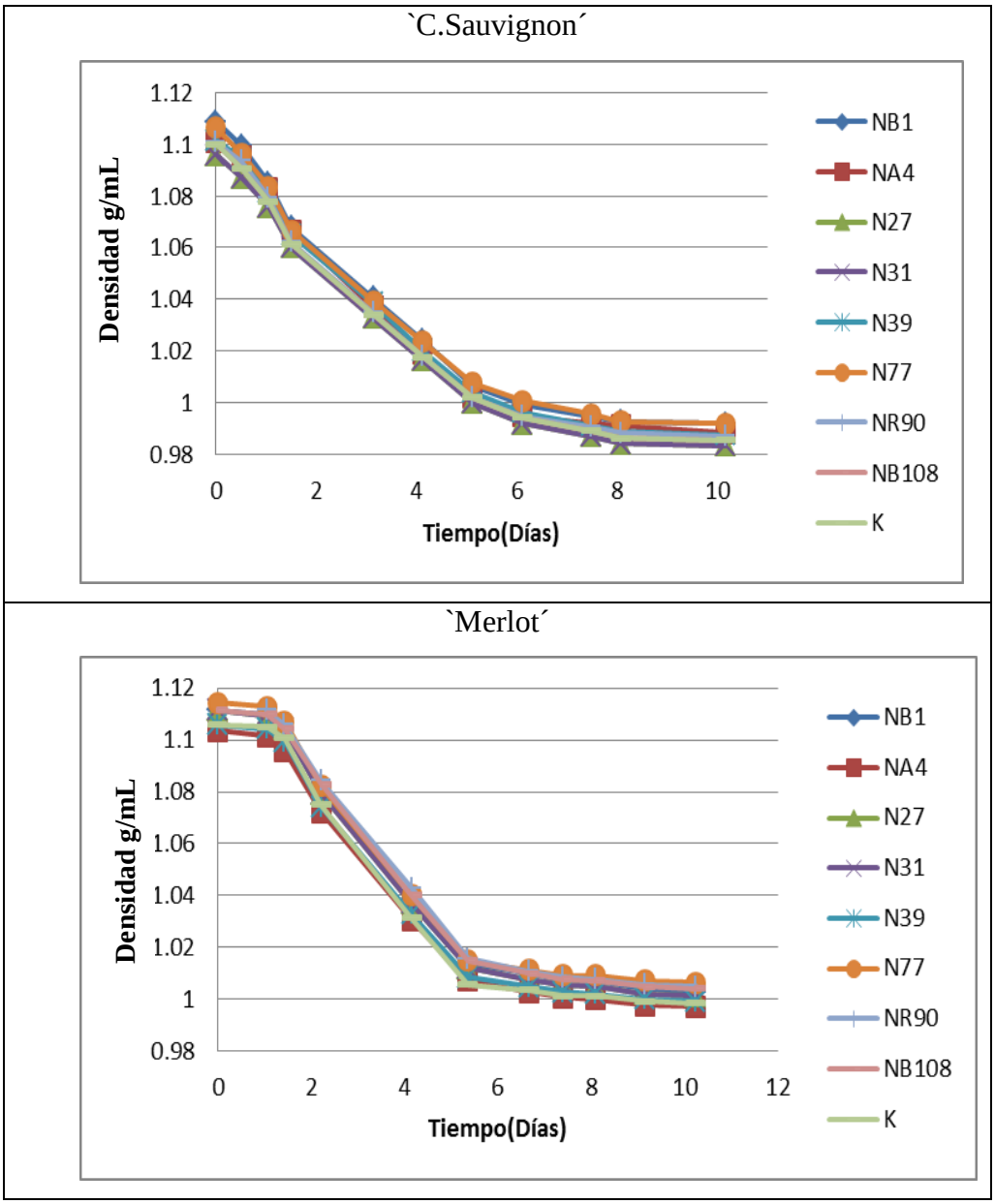


Figura 4.7. Evolución de la densidad de mostos de dos variedades de vid `C.Sauvignon´ y `Merlot´ en función de la levadura nS de fermentación en inóculos mixtos.

Este descenso paulatino de la densidad del mosto se debe a que contiene azúcar disuelto, además de otras sustancias, lo que lo hace más denso que el agua; por su parte, el vino no contiene azúcar, ya que fue consumido total o parcialmente durante la fermentación, y sí tiene

alcohol que es menos denso que el agua, lo que genera que la densidad del vino esté por debajo de la del agua (1000 g/L) (Aleixandre, 2006).

La densidad inicial para todos los mostos fue de 1.100 g/mL, finalizando entre 1.00 g/mL y 0.998 g/mL para 'Merlot' al séptimo día, se midió hasta el décimo pero se mantuvo constante. Mientras que para `C.Sauvignon´, finalizó 0.98 g/mL (Figura 4.7).

c) Sólidos solubles totales

Se midieron los sólidos solubles totales al inicio y al final de la fermentación en microvinificación, como indicador de la marcha de la fermentación. En Querétaro se presentan lluvias antes de la cosecha, causando la disminución de sólidos solubles totales , en el año 2012 en promedio se obtuvieron 21 ºB y los mostos fueron ajustados al inicio a 21 ºB, inspirados en Jolly (2003), para obtener un mosto con características semejantes a las de la región.

Tabla 4.3. Porcentaje de sólidos solubles totales expresados en ºBrix de la microvinificaciones al final de la fermentación de mostos de dos variedades de vid en presencia de ocho cepas de levaduras nS en inóculos mixtos con S

Levaduras	CS	M	ºBrix (Promedio)	Desviación Estándar
NA4+ K	7.2	5.8	6.5 a	0.989
NR90+ K	7	7	7 a	0
NB108+ K	7.2	7	7.1 a	0.141
NB1+ K	7.6	7	7.3 a	0.424
NB27+ K	7.0	7.2	7.1 a	0.141
NB31+ K	7.4	7	7.2 a	0.282
NB39+ K	7.5	7	7.25 a	0.353
NR77+ K	7.5	7	7.25 a	0.353
K	7.5	7	7.25 a	0.353
Variedades	7.32 a	6.89 b		0.1
CVVariedad	42.6%		CV levaduras	5.3%
Valor F	8.34		Valor F	1.2

Promedios obtenidos de dos observaciones para levaduras y de ocho observaciones individuales para variedades. Medias seguidas de letras distintas denotan diferencias de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).
CS: Microvinificación en `C.Sauvignon´; M: Microvinificación en `Merlot´

Como resultado de lo anterior, no se detectaron diferencias entre las microvinificaciones por efecto de la levadura, habiéndose llegado al fin de la fermentación a valores que fluctúan entre 7 y 7.5 ºB para las distintas levaduras en 'C. Sauvignon' 5.8 y 7.2ºB en `Merlot´ (Tabla 4.3). Sin embargo si hubo diferencias por parte de la variedad de vid con la que se realizó la microvinificación, con un promedio de 7.32 ºB para `C. Sauvignon´ y 6.88 ºB para `Merlot´. Esto es debido a que la mayor parte del consumo de azúcares es por parte de la levadura *Saccharomyces* la cuál fue la misma cepa utilizada para todas las microvinivicaciones.

4.4.2. Cinética de las levaduras

Se busca como característica deseable en una no-*Saccharomyces* el que domine en el primer estadio de la fermentación disminuyendo paulatinamente su población, mientras que *Saccharomyces* se posiciona como predominante de la fermentación (Raynal *et al.*, 2011).

Recordemos que el inóculo de no- *Saccharomyces* aplicado a los mostos fue tres veces superior ($3x10^6$ UFC/mL) y se inoculó e inoculado una hora antes que el de *Saccharomyces* ($1x10^6$ UFC/ml) con la finalidad de permitir el desarrollo de las primeras y así poder revelar su efecto, tal como lo señala Jolly (2003).

Además, el recuento de la población de levaduras no-*Saccharomyces* y de *Saccharomyces* se llevó a cabo por cuenta viable diariamente y hasta el séptimo día de la fermentación. En el caso de no-*Saccharomyces*, el recuento se realizó directamente en medio lisina, mientras que para *Saccharomyces* se efectuó un recuento total en medio NYDA y por diferencia se estimaron las poblaciones de éstas

a) Comportamiento general de las levaduras en los mostos de las dos variedades

En la Figura 4.8 se aprecia el desarrollo de la cepa de referencia K1 cuando fue inoculada en vinos de dos variedades, sola o en presncia de alguna cepa nS. Se advierte una diferencia evidente en el desarrollo de esta cepa en función del cultivar de uva. La levadura K1 (*Saccharomyces*) en presencia o en ausencia de no *Saccharomyces* alcanzó una población máxima de entre $7x10^6$ UFC/mL y $1x10^7$ UFC/mL. En general se observa que K1 se adaptó inmediatamente al medio.

Por otro lado, en la Figura 4.9 se describe la dinámica poblacional de las ocho cepas de levadura en inóculo mixto en mostos de dos variedades de vid.

En general el comportamiento poblacional de las diferentes levaduras fue distinto al ser inoculadas en cada una de las microvinificaiones.

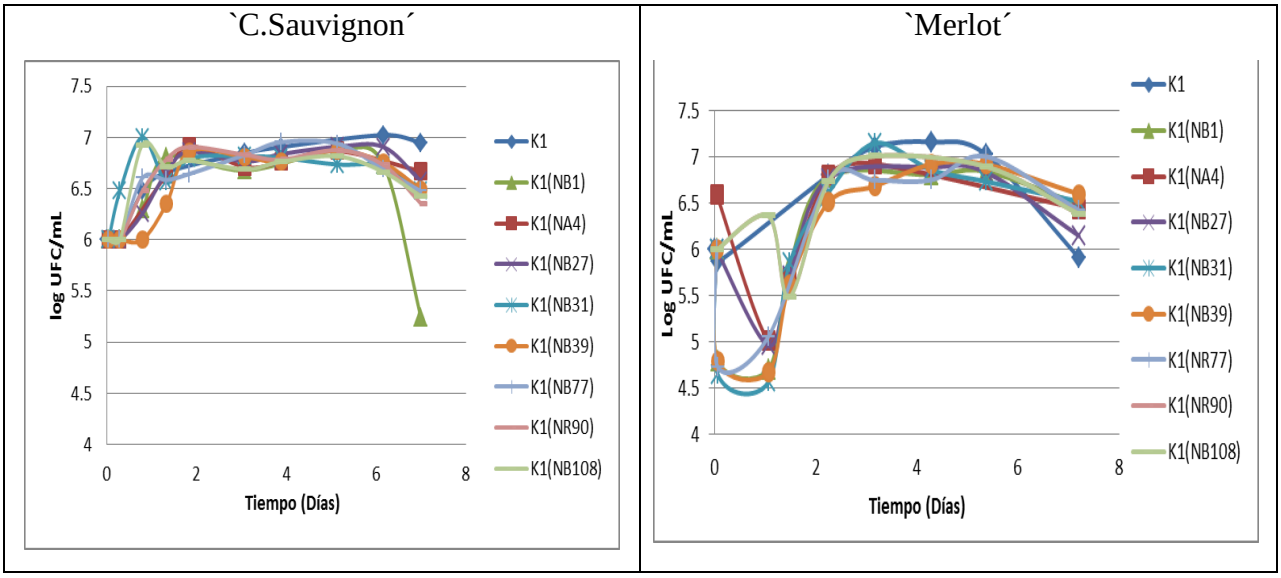


Figura 4.8. Cinética poblacional de la levadura K1 cuando se encontraba en combinación con cada una de las ocho levaduras nS durante la fermentación en mostos de `C.Sauvignon´ y `Merlot´.

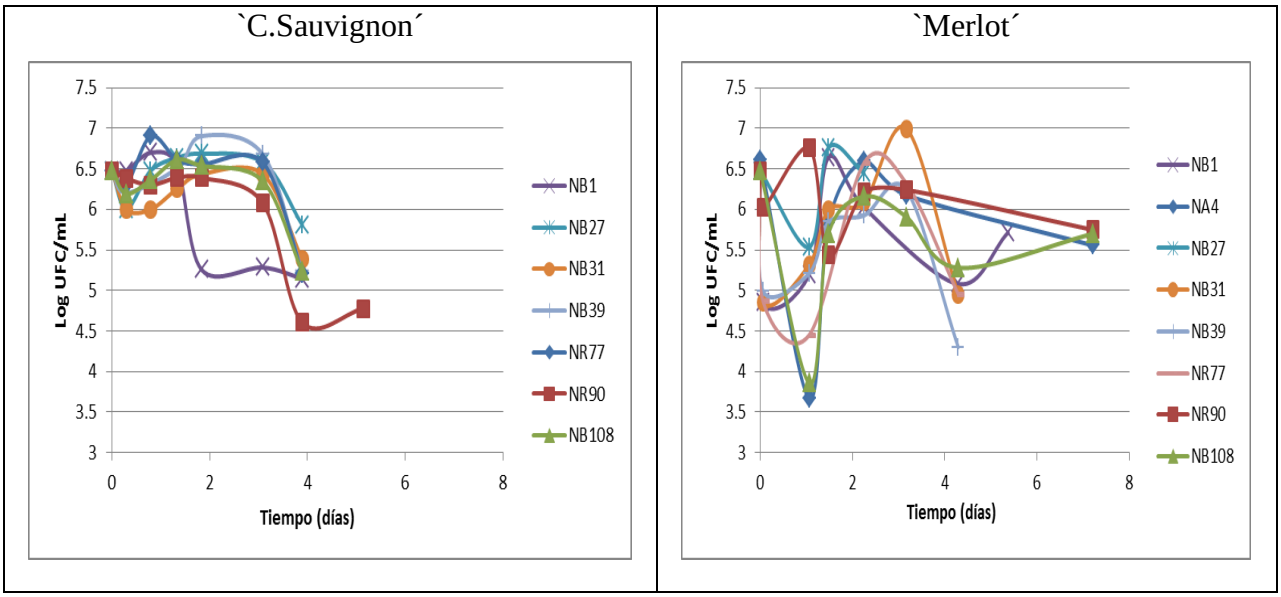


Figura 4.9. Evolución de las poblaciones de dos cepas de levaduras nS cuando se encontraban en combinación durante la fermentación de mosto de dos cultivares de vid ‘C.Sauvignon’ y ‘Merlot’.

En todos los casos, y tal como se esperaba, la levadura predominante fue siempre *Saccharomyces* (K1) la cual permaneció hasta el final de la fermentación, como se reporta en algunos estudios (Comitini, 2011). Por el contrario, se observa que, en la mayoría de las no-*Saccharomyces* ocurre un descenso súbito en la población al entrar en contacto con el mosto. Una mayoría de éstas alcanzó su máximo de población alrededor de a 2.083 días de la fermentación para después disminuir su población drásticamente. Así, después del 4º día (96 h) la cuenta de no-*Saccharomyces* se encontraba por debajo del límite de detección, excepto en algunos casos como en NB1/`Merlot´, NA4/`Merlot´, NR90/`Cabermet Sauvignon´ y `Merlot´ y NB108/`Merlot´.

b) Comportamiento de cada una de las levaduras

K1 en ausencia de levaduras no Saccharomyces

La levadura de referencia K1 (*Saccharomyces cerevisiae*) alcanzó su máxima población de $1x10^7$ UFC/mL en `C.Sauvignon´ después de seis días de fermentación, mientras que en `Merlot´ alcanzo $5x10^7$ UFC/mL a los cuatro días (Figura 4.10).

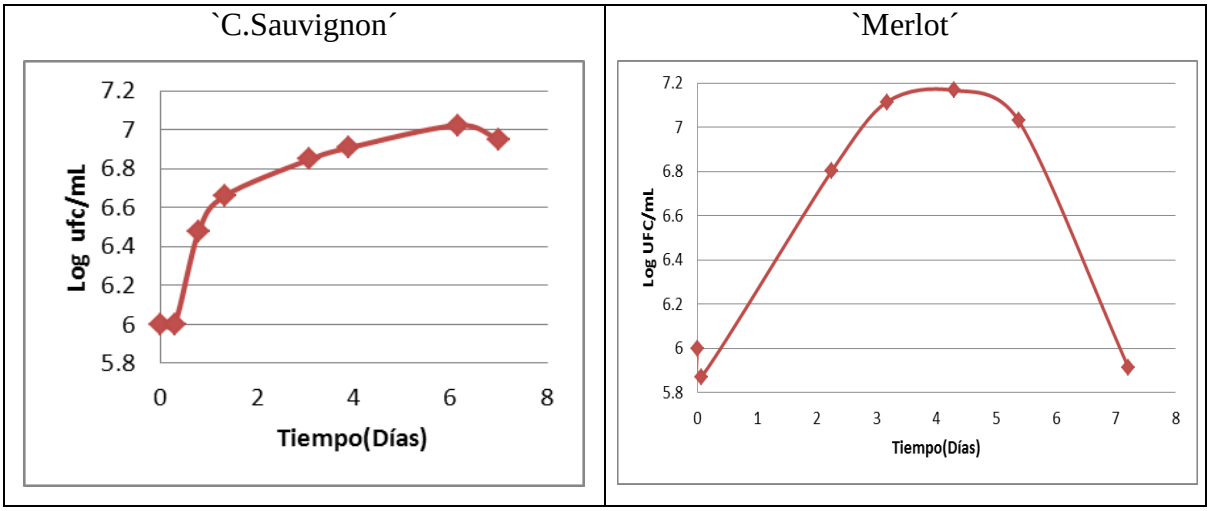


Figura 4.10. Cinética poblacional de la levadura K1 durante la fermentación en mostos de `C.Sauvignon´ y `Merlot´ en ausencia de levaduras nS

Se sabe que *Saccharomyces cerevisiae* muestra cinco fases de crecimiento bien definidas cuando es cultivada en medios líquidos con glucosa como fuente de carbono, a saber: 1) la fase lag, 2) la fase logarítmica, 3) el cambio diáuxico, 4) la fase postdiáuxica y 5) la fase estacionaria. La primera consiste de un periodo de adaptación en el cual la célula se prepara para

dividirse. Durante la fase logarítmica las células alcanzan su máxima velocidad de duplicación y llevan a cabo un metabolismo fermentativo en el que se produce etanol. Al disminuir la concentración de glucosa, las células atraviesan por el cambio diáuxico, un periodo breve de tiempo en el cual no hay división, y la célula cambia de un metabolismo fermentativo a uno respiratorio. En la fase postdiáuxica las células usan como fuente de carbono el etanol producido durante la fase logarítmica e incrementan su resistencia al estrés gradualmente; en tanto que la fase estacionaria se presenta cuando los nutrientes del medio se han agotado y no hay división celular. En esta fase, las células acumulan carbohidratos de reserva como trehalosa y glucógeno, alcanzan el máximo nivel de resistencia a estrés y su pared celular se vuelve más gruesa y resistente a la digestión por liticasa (Folch *et al.*, 2004).

NB1 + K1

Se aprecia que NB1 se adaptó e inició su crecimiento poblacional primeramente en `C.Sauvignon´ que en `Merlot´, donde necesitó de un día para poder detectar un cambio en su población (Figura 4.11).

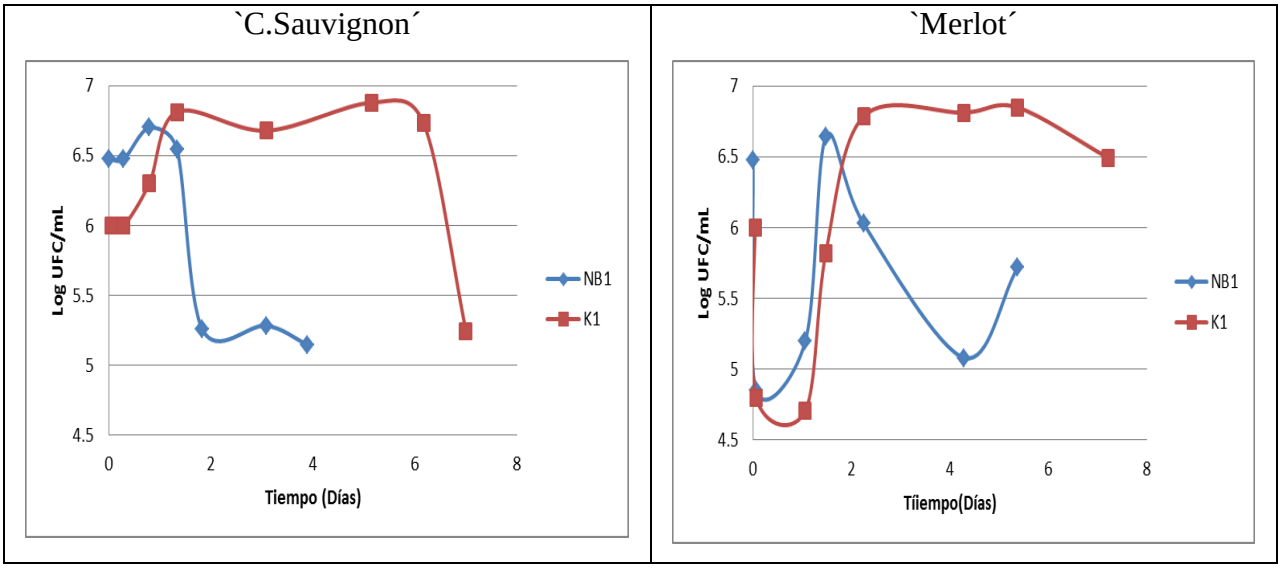


Figura 4.11. Evolución de las poblaciones de dos cepas de levaduras NB1 y K1 durante la fermentación de mosto de dos cultivares de vid ‘C.Sauvignon’ y ‘Merlot’.

Mientras que K1 inició su reproducción primero en C.Sauvignon y después en Merlot alcanzó valores superiores a 7 x 10^6 UFC/mL como población máxima a las 5.5 días, empezando a declinar después de este tiempo.

NA4 + K1

La levadura NA4 tuvo un comportamiento muy diferente en `C.Sauvignon´ con relación a `Merlot´, se adaptó primero para `C.Sauvignon´ que para `Merlot´. Ésta fue primeramente detectada en CS, sin embargo su población máxima fue de aproximadamente $3x10^6$ UFC/mL y ya no fue detectada después de 4 días de fermentación, en cambio, en Merlot NA4 pudo adaptarse después de un día, alcanzando su máxima población a 2 días con 4 x 10^6 UFC/mL, y fue aún detectada al final de la fermentación. Si comparamos el comportamiento de esta levadura con la NB1, vemos que ésta alcanzó una mayor población máxima de 5 x 10^6 UFC/mL en mosto de `C.Sauvignon´ y 4.35 x $10^6$ UFC/mL en `Merlot´, y al igual NB1, NA4 a también fue detectada en más tiempo en `Merlot´ que en `C.Sauvignon´ (Figura 4.12)

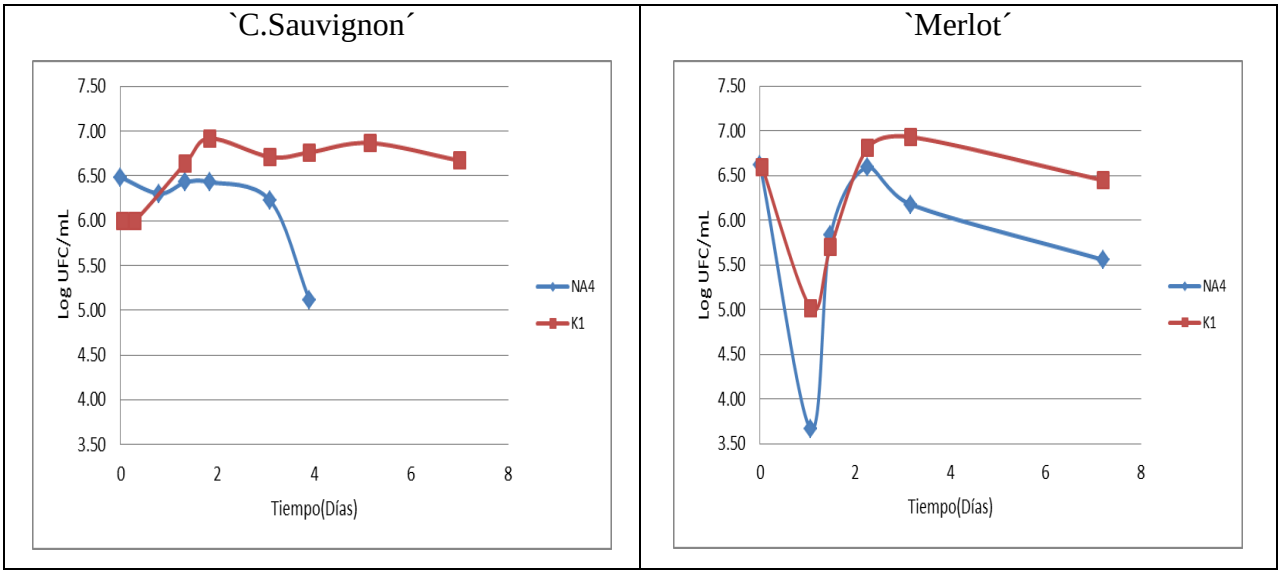


Figura 4.12. Evolución de las poblaciones de dos cepas de levaduras NA4 y K1 durante la fermentación de mosto de dos cultivares de vid 'C.Sauvignon' y 'Merlot'.

Por su parte K1 inicio rápidamente su reproducción en `C.Sauvignon´, alcanzando su máxima población después de 1.83 días con $8x10^6$ UFC/mL, mientras que en `Merlot´ alcanzó esa misma población hasta las 3.16 días de incubación. En la fermentación mixta con NB1 alcanzó K1 poblaciones menores ($7x10^6$ UFC/mL). Los resultados anteriores son posiblemente debidos a la influencia de la levadura nS de cada vinificación. La numerosa y persistente población de no-*Saccharomyces* ejerce una marcada influencia en la composición del vino y aún en el comportamiento de una cepa de *S. cerevisiae* sembrada en un mosto, esta puede verse

afectada tanto en su metabolismo como en su ritmo de crecimiento por la influencia nS (Vazquez *et al.*, 2005).

NB27 +K1

NB27 disminuyo $2x10^6$ UFC/mL tanto en `C.Sauvignon` como en `Merlot` al ingresar al mosto, sin embargo, se recuperó primero en `C.Sauvignon´ (Figura 4.13). Su población máxima fue $5x10^6$ UFC/mL, similar a la población de NB1 en la misma variedad de mosto. K1 por su parte alcanzó una población máxima de $8x10^6$ UFC/mL entre 4 y 5 días horas para los dos mostos. En `Merlot´ se adaptó después que en `C. Sauvignon´, este comportamiento fue similar en la mayoría de las levaduras.

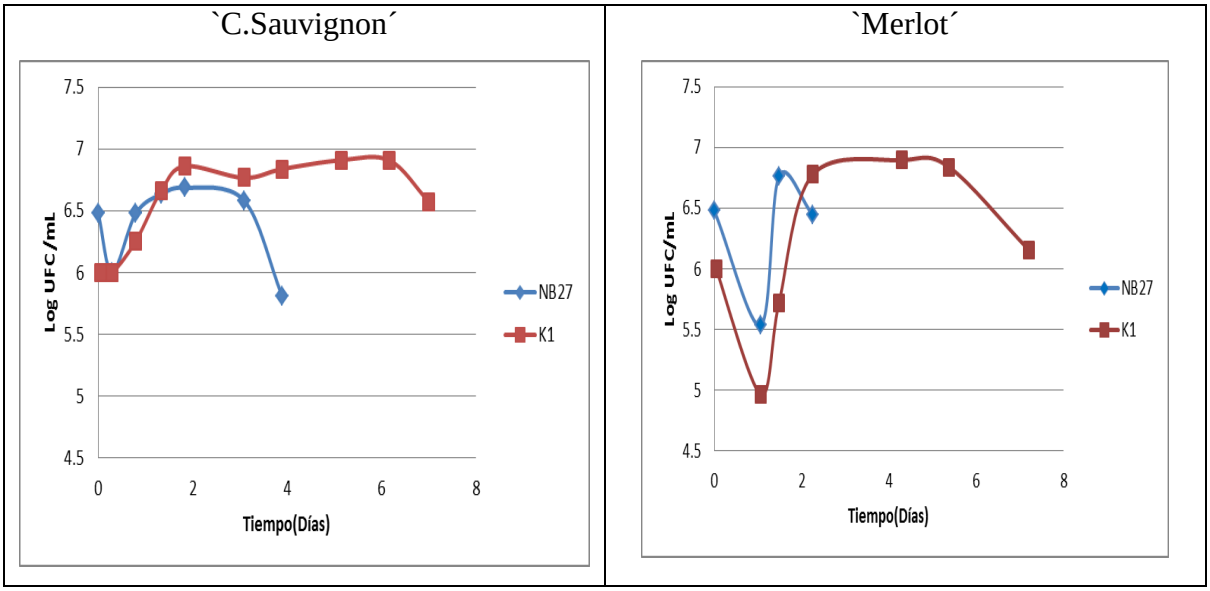


Figura 4.13. Evolución de las poblaciones de dos cepas de levaduras NB27 y K1 durante la fermentación de mosto de dos cultivares de vid 'C.Sauvignon' y 'Merlot'.

NB31 + K1

La levadura N31 no fue detectada después de las 4.16 días de fermentación (Figura 4.14) al igual que NB27, NB31 alcanzó su población máxima alrededor de 2.92 días en ambas variedades, sin embargo en `C. Sauvignon´ alcanzó una población menor a la alcanzada en `Merlot´ de manera similar a NB27 Y NA4. K1 alcanzó una población máxima de $1x10^7$ UFC/mL, primero en ` C. Sauvignon´ y después en `Merlot´, en este último se percibe una lenta adaptación.

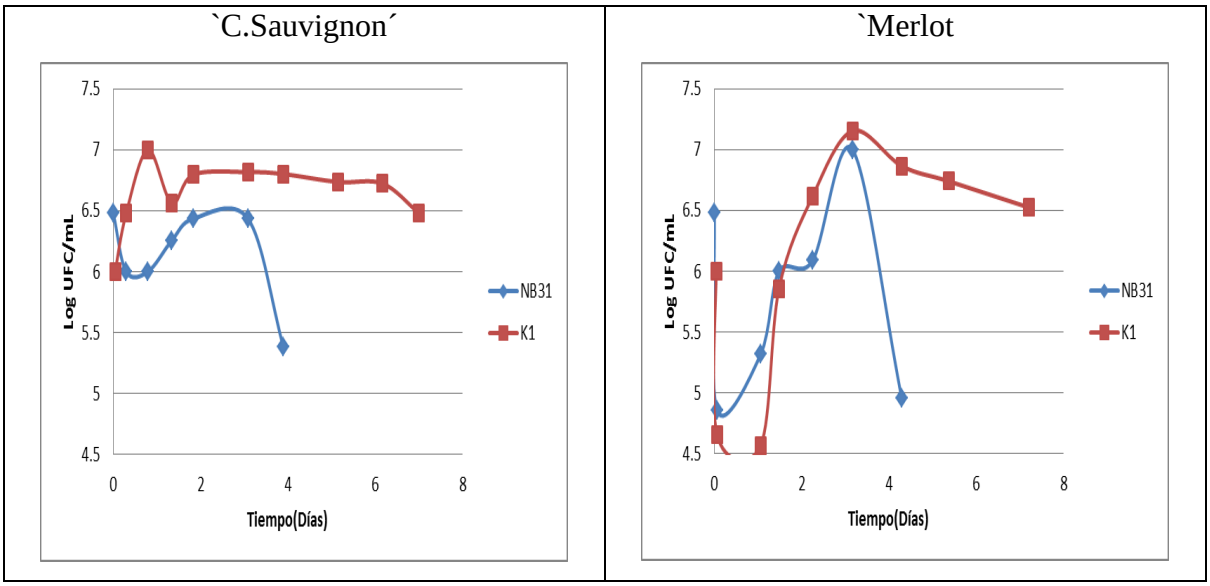


Figura 4.14 Evolución de las poblaciones de dos cepas de levaduras NB31 y K1 durante la fermentación de mosto de dos cultivares de vid 'C.Sauvignon' y 'Merlot'.

NB39 + K1

Al igual que la anterior, la levadura NB39 ya no fue detectada después de 4.16 días de fermentación; en `Cabernet Sauvignogn´ alcanzó una población de 8 x $10^6$ UFC/mL después de 2.08 días de incubación, mientras que en `Merlot´ su máxima población fue de casi 2 x 10^6 UFC/mL alrededor de las 2.92 días (Figura 4.15).

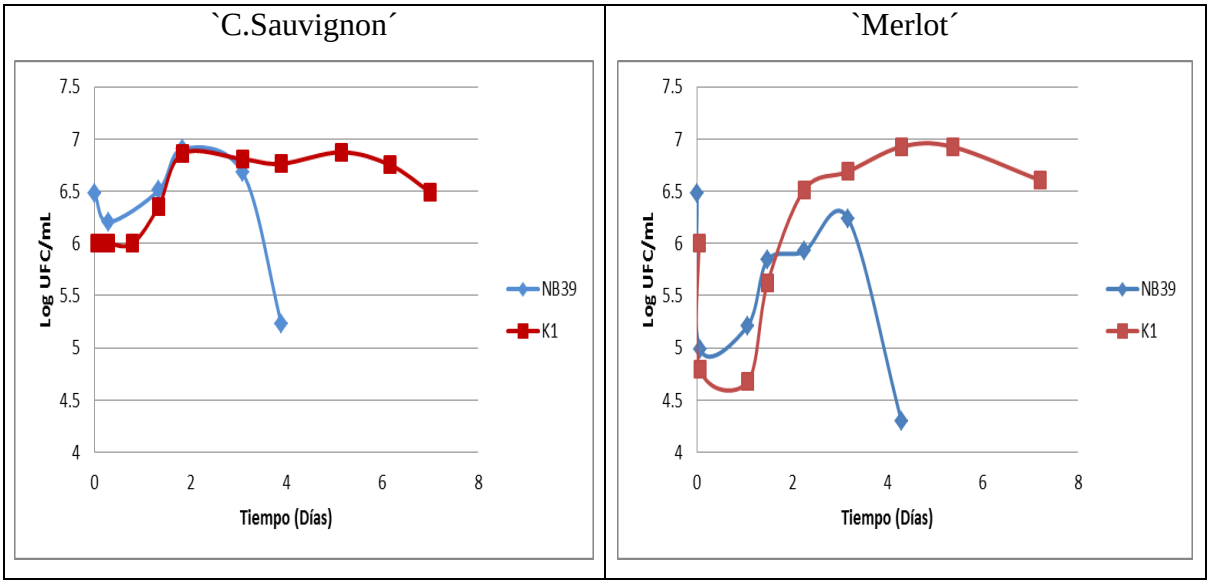


Figura 4.15 Evolución de las poblaciones de dos cepas de levaduras NB39 y K1 durante la fermentación de mosto de dos cultivares de vid 'Cabernet Sauvignon' y 'Merlot'.

Se observa una notable diferencia entre mostos como en NB31. Sin embargo lo que se busca es que después de cuatro días su población no sea capaz de afectar negativamente las características del vino. Mientras tanto, K1 se adaptó más rápidamente en `C.Sauvignon´ iniciando su reproducción primero que en `Merlot´, alcanzando su población máxima de $7x10^6$ UFC/mL alrededor de 1.83 días mientras que en `Merlot´ alcanzó $8x10^6$ UFC/mL alrededor de las 4.16 días, comportamiento general para las no- *Saccharomyces* de este estudio.

NR 77 + K1

La levadura NR77 se adaptó rápidamente en `Cabernet Sauvignon´, alcanzando una población máxima de $8x10^6$ UFC/mL después de un día de incubación, mientras que NB1 Y NB27 a las 0.8 días ya habían recuperado la población inicial, NA4 y NB39 a los 1.3 días en `Cabernet Sauvignon´, mientras que en `Merlot` su población máxima fue de casi $4x10^6$ UFC/mL hasta los dos días, comparando con `Merlot´ 2.25 días de NB1, 1.46 días de NB27.

No fue detectada después de 4 días en ambas fermentaciones (Figura 4.16), N77 puede ser seleccionada al igual que NB27, NB31, NB39 con el criterio de que su población no incrementará después del cuarto día disminuyendo el riesgo de aportaciones indeseables.

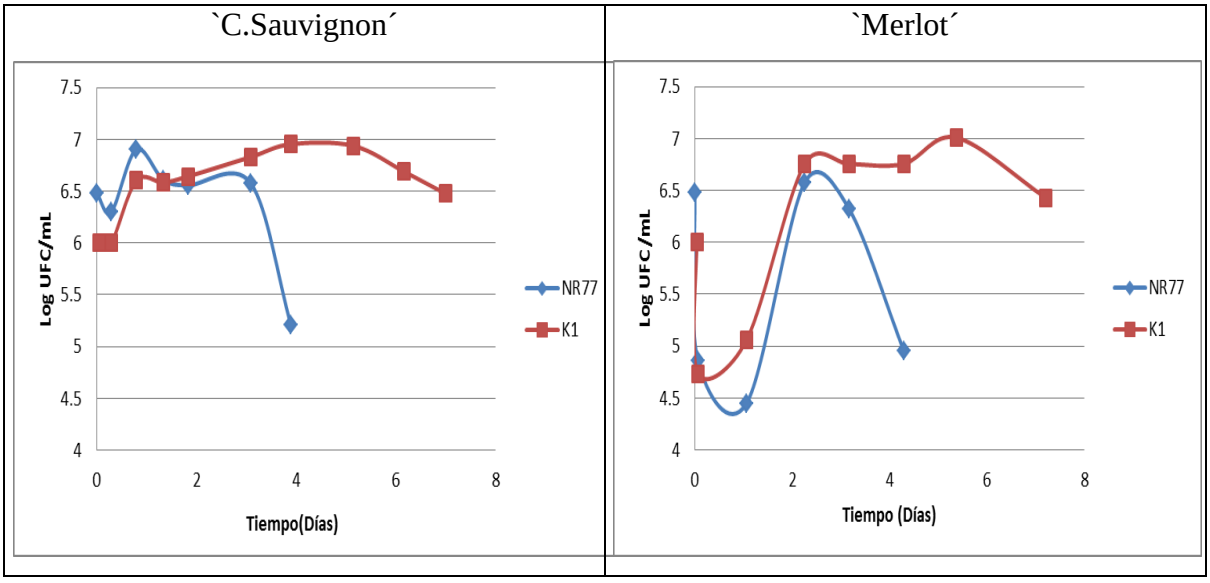


Figura 4.16 Evolución de las poblaciones de dos cepas de levaduras NR77 y K1 durante la fermentación de mosto de dos cultivares de vid ‘C.Sauvignon’ y ‘Merlot’.

K1 alcanzó poblaciones alrededor de $1x10^7$ UFC/mL, primero en ‘C.Sauvignon’ entre 3.13 y 3.9 días, para `Merlot´ ($9x10^6$ UFC/mL) entre 5.4 días. Comparando con NB1 alcanzó su

población máxima ($7x10^6$ UFC/mL) a los 5.25 días en ambos mostos para después declinar su población.

NR90 + K1

La levadura NR90 ya no fue detectada después de 5.21 días en `C.Sauvignon` alcanzando allí su máxima población ($2.5x10^6$ UFC/mL) antes de 2.083 días. Resulta interesante que en el mosto de `Merlot` fue detectada hasta el final de la fermentación (7.083 días) y su población máxima fue superior a la que alcanzó en `C.Sauvignon´ (alrededor de $6x10^6$ UFC/mL) en este caso, después de 1.04 días. La permanencia de esta cepa durante relativamente más tiempo en el medio fermentativo puede relacionarse con el hecho de que fue la cepa más tolerante a etanol de las ocho cepas seleccionadas en Bioscreen C, es decir tuvo menor tiempo de detección que todas las demás. K1 por su parte presentó poblaciones máximas entre $8x10^6$ y $1x10^7$ UFC/mL, adaptándose primero en el mosto de `C.Sauvignon´, mientras que en `Merlot´ alcanzó la máxima población aproximadamente el doble de tiempo que en el primer mosto. Un comportamiento similar a la fermentación con NR90 lo tuvo la fermentación mixta con NA4, donde K1 inicio rápidamente su reproducción en `C.Sauvignon´, alcanzando su máxima población después de 1.83 días con $8x10^6$ UFC/mL, mientras que en `Merlot´ alcanzó esa misma población hasta las 76 horas. Por otro lado la fermentación mixta con NB1a diferencia de NR90, en la que K1 inició su reproducción primero en C.Sauvignon y después en Merlot alcanzó valores superiores a $7x10^6$ UFC/mL como población máxima a las 5.42 días para ambos mostos (Figura 4.17).

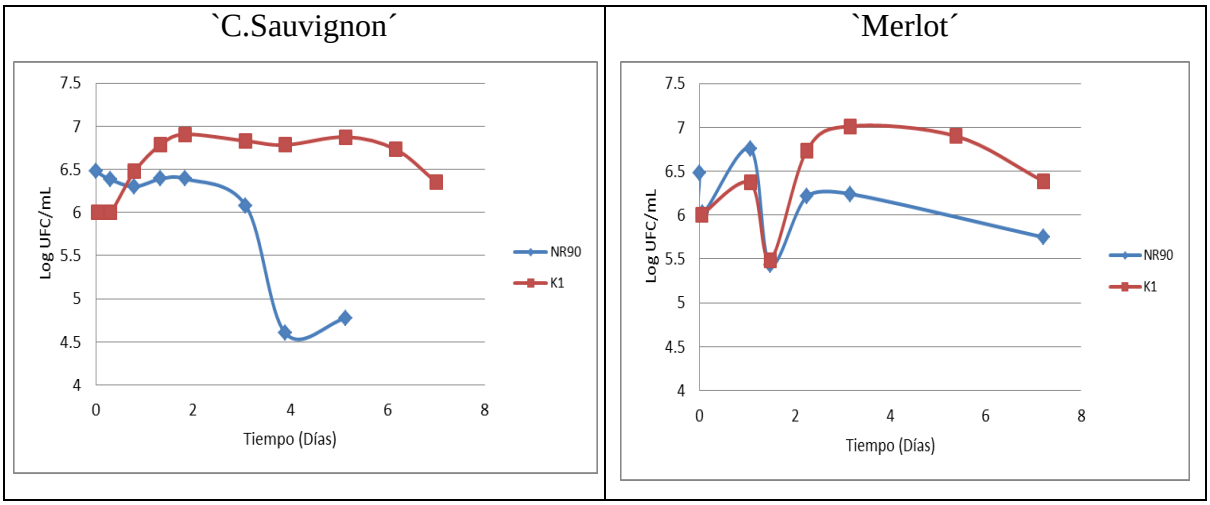


Figura 4.17 Evolución de las poblaciones de dos cepas de levaduras NR90 y K1 durante la fermentación de mosto de dos cultivares de vid 'C.Sauvignon' y 'Merlot'.

NB108 + K1

La cepa NB108 alcanzó su población máxima en `C.Sauvignon´ (4 x$10^6$ UFC/mL) antes de 2.083 días de incubación, y ya no fue detectada después de 4.16 días. Por otro lado en `Merlot` no pudo recuperar su población por encima de 2x$10^6$ UFC/mL, y fue detectada al final de la fermentación. Si comparamos el comportamiento de esta cepa con NR77, vemos que esta última había alcanzado en `C.Sauvignon´, una población máxima de 8x10^6 UFC/mL después de 1 día de incubación, mientras que en `Merlot` su población máxima fue de casi 4x10^6 UFC/mL hasta las 2 días.

Por su parte, K1 Se adaptó mejor al mosto `C.Sauvignon´ alcanzando su máxima población (8.5x$10^6$ UFC/mL) en menos de 0.83 días, mientras que para `Merlot´ se alcanzaron poblaciones superiores (1.28x10^7 UFC/mL) entre las 2.25 y 3.16 días (Figura 4.18). Nuevamente, si comparamos el comportamiento de esta levadura (K1) con la fermentación mixta de NR90, vemos que presentó poblaciones máximas entre 8x10^6 UFC/mL y 1x10^7 UFC/mL, adaptándose primero en el mosto de `C.Sauvignon´, mientras que en `Merlot´ alcanzó la máxima población aproximadamente el doble de tiempo que en el primer mosto.

Si bien *Saccharomyces cerevisiae*, es el principal agente en la fermentación alcohólica, la presencia de las levaduras no-*Saccharomyces* en el proceso es importante (10^6-10^7 células/mL) (Vazquez *et al.*, 2005).

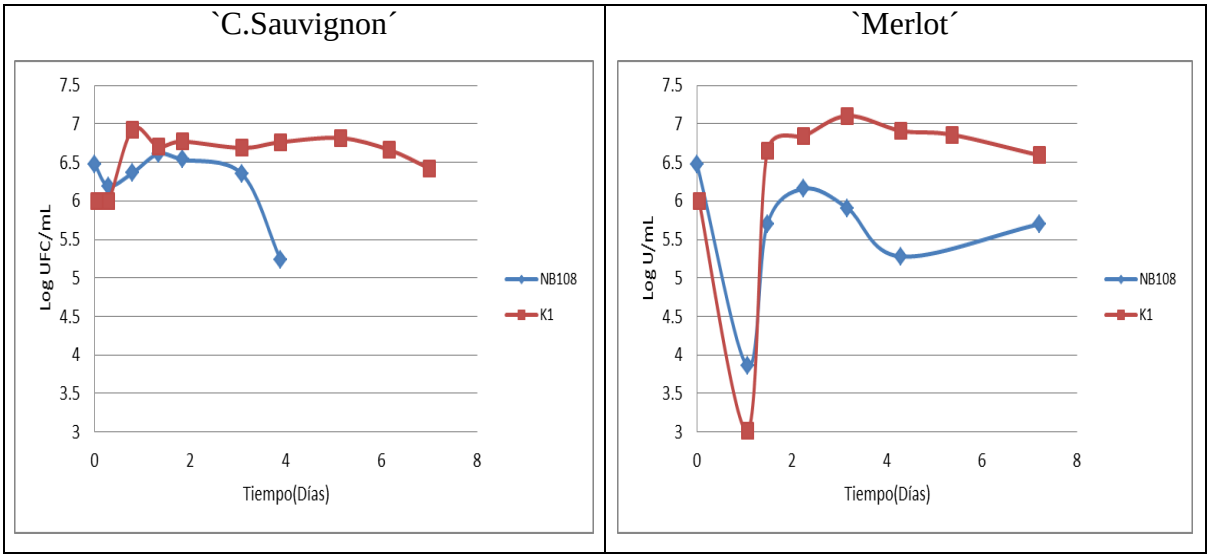


Figura 4.18 Evolución de las poblaciones de dos cepas de levaduras NB108 y K1 durante la fermentación de mosto de dos cultivares de vid ‘C.Sauvignon’ y ‘Merlot’.

Como comentarios generales respecto al comportamiento de las distintas cepas evaluadas, podemos decir que las levaduras que en los dos mostos se detectan antes de 5.21 días fueron NB1, NB27, NB31, NB39 y NR77, y solamente en `Merlot´ las cepas NR90, NB108, y NA4 (en `Merlot´). Aparentemente ninguna de las levaduras no-*Saccharomyces* interfirió en el dominio de la población de *Saccharomyces*.

4.5. Análisis físicos y químicos de los vinos

4.5.1. Grado alcohólico

El grado alcohólico es una de las características más importantes en un vino y está directamente relacionado con la capacidad de las levaduras de transformación de azúcares en etanol (García, 1993). El grado alcohólico se define como el número de litros de etanol contenido en 100 litros de vino, ambos volúmenes se miden a 20 ºC, y es expresado por el símbolo "% vol". El etanol, sus homólogos y los ésteres de ambos están comprendidos en el grado alcohólico, por encontrarse en el destilado (OIV-MA-AS312-01A;CEE, 1990).

Los valores de grado alcohólico obtenidos en los vinos producidos con las distintas cepas de levaduras aisladas fluctuaron entre 11.23 y 13.3 % vol etanol para las microvinificaciones mixtas, mientras que para la microvinificación con K1 (*Saccharomyces*) fue de 11.31% vol etanol, sin haber diferencias estadísticas entre ellos (Tabla 4.4). Resultados similares a los que muestra Jolly *et al*. (2003) al realizar microvinificaciones de inóculos mixtos (*Saccharomyces* + no-*Saccharomyces*). Flores (2000), en un trabajo donde se evaluaron dos métodos de vinificación en tinto (tradicional y maceración carbónica) utilizando la variedad de vid `Ruby Cabernet´ y las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* K1 (utilizada en el presente estudio) y la 71-B, muestra que la levadura no tuvo efecto sobre el porcentaje de alcohol, encontró valores de 12.49 y 12.53 % vol etanol respectivamente. Por su parte, García- Junco (2001) evaluó diversos procesos de vinificación con las variedades de vid `Ruby Cabernet´, `Malbec´ y `C.Sauvignon´ obteniendo valores de etanol 10.39, 10.88, 10.37 GL respectivamente. Finalmente, De la Cruz *et al*. (2012) elaboraron vinos tintos de `C.Sauvignon´y `Merlot´ proveniente de los mismos tres viñedos estudiados en el presente trabajo, obteniendo como resultado un grado alcohólico para `C.Sauvignon´ de 9.13 % vol etanol y para `Merlot´ de 11.72

%vol etanol, en este estudio se obtuvo un valor similar para la `Merlot´(11.91 % vol etanol) y diferente para `C.Sauvignon´(12.08 % vol etanol).

Tabla 4.4. Porcentaje de etanol en vinos de dos cultivares obtenidos con ocho cepas de levaduras no-*Saccharomyces* en inóculos mixtos con la levadura K1

Levadura	**CS**	**M**	**Promedio % Etanol**	**Desviación Estándar**
NA4 + K1	13.7	13	13.37ª	0.466
NR90+ K1	8.62	13.84	11.23ª	3.691
NB108+ K1	14.16	12.96	13.56ª	0.848
NB1+ K1	11.87	9.61	10.74ª	1.598
NB27+ K1	13.6	9.13	11.365ª	3.160
NB31+ K1	9.76	13.35	11.6ª	2.538
NB39+ K1	13.46	9.32	11.39ª	2.927
NR77+ K1	13	13.29	13.375ª	0.120
K1	9.91	12.71	11.31ª	1.979
Variedad Promedio	12.0ª	11.9ª	11.99	0.799
$CV_{Variedad}$	0.59 %		$CV_{Levaduras}$	9.25%
DMS	0.97		HSD	2.82
Valor F	0.007		Valor F	0.39

Promedios obtenidos de dos observaciones para levaduras y de ocho para variedades observaciones individuales. Medias seguidas de letras distintas denotan diferencias de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).
CS: Microvinificación en `C.Sauvignon´; M: Microvinificación en `Merlot´

En el presente estudio, el grado alcóholico potencial fue de 12.6 % vol etanol (Calculado a partir de la concentración de azúcares inicial y la conversión de esta a etanol por K1, dato proporcionado en la ficha K1 en la sección 3.2.2) comparando con el obtenido por la fermentación únicamente realizada por K1 (11.31 %) fue en promedio el valor fue una unidad más bajo. En general se obtuvieron valores más bajos que el grado alcohólico potencial para las fermentaciones de nS + S, excepto en el caso de la fermentación mixta con NA4 (13.37 %), NR77 (13.37 %), NB108 (13.57 %) que fue aproximadamente un grado mayor. La ausencia de diferencias puede deberse al error experimental, ya que nos encontramos con coeficientes de variación relativamente elevados, posiblemente debidos al reducido número de repeticiones

utilizado (dos). Será necesario efectuar pruebas con mayores tamaños de muestras y mayor número de repeticiones.

La ausencia de diferencias en el grado alcohólico de los vinos, en el caso de que ésta se confirme con estudios ulteriores, muestra que ninguna de las levaduras no-*Saccharomyces* compite por azúcares con la cepa de referencia y, por lo tanto, interfiere con la fermentación alcohólica.

Finalmente, la variedad de vid no tuvo efecto estadísticamente significativo sobre el grado alcohólico (T-Student $p \leq 0.05$).

4.5.2. Acidez total titulable y pH

Los ácidos orgánicos más frecuentemente encontrados en el vino son el tartárico, el málico y el láctico. Los dos primeros proceden de la uva y el último de la fermentación maloláctica de los vinos. Otros ácidos orgánicos presentes en el vino son el cítrico, acético, glucónico, ascórbico, succínico, entre otros (Blouin y Guimberteau, 2000) En vinos tintos de alta calidad la acidez total titulable va de 6 a 8g/L ácido tartárico y, para vinos blancos, de 7 a 9 g/L de ácido tartárico (Sowalsky y Noble, 1998).

Cuando un vino, especialmente un tinto, presenta una acidez total muy elevada, resulta molesto al gusto, en cambio cuando es insuficientemente ácido es frágil, de color mate y de sabor pastoso. El sabor ácido que se percibe viene condicionado por la abundancia de protones, es decir por la acidez real o pH. En un vino, los únicos ácidos que pueden tener una acción sobre el pH son los ácidos tartárico, málico y láctico. El ácido tartárico juega el papel más importante, pues es el que libera más protones (iones H^+), por lo que tiene una mayor influencia en los cambios de pH. Pero es necesario tener en cuenta los iones potasio y calcio que forman con el ácido tartárico el tartrato ácido de potasio y el tartrato de calcio. La solubilidad de estas sales es función de la concentración del ácido málico y en menor medida del ácido láctico (Flanzy, 2003).

El pH de un vino es una función creciente de la relación tartrato ácido de potasio/ ácido tartárico, es decir, que el pH de un vino depende de la neutralización del ácido tartárico. El pH de los mostos puede variar entre 2.8 y 3.8, según regiones vitícolas y según las condiciones de maduración, en este rango las levaduras responsables de la transformación de los azúcares en alcohol se desarrollan bien aunque para la mayoría de las levaduras el desarrollo máximo se sitúa en pH superiores (Flanzy, 2003).

En los mostos y en los vinos, el pH varía dependiendo de las condiciones de maduración de las uvas, que determinan la concentración de ácidos orgánicos al momento de la cosecha, del varietal de uva, de las prácticas enológicas, de la presencia y metabolismo de microorganismos, de la temperatura de fermentación y guarda (Fanzone, 2012).

Recordemos que el pH del mosto utilizado en este trabajo fue ajustado a 3.5 antes de ser inoculado (el pH antes de ajuste fue de 3.68 para `C. Sauvignon´ y 3.6 para `Merlot´), utilizando ácido tartárico, tanto para el mosto de `C. Sauvignon´ como para `Merlot´. La acidez total titulable del mosto de `C. Sauvignon´ fue de 7.98 g/L ácido tartárico y de `Merlot´ 7.83 g/L ácido tartárico (Tabla 4.6).

Los valores de pH de las diferentes microvinificaciones (nS+K1 yK1) variaron de 3.4 a 3.5 y se encuentran dentro del rango normal para mostos y vinos sin que haya diferencias entre éstos, lo que muestra que las levaduras nS en cultivos mixtos no ejercen un efecto sobre el pH del vino. Comitini (2011) señala que el comportamiento del pH y acidez total titulable de fermentaciones con inoculo mixto pueden ser comparables a las fermentaciones donde se inoculó únicamente *Saccharomyces*, esto depende de la cepa de levadura.

En este estudio se obtuvieron valores similares para pH (`C.Sauvignon´: 3.47 y `Merlot´: 3.44) a los reportados por De la Cruz y colaboradores en el 2012, así como para acidez total para Merlot (6.72 g/L ácido tartárico) mientras que para C.Sauvignon fue de 7.048 g/L ácido tartárico.

Por otro lado, los valores de acidez total titulable de las microvinificaciones fueron menores al inicial (7.83 ±0.2 g/L de ácido tartárico). Habiendo fluctuado en promedio entre 6.3 a 7.48 g/L de ácido tartárico para las distintas levaduras (Tabla 4.5), sin haber diferencias entre ellos Sin embargo si hubo diferencia estadísticamente significativa entre vinificación por variedad de vid (Tabla 4.6) con la que se elaboró el mosto para vinificar (`C.Sauvignon´ y `Merlot`), esto se debe a que la acidez total está dada por la composición de cada variedad. Estos valores se encuentran dentro del rango aceptable para vinos (3 a 9 g/L ácido tartárico). Las levaduras no tuvieron efecto sobre la acidez.

Tabla 4.5 Grado alcohólico, acidez total titulable y pH de vinos obtenidos mediante fermentación con ocho levaduras nS en cultivo mixto con K1, con variedades de vino confundidas

Levadura	Grado alcohólico	ATT	pH
NB108+ K1	13.56 a	6.61 a	3.45 a
NR77+ K1	13.38 a	7.14 a	3.46 a
NA4+ K1	13.37 a	6.70[a]	3.44a
NB31+ K1	11.6 a	7.30 a	3.46 a
NB39+ K1	11.39 a	6.75 a	3.52 a
NB27+ K1	11.37 a	7.48 a	3.47 a
K1	11.31 a	6.89 a	3.35 a
NR90+ K1	11.23 a	6.34 a	3.51 a
NB1+ K1	10.74 a	6.79 a	3.43 a
$CV_{Levaduras}$	9.25%	7.13%	1.5%
HSD	2.82	1.14	0.165
Valor F	0.39	3.27	2.1

Medias provenientes de 8 observaciones (variedades). Letras distintas denotas diferencias significativas de acuerdo a Tukey ($P \leq 0.05$)

Flores (2000) reporta valores de acidez total para vinificaciones utilizando K1 de 7.82 g/L de ácido tartárico. García Junco (2001), por su parte, muestra valores de acidez total para las respectivas variedades de Ruby Cabernet 6.57 g/L ácido tartárico, Malbec (6.57 g/L ácido tartárico), y C.Sauvignon (5.3 g/L ácido tartárico).

Tabla 4.6. Grado alcohólico, acidez total titulable (ATT) y pH de vinos elaborados con dos variedades, con el efecto de la levadura confundido

Variedades	**Grado alcohólico**	**ATT**	**pH**
C.Sauvignon	12.00 a	7.05 a	3.46 a
Merlot	11.91 a	6.72 b	3.44 a
$CV_{Variedad}$	0.59%	2.3%	6.8%
DMS	0.97	0.13	0.027
Valor F	0.007	5.82	1.6

Medias provenientes de dos observaciones (Levaduras). Letras distintas denotas diferencias significativas de acuerdo a T-Student($p \leq 0.05$).

4.5.3. Acidez volátil

La acidez volátil (AV) es derivada del conjunto de ácidos grasos de la serie acética presentes en estado libre y combinados. Éstos son producto de la fermentación alcohólica y principalmente acética que causan serios defectos en el vino si existen en una concentración elevada, además de que su presencia es el principal indicador de la sanidad de un vino (OIV OENO 370-2012).

Para potenciar la maceración, las temperaturas de fermentación utilizadas suelen ser mayores para los vinos tintos que para los vinos blancos (25 a 32 ºC). La producción de acidez volátil es directamente proporcional a la temperatura de fermentación. Las cualidades sensoriales de los vinos tintos pueden mejorarse con levaduras capaces de fermentar a estos rangos de temperatura y que presentan una baja producción de acidez volátil. La acidez volátil se expresa como g/l de ácido acético y el límite máximo señalado por la OIV es 1.2 g/L para vinos (OIV MA-C1-01:R2011). Es conveniente que la acidez volátil sea lo más baja posible, ya que por lo contrario proveería de sabor agrio indeseable (Aleixandre, 2006).

Todas las microvinificaciones realizadas obtuvieron valores de AV (Tabla 4.7) inferiores al límite máximo permitido fluctuando entre 0.1 a 0.21 g/L de ácido acético. Además, éstos se encuentran por debajo de 0.5g/L de ácido acético nivel deseable para no exceder en vinos por levaduras para selección (Saccharmyces y no-*Sacharomyces*) tomando en cuenta que la microvinificación con K1 (*Saccharomyces cerevisiae*) únicamente tuvo un valor de 0.155 g/L y que no hubo diferencias entre levaduras, se concluye que el uso de ninguna de éstas incrementa los niveles de ácido acético en el vino. El valor de K1 para acidez volátil fue similar (0.16 g/L ácido acético) al obtenido por Flores en el 2000 utilizando esta misma levadura en vinificación en tintos.

Jolly (2003) reporta valores similares de acidez volátil a los obtenidos en este estudio al utilizar cultivos mixtos de *Candida Colliculosa/Saccharomyces. Cerevisiae, Candida Stellata/Saccharomyces cerevisiae, Kloeckera apiculata/ Saccharomyces cerevisiae*. Por el contrario, Comitini (2011) consigna valores de acidez volátil superiores en cultivos mixtos de *Candida zemplinina*, *Tolrulaspora delbrueckii*, *Metschnicowia pulquerrima*, también en la fermentación con únicamente *Saccharomyces cerevisiae* (de 0.33 a 0.52g/L de ácido acético).

Tabla 4.7 Acidez volátil titulable expresada en ácido acético g/L, de vinos de dos cultivares obtenidos con ocho cepas de levaduras no-*Saccharomyces* en cultivo mixto con la cepa K1 de *Saccharomyces*

Levaduras	CS	M	Ácido acético g /L	Desviación Estándar
NA4+ K1	0.329	0.091	0.210[a]	0.17
NR90+ K1	0.146	0.18	0.164[a]	0.03
NB108+ K1	0.146	0.164	0.155[a]	0.01
NB1+ K1	0.146	0.109	0.128[a]	0.03
NB27+ K1	0.109	0.128	0.118[a]	0.01
NB31+ K1	0.146	0.109	0.128[a]	0.03
NB39+ K1	0.109	0.109	0.109[a]	0.00
NR77+ K1	0.109	0.091	0.100[a]	0.01
K1	0.329	0.091	0.155[a]	0.01
Variedad	0.156[a]	0.126[a]		0.192
CVvariedades	62.073%		CVLevaduras	46.48%
DMS	0.027		HSD	0.058
Valor FVariedad	1.25		Valor F Levadura	0.68

Promedios obtenidos de dos observaciones para levaduras y de ocho observaciones individuales para variedades. Medias seguidas de letras distintas denotan diferencias de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).
CS: Microvinificación en `C.Sauvignon´; M: Microvinificación en `Merlot´

4.5.4. Azúcares residuales

Los azúcares reductores están constituidos por el conjunto de los azúcares con función cetónica o aldehídica determinados por su acción reductora sobre la solución cupro-alcalina (Madrid *et al*., 2003).

No hubo diferencia significativa entre la concentración de azúcares residualres de los vinos obtenidas de las microvinificaciones realizadas tanto mixtas como con *Saccharomyces* y tampoco por parte de la variedad con la que se realizó la microvinificación Los valores promedio obtenidos para las distintas levaduras fluctuaron entre 2.4 y 3.37 (Tabla 4.8).

Tabla 4.8. Azúcares residuales g/L de vinos obtenidos con uva de dos cultivares obtenidos con ocho cepas de levaduras no-*Saccharomyces* cada una de ellas inoculada con la cepa K1 de *Saccharomyces*

Levaduras	CS	M	PROMEDIO g/L	Desviación Estándar
NA4+ K1	2.588	3.1670	2.877 a	0.408
NR90+ K1	2.593	3.416	3.004 a	0.582
NB108+ K1	2.593	3.467	3.030 a	0.618
NB1+ K1	2.512	2.703	2.608 a	0.134
NB27+ K1	2.683	2.212	2.447 a	0.333
NB31+ K1	2.425	2.979	2.702 a	0.391
NB39+ K1	3.526	3.208	3.367 a	0.224
NR77+ K1	3.631	3.126	3.379 a	0.357
K1	2.5	3.139	2.819 a	0.452
Variedad	2.858 a	3.046 a		0.127
$CV_{Variedad}$	4.5%		$CV_{Levadura}$	10.91%
DMS	0.18		HSD	0.38
Valor $F_{Variedad}$	1.1		Valor $F_{Levadura}$	1.4

Promedios obtenidos de dos observaciones para levaduras y de ocho para variedades observaciones individuales. Medias seguidas de letras distintas denotan diferencias de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).
CS: Microvinificación en `C.Sauvignon´; M: Microvinificación en `Merlot´

De acuerdo con la OIV-MA-AS311-01A los vinos que se obtuvieron de la fermentación mixta se denominarían vinos secos ya que muestran concentraciones menores de 5 g/L de contenido de azúcar.

Este resultado nos indica que el añadir levadura no-*Saccharamyces* seleccionadas en este estudio no interfiere con el proceso de fermentación de *Saccharomyces*, este caso, con relación a los azúcares residuales. Flores (2000) obtuvo valores de azúcar residual para vinificaciones en tinto con la levadura K1 de 2.08 g/L.

4.5.5. Anhídrido sulfuroso

El anhídrido sulfuroso que se encuentra en el vino proviene de dos fuentes, la primera y la más importante es el añadido durante el proceso de vinificación y la segunda que puede ser

muy significativa es por la actividad de las levaduras. El SO_2 es un intermediario en la ruta de reducción enzimática de los sulfatos presentes en el mosto para formar H_2S, que puede ser utilizado por las levaduras para sintetizar compuestos orgánicos y en algunas levaduras este SO_2 intermediario se acumula originando niveles muy altos en los vinos. La producción de SO_2 depende genéticamente de la levadura y es afectada por las condiciones en vinificación como la composición de los mostos, concentración de sulfatos, glucosa, ácido pantoténico, dióxido de azufre, temperatura (Regodón,1997).

Los resultados obtenidos muestran que no existe efecto estadísticamente significativo por parte de la levadura ni la variedad de vid empleada sobre la microvinificación(Tabla 4.9).

Tabla 4.9. Anhídrido sulfuroso libre y total en mg/L de vinos de dos cultivares obtenidos con ocho cepas de levaduras no-*Saccharomyces* cada una de ellas inoculada con la cepa K1 de *Saccharomyces*

Levaduras	SO_2 libres (mg/L)	Desviación estándar	SO_2 totales (mg/L)	Desviación estándar
NA4+ K1	62.4 a	2.3	201.6 a	4.5
NR90+ K1	68.8 a	6.8	200 a	20.4
NB108+ K1	91.2 a	47.5	233.6 a	54.3
NB1+ K1	56 a	2.3	195.2 a	31.7
NB27+ K1	60.8 a	4.5	184 a	15.8
NB31+ K1	65.6 a	11.3	210.4 a	12.5
NB39+ K1	60.8 a	9.1	185.6 a	22.6
NR77+ K1	65.6 a	2.3	208 a	22.6
K1	72 a	2.3	260.8 a	11.3
Variedades				
CS	72.18 a	5.4	209.6 a	9.1
M	61.87 a	5.4	208 a	9.1

$CV_{Variedad}$	7.7%	$CV_{Levaduras}$	15.3%	$CV_{Variedad}$	0.4%	$CV_{Levaduras}$	11.7%
DMS	10.3	HSD	35.2	DMS	1.6	HSD	76.8
Valor F $_{Variedad}$	1.84	Valor F $_{Levadura}$	0.80	Valor F $_{Variedad}$	0.015	Valor$F_{Levadura}$	1.61

Promedios obtenidos de dos observaciones para levaduras y de ocho para variedades observaciones individuales. Medias seguidas de letras distintas denotan diferencias de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). CS: Microvinificación en `C.Sauvignon´; M: Microvinificación en `Merlot´

Los valores obtenidos para levaduras van de 56 a 91 mg/L SO_2 Libres y de 184 a 260 mg/L SO_2 Totales. Y por variedad de mosto 72 y 62 mg/L SO_2 (±5.37) Libres y 209.6 y 208 mg/L SO_2 Total respectivamente para `C.Sauvignon´ y `Merlot´ (Tabla 4.9).

El límite de tolerancia a anhídrido sulfuroso total según la OIV es de 250 g/L. Los valores obtenidos en el presente estudio se encuentran por debajo de estos límites legales, por lo cual las levaduras no presentan problemas para ser usadas en forma de inóculos mixtos. Jolly (2003), en un mosto con condiciones similares obtuvo para *S. cerevisiae* 26 mg/L, y para microvinificaciones mixtas con levaduras del género *Candida* y *Kloeckera* fue en promedio de 28 mg/L de anhídrido sulfuroso total.

4.5.6. Glicerol

El glicerol contribuye a la suavidad y viscosidad del vino, y débilmente al sabor dulce y a la diminución de la sensación del gusto amargo del vino. En las concentraciones en que normalmente se encuentra en los vinos (1 a 10 g/l), la cantidad necesaria para producir un incremento detectable en la suavidad es de unos 5.2 g/L. El glicerol es un producto mayoritario originado por las levaduras durante la fermentación después de etanol y el anhídrido carbónico (Regodón, 1997).

El glicerol se forma directamente a partir de los hidratos de carbono, por acción de las levaduras en los primeros momentos de la fermentación alcohólica, cuando empieza a desaparecer del azúcar. Más de la mitad del glicerol de un vino es producido con la fermentación de los primeros 5 g de azúcar (Lozano y Muñoz, 1988). Esto se debe a que las levaduras dejan de respirar al consumirse el oxígeno disuelto en el mosto, pero siguen viviendo gracias a la metabolización de las hexosas cuya fermentación son capaces de realizar. Su formación juega un importante papel en el mantenimiento del equilibrio rédox en la célula. En ocasiones, es producido como respuesta al estrés osmótico, pudiendo ser estimulada su producción en presencia de altas concentraciones iniciales de azúcar (Maiorella *et al*., 1984)

La microvinificación con la levadura N39 obtuvo mayores valores de glicerol (7.45 g/L) que con el resto de las microvinificaciones mixtas y únicamente con *Saccharomyces* que fue de 5.39 a 6.5g/L (Tabla 4.10). Se obtuvieron valores similares a los que Jolly (2003) obtuvo valores

similares para las fermentaciones mixtas (6.89-7.94 g/L de glicerol) excepto para la fermentación realizada únicamente con la levadura *Saccharomyces* encontrando 8.53 g/L de glicerol.

Tabla 4.10 Contenido de glicerol en vinos de dos cultivares obtenidos con ocho cepas de levaduras no-*Saccharomyces* cada una de ellas inoculada con la cepa K1 de *Saccharomyces*

Levaduras	CS	M	PROMEDIO g/L	Desviación Estándar
NA4+ K1	5.79	5.71	5.75 b	0.05
NR90+ K1	5.65	5.74	5.70 b	0.06
NB108+ K1	5.58	6.22	5.90 b	0.44
NB1+ K1	5.24	5.54	5.39 b	0.21
NB27+ K1	5.66	5.60	5.63 b	0.04
NB31+ K1	6.07	5.53	5.80 b	0.38
NB39+ K1	7.59	7.31	7.45 a	0.19
NR77+ K1	6.15	6.82	6.49 ab	0.46
K1	6.27	6.74	6.50 ab	0.33
Variedad	5.99[a]	6.13[a]		0.097
CVvariedad	1.2 %		CVlevadruras	10.53 %
DMS	0.13		HSD	0.94
Valor FVariedad	0.93		Valor F Levaduras	9.44

Promedios obtenidos de dos observaciones para levaduras y de ocho para variedades observaciones individuales. Medias seguidas de letras distintas denotan diferencias de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).
CS: Microvinificación en `C.Sauvignon´; M: Microvinificación en `Merlot´

4.6. Identificación de las levaduras seleccionadas

Las ocho cepas de levadura se identificaron mediante la amplificación del dominio D1/D2 del gen que codifica para la subunidad 26S del ARNr empleando las condiciones propuestas por Maomura *et al*. (2005). Se emplearon los oligos universales NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') y NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') que amplifican un fragmento de 608 pb el cual fué secuenciado en la "Unidad de Síntesis y Secuenciación" del Instituto de Biotecnología, UNAM. Las secuencias obtenidas se introdujeron

en el banco de datos mediante el programa Blast (Blast http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) para buscar homología con secuencias de levaduras reportadas.

Todas las levaduras resultaron ser del genero *Hanseniaspora*. Las cepas NB39 y NB31, tuvieron mayor homología a la cepa JNFSL-2 reportada en NCBI (Tabla 4.11). Por otro lado NB108, NR77, NR27 tuvieron mayor homología con la cepa M8. Finalmente, NR90 tuvo mayor porcentaje de identidad con KKUY 009, NA4 con MB208 y NB1 con JJZ3 (Tabla 4.11).

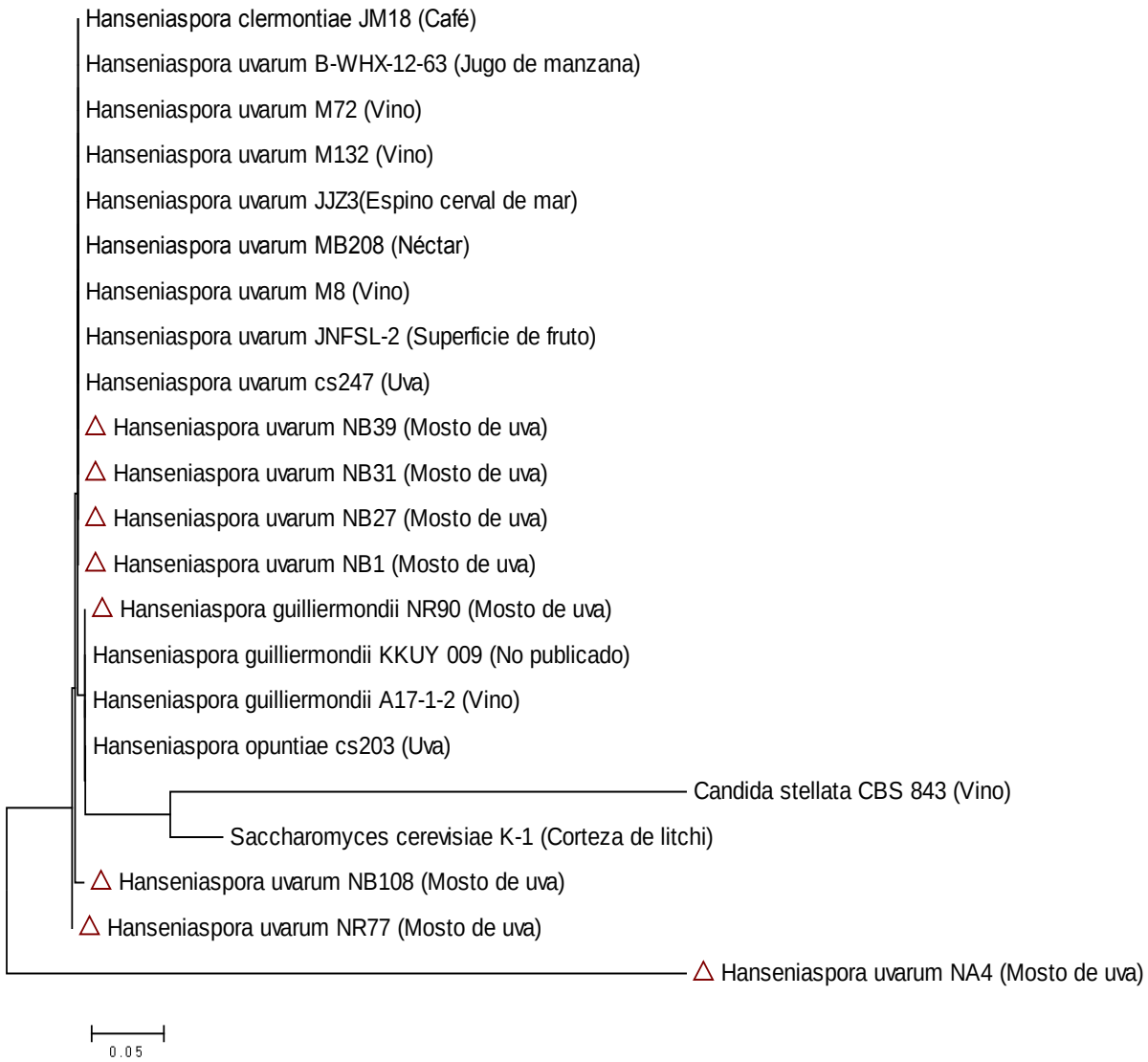
Tabla 4.11 Levaduras seleccionadas y su similitud con secuencias del BLAST

Cepa	Cobertura de consulta	Valor E	Identidad	Nombre de Acceso de la secuencia con máxima homología
NB39	99	0	99	*Hanseniaspora uvarum strain JNFSL-2 26S ribosomal RNA gene, partial sequence*
NR90	97	0	95	*Hanseniaspora guilliermondii strain KKUY 009 26S ribosomal RNA gene, partial sequence*
NB108	99	0	98	*Hanseniaspora uvarum strain M8 26S ribosomal RNA gene, partial sequence*
NB31	99	0	98	*Hanseniaspora uvarum strain JNFSL-2 26S ribosomal RNA gene, partial sequence*
NA4	84	1x10-142	92	*Hanseniaspora uvarum strain MB208 26S ribosomal RNA gene, partial sequence*
NR77	99	0	98	*Hanseniaspora uvarum strain M8 26S ribosomal RNA gene, partial sequence*
NB27	99	0	99	*Hanseniaspora uvarum strain M8 26S ribosomal RNA gene, partial sequence*
NB1	88	0	97	*Hanseniaspora uvarum strain JJZ3 26S ribosomal RNA gene, partial sequence*

El género *Hanseniaspora* se caracteriza en términos generales por ser capaz de fermentar en mosto de uva hasta un máximo de 5 % de alcohol, por lo que se considera sensible a este compuesto, lo que explica el comportamiento de las cepas aisladas en fermentación. *Hanseniaspora guillermondii* se ha reportado como productora de bajas cantidades de alcoholes superiores y se caracteriza por mostrar una gran variabilidad en la producción de ácido acético. Se sabe que producen más altas concentraciones de ésteres y glicerol que *Saccharomyces* (Zironi, 1993).

Las secuencias obtenidas, junto con secuencias de levaduras que presentaron la más alta homología reportadas en el banco de datos, fueron alineadas de manera múltiple utilizando el método ClustalW del programa Bioedit 7.2. Dicho alineamiento fue importado al programa Mega 4.0 para la construcción del árbol filogenético, utilizando el método neighbor joining (NJ), y el modelo de evolución Jukes-Cantor (Criminger *et al*., 2007) (Figura 4.19).

Figura 4.19. Dendrograma de las ocho levaduras seleccionadas y las secuencias similares en el BLAST con su respectivo origen de aislamiento



En el análisis de conglomerados, cuando se advierte que las levaduras aisladas con una unión de distancia cero muestra patrones idénticos y se puede considerar que pertenecen a la misma especie (Vezinhet *et al.*, 1992; Fernández *et al.*, 2000).

Hay dos grupos de especies a las que pertenecen las levaduras en estudio, y es *Hanseniaspora guillermondi* donde se encuentra NR90 y *Hanseniaspora uvarum* correspondiente al resto de las levaduras analizadas (Figura 4.19).

La cepa NA4, si bien se encuentra situada dentro de la clasificación de *Hanseniaspora uvarum* se aleja del resto de la población de levaduras aisladas en Querétaro debido a su bajo porcentaje de identidad y su valor E diferente de cero (Figura 4.19).

V. CONCLUSIONES

Maduración del fruto

- La variedad de vid que alcanzó mayor grado de madurez en los distintos viñedos estudiados dentro del estado de Querétaro fue `Merlot´.
- En la región en que se obtuvo mayor concentración de azúcares de la uva en madurez, considerando las dos variedades fue en el municipio de Ezequiel Montes, representado por 'Viñedos Azteca'.

Diferenciación de levaduras

- De 197 levaduras aisladas de uvas provenientes de mosto de uva de los tres viñedos queretanos 74 % correspondió a no-*Saccharomyces.*
- De las 146 cepas de levaduras diferenciadas como no-*Saccharomyces* 90 cepas resultaron β glucosidasa positivas, característica que favorece para la liberación de los aromas en el vino.

Tolerancia a etanol y SO_2

- Las 90 cepas de levaduras nS β glucosidasa positivas fueron evaluadas en el analizador turbidimétrico Bioscreen C resultaron sensibles a etanol 6 %, al mostrar todas ellas un tiempo de detección superior a 18 h. Sólo ocho (9 %) de las 90 levaduras mostraron tolerancia a dióxido de azufre (SO_2), con tiempos de detección en presencia de este compuesto (30 mg/L SO_2 total) menores de 12.37 h, motivo por el cual fueron retenidas para las pruebas ulteriores.

Ensayos de microvinificación

- Las fermentaciones llevadas a cabo con cultivos mixtos (nS + K1), así como las llevadas a cabo con la cepa de *Saccharomyces* (K1) tuvieron una duración de siete días resultando completamente terminadas.
- Siete de las ocho levaduras sometidas a ensayos de microvinificación en presencia de la cepa de referencia *Saccharomyces* mostraron una permanencia en el medio fermentativo inferior a cuatro días (al menos en uno de los por variedad), mientras NR90 resultó la más persistente, al estar presente hasta el final de la fermentación en los mostos de las dos variedades (`C. Sauvignon´ y `Merlot´).
- No se obtuvieron diferencias para pH, sólidos solubles totales, acidez total titulable, acidez volátil azúcares residuales, porcentaje de alcohol, anhídrido sulfuroso total y libre entre los vinos producidos con ninguna de las ocho cepas de no-*Saccharomyces* en presencia de la cepa de referencia K1, ni al compararlos con los obtenidos en fermentaciones con sólo la cepa de referencia de *Saccharomyces*. Las cifras obtenidas para estas variables pueden considerarse normales para vinos tintos de mesa.
- Los valores de acidez volátil obtenidos con los distintos vinos producidos con las ocho levaduras seleccionadas se encontraron por debajo de los límites legales de la U.E. y los requeridos para selección de levaduras nS con fines enológicos.
- La cepa NB39 obtuvo una concentración de glicerol en el vino superior a las de las otras levaduras y fue mayor de 12.75 % a un 27.60 %.
- No se obtuvieron diferencias en grado alcohólico, pH, acidez volátil, azúcares residuales, anhídrido sulfuroso libre y total y glicerol entre las variedades evaluadas(`C. Sauvignon´ que en `Merlot´.).
- La acidez total titulable fue superior en `C. Sauvignon´ que en `Merlot´.

Identificación de las cepas de levaduras

- Las pruebas de identificación de las levaduras por PCR mostraron que las ocho levaduras seleccionadas resultaron del género *Hanseniaspora*; NR90 resultó *H. guillermondi* y el resto *H. uvarum*.

Recomendaciones para futuros trabajos de investigación

- Realizar mayor número de repeticiones, ya que en esta tesis no se hicieron más repeticiones debido a la falta de material experimental.
- Realizar estudios utilizando espectrometría de masas, para evaluar el perfil aromático de los vinos producidos con las cepas de levaduras nS.
- Evaluar las levaduras seleccionadas en este estudio para producción de vino blanco
- Evaluar el potencial enológico de las levaduras β-glucosidasa (-) obtenidas en este estudio.
- Evaluaciones sensoriales con jueces entrenados.

VI . BIBLIOGRAFÍA CITADA

Aleixandre J.L. 2006. La cultura del vino. Cata y degustación. Editorial Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España 345 p.

Aldrete J.A. Caracterización de las comunidades microbianas presents en quésos mexicanos de corta maduración elaborados artesanalmente. 2013. .Para obtener el grado de Maestro En Ciencia y Tecnología De Alimentos, Universidad Autónoma De Querétaro. Querétaro México. 43 p

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology 215(3): 403-410.

André V. 2008. Aprenda a conocer los vinos. Editorial Robinbook. Barcelona España. 256 p.

Aquilué, M. P. S., Sevilla, M. J., Viguera, A. R. G., & Martín, R. L. 1995. Selección de levaduras vínicas en la Denominación de origen calificada Rioja. Zubia 7: 103-111.

Arévalos M. 2006. Estudio de la actividad β-glucosidásica en levaduras vínicas y su aplicación en enología.Ediciones de la universidad de Castilla-La Mancha. Cuenca, España.146 p.

Arévalo M;. Úbeda J.F., Cordero RR and Briones AI. .2005. Optimization of a rapid method for studyng the celular location of β glucosidase activity in wine yeasts. Journal of applied microbiology . 99(3): 558-564.

Blouin J. y Guimbertrau G. 2002. Maduración y madurez de la uva. Editorial Mudi-Prensa. Madrid, España.151 p.

Blouin J. y Peynaud É. 2003. Enología práctica conocimiento y elaboración del vino. 4ª Edición. Editorial Mundi-prensa. Madrid España. 353 p.

BOE.2003 NÚMERO 165/2003LEY 24/2003, De 10 De Julio, De La Viña Y Del Vino. Internet: http://www.boe.es/boe/dias/2003/07/11/pdfs/A27165-27179.pdf. Fecha de consulta: 2 de junio de 2012.

Carrau F. 2005. Levaduras nativas para enología de mínima intervención. Biodiversidad, selección y caracterización. Agrociencia 9: 387-399

CEE, Comunidad Económica Europea.1990. Analyses des Mouts et des Vins.Office des Publications Officielles des Communautés Européennes.Paris,France. 190p.

Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., & Ciani, M.2011. Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with Saccharomyces cerevisiae. Food microbiology, 28(5), 873-882.

Contreras C. y Ortega I.2005. Bebidas y regiones. Historia e impacto de la cultura etílica en México. Editorial Plaza y Valdés. DF, México. 200 p.

Criminger J.D., Hazen T.H., Sobecky P.A. and Lovell C. R. 2007. Nitrogen fixation by Vibrio parahaemolyticus and its implications for a new ecological niche. Applied and Environmental Microbiology. 73: 5959-5961

De la Cruz M.A., Martínez R.A., Becerril E., Chávaro M. del S. 2012.Caracterización de vinos tintos producidos en querétaro. Revista Fitotecnia Mexicana (Núm. Especial 5).35:61-67

De la Rosa T. 1997. Tecnología de Los Vinos Blancos. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España. 531 p.

Duhart F. y Corona S. 2010.Vinos de America y de Europa. Editorial Le Manuscrit. Paris, Francia. 356p.

Erten ,H.2002. Relation between elevated temperaturas and fermentation behaviour on *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* associated with winemaking in mixed cultures. World Journal of Microbiology and Biotechnology . 59: 29-36

Escalante, W. E., Rychtera, M., Melzoch, K., Polo, E. Q., y Sakoda, B. H. 2011.
Estudio de la actividad fermentativa de Hansenula anomala y producción de compuestos químicos de importancia sensorial. Revista peruana de Biología 18(3): 325-334.

España F. 2004. El vino, conózcalo y disfrútelo. Editorial Norma. Bogotá Colombia. 188 p.

Fanzone M. 2012. Caracterización de la composición fenólica de uvas y vinos de la variedad `Malbec´ (*vitis vinifera* L.): su relación con el origen geográfico, factores vitivinicolas y valor comercial .Tesis doctoral Departament de Bioquímica i Biotecnologia Facultat d'Enologia .Tarragona, España. p:35

Fernández, M., Úbeda, J.F. and Briones, A.I. 2000.Typing of non-*Saccharomyces* yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making. International Journal of Food Microbiology. 59:29–36.

Fischer U., Strasser M. and Gutzler K. 2000. Impact of fermentation technology on phenolic and volatile composition of German red wine. International Journal of Food Science and Technology 35: 81-94.

Flanzy C. 2003. Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos. Editorial Mudi-prensa. Madrid España. 797 p.

Fleet, GH and Heard GM. 1992. Yeasts-growth during fermentation.In: Wine Microbiology and Biotechnology. Editorial Harwood Academic Publishers, Camberwerll. Chur, Switzerland. 510p

Flores N. 2000. Evaluación de la fermentación maloláctica inducida en vinos tintos del cv Ruby Cabernet, obtenidos por dos métodos de vinificación y dos cepas de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). Para obtener el grado de Maestro En Ciencia y Tecnología De Alimentos, Universidad Autónoma De Querétaro. Querétaro México. 67-113 pp.

Gallego JF. 2011.Servicio de vinos. Editorial Paraninfo. Madrid, España. 328 p.

García-Junco C. 2001. Estudio de distintos tiempos de maceración carbónica para la vinificación en tinto en tres variedades de vid (*V. vinifera* L.) establecidas en el centro de la república mexicana. Para obtener el grado de Maestro En Ciencia y Tecnología De Alimentos, Universidad Autónoma De Querétaro. Querétaro México. 31-34 p.

García J. 1976. Metodología de Análisis de Vinos y Derivados. Editorial Sepsa. Vilafranca del Penedés. España. 92 p.

García J. Enología avanzada 2011. Editorial Vértice. Málaga, España. 411 p.

García V. 2004. Introducción a la microbiología. 2ª Ed Universidad Estatal A Distancia. San José Costa Rica. 243 p.

Gil M., García F. y García P. 2009. Hostelería el vino y su servicio. Editorial Parainfo. Madrid España 348 p.

Gimeno L. 2007. Identificación de estrategias mercadológicas exitosas implementadas por empresas Vitícolas Francesas para penetrar en el mercado Mexicano. Para obtener el título en Licenciatura en Administración de Hoteles y Restaurantes. Universidad de las Américas, Escuela de Negocios y Economía, Departamento de Turismo Puebla, México. pp 14-36.

González S., Barrio E. y Querol A. 2007. Propiedades de las levaduras autóctonas y de las levaduras comerciales en vinificación. Enólogos, Nº. 48, pp: 42-46.

Guamán C. y Carvajal J. 2009. Caracterización e identificación de aislados de levaduras carotenogénicas de varias zonas naturales del Ecuador. Universitas Scientiarum Pontificia Universidad Javeriana 14 (2-3): 187-197.

Harbertson J.F., Adams D.O. 1978. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. Journal of Agricultural and Food Chemistry . 26: 809-812.

Hernández A., Alfaro I. y Arrieta R. 2003. Microbiología industrial .Editorial EUNED. San José, Costa Rica. 296 p.

Hidalgo J. 2003. Tratado de enología tomo .Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España. 1423 p.

Hidalgo J. 2010. Tratado de enología: Enología tomo I. 2ª Ed MundiPrensa, Madrid España.1822p.

Hidalgo P. y Fernández K. 2005 .Cepas de Saccharomyces cerevisiae CECT 11774 y CECT 11775 y su empleo en la elaboración, por fermentación alcohólica, de bebidas alcohólicas y otros productos alimenticios. Invención de Patentes, Número de publicación 2 222 088, Oficina Española de Patentes y Marcas, Madrid España. 10 p.

ICEX Instituto Español de Comercio Exterior. 2010. Estudios de mercado, El mercado de vino en México. Oficina Económica y Comercial de la Embajada de España en México.60 p .Internet: http://www.icex.es/icex/cma/contentTypes/common/records/mostrarDocumento/?doc=4561590 .Fecha de consulta: 12 de marzo de 2012.

ICEX Instituto Español de Comercio Exterior. 2013. Estudios de mercado, El mercado de vino en México. Oficina Económica y Comercial de la Embajada de España en México.60p.Internet: http://www.oficinascomerciales.es/icex/cma/contentTypes/common/records/mostrarDocumento/?doc=4656639 .Fecha de consulta: 17 de Mayo de 2013.

Jolly, N. P., Augustyn, O. P. H., & Pretorius, I. S.2003. The effect of non-Saccharomyces yeasts on fermentation and wine quality. South African Journal of Enology and Viticulture 24(2): 55-62.

Jolly N.P., Augustyn O.P.H. and Pretorius I.S. 2006. The Role and Use of Non-Saccharomyces Yeasts in Wine Production. South African Journal of Enology and Viticulture 27(1): 15-39

Kavanagh K. 2011. Fungi: Biology and Applications. Editorial John Wiley & Sons. Chichester, Reino Unido. 384 p.

Lambrecht,MG and Pretorius IS 2000, Yeast and its importance to wine aroma- a review. South African Journal of Enology and Viticulture 21: 97-129.

Linares M.J. y Solís F. 2007. Identificación de levaduras. Asociación Española de Micología. Revista Iberoamericana de Micología, Capitulo 11, ISBN: 978-84-611-8776-8. Internet: http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo11.pdf. Fecha de consulta 22 de junio de 2012.

Lozano M.E. y Muñoz J.A.1988. Determinación de glicerina en vinos y otras bebidas alcohólicas. Alimentaria, 25 (195): 25-32.

Madrid J, Madrid A y Moreno G. 2003. Análisis de vinos, mostos y alcoholes. Editorial Mundi Prensa, Madrid, España. 327 p.

Maiorella, B. L., Blanch, H. W., & Wilke, C. R. 1984. Feed component inhibition in ethanolic fermentation by Saccharomyces cerevisiae. Biotechnology and Bioengineering .26(10): 1155-1166.

Mannarelli, B. M., and Kurtzman, C. P.1998. Rapid Identification of Candida albicansand Other Human Pathogenic Yeasts by Using Short Oligonucleotides in a PCR. Journal of Clinical Microbiology 36(6): 1634-1641.

Maoura, N., Mbaiguinam, M., Nguyen, H. V., Gaillardin, C., & Pourquie, J. 2005. Identification and typing of the yeast strains isolated from bili bili, a traditional sorghum beer of Chad. African Journal of Biotechnology 4(7): 646-656.

Martín V. 2011. Selección de levaduras nativas de uva con capacidad antagónica frente a Botrytis cinérea. Tesina para optar por el grado de licenciado en ciencias biológicas. Sección Enología, Departamento de Alimentos Facultad de Química, Universidad de la República Uruguay. Montevideo,Uruguay. 24 p.

Martorell P., Belloch C., Fernandez-Espinar M., Querol A., Ossorio P., Tarin J. y Gomez R. 2012. Microorganismo fermentador productor de altas concentraciones de glicerol y sus aplicaciones en la producción de bebidas alcohólicas/vino. Patente de invención, Oficina Española de Patentes y Marcas, Número de Publicación 2 Madrid,España 356 011. 22 p.

Mas A., Torija M.J., Beltrán G.,Novo M., Hierro N., Poblet M., Rozés N. y Guillamón J.M. 2002. Selección de levaduras. Unitat d'enologia del Centre de Referència en Tecnologia dels Aliments. Facultad de Enología de Tarragona Universidad Rovira i Virgili. Tarragona, España pp: 39-44.

Maturano, Y. P., Rodríguez , L. A., Toro, M. E., Nally, M. C., Vallejo, M., Castellanos L. I., and Vazquez, F. 2012. Multi-enzyme production by pure and mixed cultures oaccharomyce and non-Saccharomyces yeasts during wine fermentation. International Journal of Food Microbiology 155(1): 43-50.

Medina K., Fariña L., Capra A.,Perez G.,Ferreri L., Coniberti A., Jubany S., Boido E., Disegna E., Gaggero C., Dellacassa E., Henschke P.A. y Carrau F.M. 2007. Impacto del uso de levaduras nativas seleccionadas en la enología de mínima intervención. Revista Enología. 4(1):1-11.

MAGRAMA(Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio ambiente del Gobierno de España),2013,http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/exposiciones/vid/www/imagenes/variedades_uva_01.html, Consultado el 9 Mayo 2013.

Molina R.2000. Teoría de la clarificación de mostos y vinos y sus aplicaciones prácticas. Ediciones Mundi-Prensa.Madrid, Esáña.317p.

Navarre J. 1998. L'oenologie. Editorial Lavoisier. París, Francia. 354 p.

Orberá T. 2004. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. Revista Iberoamericana Micología. 21: 15-19

Organización Internacional de la viña y el vino (OIV) .2007. Situación del sector Vitivinícola mundial en 2007. Suplemento del boletín. Editorial OIV, París, Francia. pp: 2-28.

Organización Internacional de la viña y el vino (OIV). 2013. Situación del sector Vitivinícola mundial en 2013. Nota de coyuntura mundial marzo de 2013. Editorial OIV, París, Francia. 16 p.

OIV-MA-AS312-05.2009. Method Glycerol . Compendium of international methods of analysis - OIV - .(Resolution Oeno 377/2009)

OIV-MA-AS313-15 .2011. Method pH .Compendium of international methods of analysis - OIV.(A31, Oeno 438-2011)

OIV-MA-AS323-04B.2009 Method Sulfur dioxide. Compendium of international methods of analysis - OIV (Resolution Oeno 377/2009)

OIV-MA-AS313-02.2009. Method Volatile Acidity. Compendium of international methods of analysis - OIV (Resolution Oeno 377/2009)

OIV-MA-AS311-01A.2009. Method Reducing substances. Compendium of international methods of analysis - OIV (Resolution Oeno 377/2009)

OIV-MA-C1-01: R2011.Commendium of international methods of analysis. OIV,Maximum aceptable limits of carious substances contained in wine.

OIV-OENO 370-2012 Directrices para la caracterización de levaduras de vino del género saccharomyces aisladas de ambientes vitivinícolas (Resolución 2012)

Ortiz E.2011. Precipitación de polifenoles de vino tinto utilizando colágeno de peces de baja california. Tesis para obtener el título de Ingeniero en industrias alimentarias. Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Zamora. Zamora, México .93 p.

Palacios V.M., Nebot E. y Pérez L. 1997. Aplicación de análisis estadísticos al Estudio del proceso de maduración de la uva en el marco de jerez. Editorial Universidad de Cádiz, Cádiz España. 210 p

Pérez G., Fariña L, Barquet M, Boido E.,Gaggero C.,Dellacassa E. and Carrau F.2011. A quick screening method to identify β-glucosidase activity in native wine yeast strains: application of Esculin Glycerol Agar (EGA). Medium. World Journal of Microbiology and Biotechnology 27: 47-55

Pérez L .2001. El vino, el arte que se puede beber. Editorial Panorama. D.F. México 137 p

Peynaud E. 1977. Enología práctica. Editorial Mundi-prensa. Madrid, España. 414 p.

Raynal, C., Wardrop, F., Pillet, O., Languet, P., Heras, J. M., Dumon, A. y Ortiz-A. 2011. Fermentación controlada mediante la inoculación secuencial de una levadura no-SaccharomyceS y de una levadura *Saccharomyces cerevisiae*, una herramienta innovadora para el enólogo. Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos 428: 83-92.

Regodón J.A. 1997. Obtención y caracterización de cepas autóctonas de levaduras para la elaboración estandarizada de vinos de calidad. Tesis Doctoral. Departamento de Biología y producción de vegetales, Universidad de Extremadura, España pp: 12-45.

Rementeria A., Rodriguez J.A., Cadaval A., Amenabar R., Muguruza J.R., Hernando F.L. and Sevilla M.J. 2003. Yeast associated with spontaneous fermentations of white wines from the "Txakoli de Bizkaia" region (Basque Country,North Spain). International Journal of Food Microbiology 86: 201-207.

Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donèche B., Lonvaud A.2006. Handbook of Enology. Volume 1. The microbiology of Wine and Vinification. 2a Ed. John Wiley & Sons: Chichester, Inglaterra. 250 p.

Ricci,M., Martini, S., Bonechi, C.,Trabalzini, L., Santucci, A. and Rossi, C. 2004. Inhibition effects of etanol on the kinetics of glucose metabolism by S. cerevisiae:NMR and modeling study. Chemical physics letter 387 (4-6): 377-382

Riou C., Salmon J-M., Vallier M-J., Gunata Z. and Barre P. 1998. Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose tolerant β-glucosidase from Aspergillus oryzae. Applied and Environmental Microbiology. 64: 3607-3614.

Rojas V., Gil J.V., Piñaga F. and Manzanares P. 2001. Studies on acetate ester formation by non-Saccharomyces wine yeasts. International Journal of Food Microbiology 70: 283-289.

Sandoval R.A., Martínez R.Á., Hernández M., Fernández E., Arvizu S. and Soto L. 2011. Control biológico y químico contra control biológico y químico contra Fusarium stilboides en Pimiento morrón en poscosecha. Revista Chapingo Serie Horticultura 17 (2): 161-172.

Santamarina M. P., García F. y Roselló J.1997. Biología y botánica Tomo II. Editorial Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. 367 p.

Scanes K.T., Hohmann S. and Prior B.A.1998. Glycerol production by the yeast Saccharomyces cerevisiae and its relevance to wine: a review. South African Journal for Enology and Viticulture. 19: 17-22.

Sowalsky, R. A., & Noble, A. C. 1998. Comparison of the effects of concentration, pH and anion species on astringency and sourness of organic acids. Chemical senses 23(3): 343-349.

Suárez J.A. e Íñigo B. 2004.Microbiología Enológica: Fundamentos de Vinificación. 3ª Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. 716 p.

Swiegers JH. Bartowsky PA., Henschke PA. and Pretorius IS. 2005. Yeast and bacterial modulation of winw aroma and flavor. Australian Journal of Grape and Wine Research. 11: 139-173.

Torija M.J. 2002. Ecología de levaduras: selección y adaptación a fermentaciones vínicas. Memoria presentada por Para optar al grado de Doctora En Bioquímica. Universitat Rovira I Virgili Departament De Bioquímica I Biotecnologia Facultat D'enologia. Tarragona, España. pp: 7-8

Valencia F. 2008. Enología: Vinos, Aguardientes Y Licores. Editorial Vértice. Málaga, España. 65 p.

Valencia F.2010. Enología: Vinos Aguardientes y Licores. Editorial Vértice. Málaga, España. 200 p.

Vazquez F., Nally M. C., Maturano P. y Eugenia, M. 2005. Selección de cepas de levaduras autóctonas para vinificación: El Concepto de Levadura Plenamente Adaptada-1ra Parte. Revista Enología .10: 2-4.

Vezinhet F., Hallet J.N., Valade M. and Poulard A. 1992. Ecological survey of wine yeast strains by molecular methods of identification. American Journal of Enology and Viticulture. 43:83-86.

Villarroel E. 2005. Exposición a Anhídrido sulfuroso en la industria vinícola Chilena. Ciencia y Trabajo.(17):88-92

Vincent M.C., Álvarez S. y Zaragozá J.L. 2006. Química Industrial Orgánica. Editorial Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. 225 p.

Waterhouse AL and Teissedre PL. 1997. Levels of phenolics in California varietal wines. In Wine: Nutritional and Therapeutic Benefits; Watkins TC, Ed.; ACS Symposium Series 661; American Chemical Society: Washington, DC; pp 12-23.

Zironi, R., Romano, P., Suzzi, G., Battistutta, F. & Comi, G. 1993. Volatile metabolites produced in wine by mixed and sequential cultures of Hanseniaspora guilliermondii or Kloeckera apiculata and Saccharomyces cerevisiae. Biotechnology Letters 15(3): 235-238.

ANEXOS

Anexo 1. Seguimiento de la maduración de vid en tres viñedos de Querétaro

El Rosario					
Acidez	**Acido tartárico (g/L)**				
		Fecha			
Variedad		10-jul	27-jul	10-ago	17-ago
Merlot	21.8295	21.8295	9.9225	11.2455	6.93105
Cabernet Sauvignon	44.5095	44.5095	15.498	12.9465	8.91135
Syrah	37.422	37.422	12.0015	17.2935	10.396575
Azúcar	**Dextrosa(g/L)**				
		Fecha			
Variedad		10-jul	27-jul	10-ago	17-ago
Merlot		138	191	191	193
Cabernet Sauvignon		110.5	164	193	199
Syrah		100	176	186.5	159
Relación azúcares/acidez					
		Fecha			
Variedad		10-jul	27-jul	10-ago	17-ago
Merlot		6.32172	19.2492	16.9846	27.8457088
Cabernet Sauvignon		2.48262	10.582	14.9075	22.3310722
Syrah		2.67222	14.6648	10.7844	15.2934981

BRIX				
	Fecha			
Variedad	10-jul	27-jul	10-ago	17-ago
Merlot	13.8	19.1	19.1	19.3
Cabernet Sauvignon	11.05	16.4	19.3	19.9
Syrah	10	17.6	18.65	15.9

Vinedos aztecas

ACIDEZ Acido tartárico (g/L)

	Fecha				
Variedad	15-jun	10-jul	27-jul	10-ago	17-ago
Merlot	21.357	21.357	10.1115	11.151	7.143225
Cabernet S.	26.838	26.838	11.0565	9.828	7.6383
Cabernet F.	29.673	29.673	16.9155	10.4895	7.709025

g/L Azúcar

	Fecha				
Variedad	15-jun	10-jul	27-jul	10-ago	17-ago
Merlot	65	161.5	174	229	217
Cabernet S.	77	150	190	220	206
Cabernet F.	53	126	159	209	200

Azúcar/acidez

	Fecha				
Variedad	15-jun	10-jul	27-jul	10-ago	17-ago
Merlot		7.56192349	17.2081294	20.5362748	30.3784355
C. Sauvignon		5.5890901	17.1844616	22.3850224	26.9693518
C. Franc		4.2462845	9.39966303	19.9246866	25.943618

El Barreno

ACIDEZ Acido tartárico (g/L)

	Fecha				
Variedad	15-jun	10-jul	27-jul	10-ago	17-ago
Merlot	22.5855	22.5855	9.828	11.34	7.709025
Cabernet S.	23.436	23.436	11.2455	12.04875	6.36525
Cabernet F.	29.862	29.862	21.357	20.61045	10.1844

g/L Azúcar

	Fecha				
Variedad	15-jun	10-jul	27-jul	10-ago	17-ago
Merlot	40	160	201	203	202.25
Cabernet S.	45	162.5	199	200	219
Cabernet F.	47.5	140	141	162.5	183

Azúcar/Acidez

	Fecha				
Variedad	15-jun	10-Jul	27-Jul	10-Ago	17-Ago
Merlot		7.0841911 8	20.451770 5	17.901234 6	26.235483 7
C. Sauvignon			17.695967 3	16.599232 3	34.405561 4
C. Franc		6.9337771 4	6.6020508 5	7.8843499 3	17.968657 9

Anexo 2. Protocolo para termovinificación

Material:

Manta de cielo estéril

Guantes estériles

Recipiente con hielo

Recipientes estériles

Procedimiento

1.- Los racimos provenientes de la vendimia destinados para micro vinificaciones fueron desinfectados (Hipoclorito de sodio al 100ppm /5 min.), posteriormente se lavaron con agua destilada y se secaron con una corriente de aire.

2.-Se despalillo manualmente (utilizando guantes estériles)

3.- Se presionaron las uvas con un utensilio de acero inoxidable en un recipiente (previamente estériles ambos) con la finalidad de romper el grano de uva, simulando un prensado.

4.- Se cubrió el recipiente con papel aluminio y se llevó a una temperatura de 65 ºC y se mantuvo por 20 min (se utilizó equipo autoclave).

5.-Se llevo a una temperatura de 20 ºC en menos de 5 minutos, utilizando un recipiente con contenido de agua y hielo.

6.- En una campana de flujo laminar, como zona aséptica se vertió el mosto obtenido a 20 C en una maya de tela estéril y se estrujo manualmente utilizando guantes estériles, desembocando el líquido obtenido en un recipiente estéril.

7.- 1 ml del líquido fue utilizado como muestra directa para hacer la prueba de vaciado en placa, Agar Papa Dextrosa (APD), adicionado con rosa de bengala (60mcg mL^{-1}); al solidificar el medio se incubará a 25°C entre tres y cinco días, para evaluar el crecimiento de hongos y levaduras (Sandoval *et al*., 2011).

8.-Resultados: no hubo crecimiento

Cuadro A3.Tiempo de deteccion de levaduras tolerancias a etanol 6% y dioxido de azúfre 30 mg·l^{-1} total.

Cepa	ETANOL 6%	DIOXIDO DE AZÚFRE 30 mg·l-1	Cepa	ETANOL 6%	DIOXIDO DE AZUFRE 30 mg·l-1	Cepa	ETANOL 6%	DIOXIDO DE AZÚFRE 30 mg·l-1
NB1	2865	742	NB54	2915	1215	NB116	2685	832
NB2	4325	847	NB59	4325	960	NB117	2145	787
NB3	4325	855	NB60	2630	862	NB118	1880	832
NB7	4325	855	NB61	2150	870	NB119	1960	817
NB8	1915	825	NB62	4300	825	NB120	1920	787
NB9	1475	937	NB63	1200	832	NB121	3215	840
NB10	2190	870	NB64	1960	832	NB123	4325	802
NR12	2610	877	NB65	4325	840	NB124	2320	787
NB13	3235	862	NB66	1265	832	NB129	4595	840
NB14	2545	952	NB71	3395	757	NB130	3450	937
NB16	3125	825	NR74	1745	847	NB131	2225	870
NB17	3260	832	NA75	4325	967	NB132	2340	840
NB18	1975	795	NR77	1595	232	NB133	1800	855
NR20	2250	810	NA4	1380	525	NR84	1590	840
NR21	2240	825	NA22	1455	765	NR86	1525	847
NB23	1330	825	NA26	1640	825	NR90	1090	172
NB24	1720	757	NA36	1370	847	NR94	1965	780
NB25	2380	795	NA38	1560	840	NR96	1265	832
NB27	2070	742	NA41	1555	840	NR98	2160	825
NR28	2395	825	NA42	1550	832	NR99	1815	840
NB31	2340	465	NA56	2695	855	NR100	1810	907
NB39	4325	735	NA72	4055	825	NR104	1800	825
NB45	1380	832	NA80	2820	832	NR105	1660	907
NB46	1630	832	NB108	3270	240	NR106	2115	960
NB48	1750	997	NB109	2555	1080	NR107	4325	885
NB51	2190	832	NB110	1370	716	NB143	2155	892
NB52	2150	817	NB111	2700	795	NB145	2035	825
NB53	2365	825	NB114	4255	847			

Cuadro A4. Seguimiento de peso neto (g) durante la fermentación

"Cabernet Sauvignon"

Tiempo (h)	NA4 +K	NR90+K	NB108+K	NB1+K	NB27+K	NB31+K	NB39+K	NR77+K	K
0	770.5	770.5	770	776	767	771	772.5	774.5	770
12	766.5	765.5	763.5	769.5	761	766	766	767.5	763.5
25	758	755.5	754.5	759.5	753	757	758.5	758.5	756.5
36	746.5	743.5	743	747.5	742	745.5	746.5	746.5	743.5
75.5	726	724.5	724	728.5	723	727	727	727.5	723.5
99	713.5	712.6	712.5	717	711.5	714	716	716.5	711.5
123	701.5	701.5	701.5	704.5	700	703	704.5	705.5	700.5
147	696.5	696.5	696	699.5	694.5	697.5	699	700.5	696
180	694.5	693.5	692.5	696.5	691	694	695.5	697	693
194	694	692	690.5	695	689	692.5	693.5	695	691.5
244	692	691	690	694.5	688.5	691.5	693	694.5	691

"Merlot"

Tiempo (h)	NA4 +K	NR90+K	NB108+K	NB1+K	NB27+K	NB31+K	NB39+K	NR77+K	K
0	772.5	779	778	778	778	776	774	780	774
25	771	778	777	777	776.5	775	773	779	773.5
34	767	774	773	773	773	771.5	769.5	775	770.5
53	750.5	759	758	756	755.5	754.5	752	757.5	752.5
99.5	721.5	730	728	727	726	725	723	728	722
128.5	705	711	710.5	709.5	708.5	708.5	706	710.5	704
160	702	707.5	707	707	705.5	705.5	703.5	708	702.5
177.5	700.5	706	705.5	705	704	703.5	702	706.5	701
194.5	700	705.5	705	705	703.5	703	701.5	706.5	701
220	698.5	704	703.5	703	701.5	701.5	700	705	699.5
246	698	703.5	703	702	701	701	699.5	704.5	699

Anexo 5. Polifenoles totales de vino final

Metodología: La concentración de polifenoles totales en el vino se determinó colorimétricamente modificando el método descrito por Harbertson & Adams (1978). Muestras de 10 µl se diluyeron en 1mL de agua destilada, se añadieron 100 µL del reactivo de Folin-Cicalteau y se incubaron a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente se añadieron 300 µL de Na_2CO_3 al 20% (w/v) y se incubaron las muestras a 40°C por 30 min. La absorbancia de las muestras se evaluó por espectrofotometría a 765 nm utilizando una placa con 1 cm Este se realizó en un equipo Multiskan ascent (Thermo Electron Corporation®). La concentración específica de polifenoles totales se determinó después de generar una curva estándar utilizando ácido gálico como control.

Los compuestos fenólicos son responsables de importantes características organolépticas de los vinos La concentración de taninos en el vino depende del varietal y maduración de la uva utilizada durante el proceso de vinificación, el tiempo y temperatura de maceración, el tipo de polifenol (Ortiz, 2011). La concentración de polifenoles totales en el vino tinto generalmente fluctúa entre 50 y 6000 mg L^{-1} (Waterhouse y Teissedre, 1997).

Los vinos obtenidos de las microvinificaciones resultaron con 1.19 g/L de polifenoles totales para Merlot y 1.5 g/L de polifenoles totales para `C.Sauvignon´ (Cuadro A5).

Cuadro A5.Polifenoles totales de vino final

MERLOT	g/L	CABERNET SAUVIGNON	g/L
SA1	1.14647867	SA1	1.35865167
SR7	1.50010033	SR7	1.541046
SB1	1.05714267	SB1	1.987726
N1	1.619215	N1	1.10925533
N27	0.83380267	N27	1.183702
NB1	1.04225333	N31	1.84999967
N39	0.90824933	N39	1.47032167
N77	1.016197	N77	1.34748467
K1	1.652716	K1	1.65643833
Promedio	1.19735056	Promedio	1.50051393
Desviación estandar	0.31061416	Desviación estandar	0.27555574