



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

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

Selección de levaduras y bacterias ácido lácticas nativas queretanas en base a su potencial enológico, compatibilidad y aporte al perfil aromático de vinos

Tesis

Que como requisito para obtener el grado de:

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Presenta

M. en C. Dalia Elizabeth Miranda Castilleja

Dirigido por

Dra. Sofía María Arvizu Medrano

Santiago de Querétaro, Qro Julio de 2018.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República
(PROPAC)

**Selección de levaduras y bacterias ácido lácticas nativas
queretanas en base a su potencial enológico, compatibilidad y
aporte al perfil aromático de vinos.**

Tesis que para obtener el grado en
DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Presenta
M. en C. Dalia Elizabeth Miranda Castilleja

Dirigido por
Dra. Sofía María Arvizu Medrano

Dra. Sofía María Arvizu Medrano
Presidente


Firma

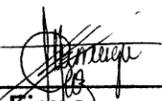
Dra. Montserrat Nadal Roquet-Jalmar
Codirector


Firma

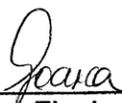
Dr. Ramón Álar Martínez Peniche
Secretario


Firma

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga
Vocal


Firma

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar
Suplente


Firma
Dra. Silvia Lorena Amaya LLano
Director de la Facultad
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro. Julio de 2018

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue seleccionar, conjuntamente, cepas compatibles de levaduras *Saccharomyces* y bacterias ácido lácticas (BAL) nativas queretanas que mejoraran la calidad y tipicidad de los vinos locales. Cepas de BAL y *Saccharomyces* aisladas de vinícolas queretanas y tolerantes a condiciones de vinificación se identificaron, se distinguieron genotípicamente (RAPD), se caracterizaron en aspectos de interés enológico y en interacciones levadura-BAL mediante cinéticas de crecimiento. Cepas seleccionadas se emplearon en microvinificaciones en tinto determinando la velocidad de fermentación, la calidad de los vinos y el perfil de volátiles mediante HS-SPME acoplado a GC-MS. La expresión de HSP12, MSN4, CTT1, ADH1, BAT2, asociados a características enológicas en *S. cerevisiae* se cuantificó mediante rt-qPCR. Se detectaron cinco especies de BAL, destacando *O. oeni* y *L. plantarum*. De 822 BAL aisladas 119 desarrollaron con 10 % de etanol, 50 mg/L de SO₂ y pH 3.5. En vino modificado las cepas de *O. oeni* desarrollaron en promedio 80 % más que las *L. plantarum*. Las levaduras más floculantes desarrollaron poco en condiciones inhibitorias y las cepas sobresalientes (SR19, SR26 y N05) fueron medianamente floculantes, con efecto *killer*, productoras de ácido acético y sulfhídrico. En general las levaduras promovieron el desarrollo de las BAL. Las levaduras seleccionadas SR19 y N05 fueron eficientes en la fermentación y produjeron vinos de buena calidad, aunque SR19 tuvo un arranque más rápido. *L. plantarum* FU39 consumió más rápido ácido málico (0.027 g/h) que *O. oeni* VC32 (0.011 g/h). Se identificaron 53 compuestos volátiles en los vinos, que mediante análisis multivariados nos permitieron distinguir entre procesos fermentativos ocurridos y al tratamiento N05-FU39 del resto. Los genes HSP12 (estrés) ADH1 (eficiencia fermentativa) y BAT1 (vía de Ehrlich), así como el tratamiento de VC32 en coinoculación mostraron una sobreexpresión respecto a la condición control. El enfoque conjunto, aunado a lo multifacético de éste estudio ofreció un amplio panorama para la selección de una combinación ideal de levadura-BAL nativas queretanas.

Palabras clave: Selección de cepas nativas, interacciones levadura-BAL, vinificación, cinéticas de desarrollo, perfil de volátiles, expresión de genes.

ABSTRACT

The aim of this project was to select, in a combined approach, compatible strains of *Saccharomyces* yeasts and lactic acid bacteria (LAB) native from Queretaro, in order to improve the quality and tipicity of local wines. LAB and *Saccharomyces* strains isolated from Queretaro wineries and tolerant to wine conditions were identified and genotypically differentiated (RAPD), characterized in enologic aspects and yeast-LAB compatibility by means of growth kinetics. Selected strains were used in red wine microvinifications, determining fermentation rate, wine quality and volatile composition using HS-SPME with GC-MS. Gene expression of HSP12, MSN4, CTT1, ADH1, BAT2, associated with enological features of *S. cerevisiae*, were quantified by rt-qPCR. Five species of LAB were detected in the wineries, being *O. oeni* and *L. plantarum* the most prominent. From 822 isolated LAB, 119 showed growth with 10 % of ethanol, 50 mg/L of SO₂ and pH 3.5. In modified wine, *O. oeni* strains grew in average 80% more than *L. plantarum*. The most flocculant yeast strains showed poor growth under inhibitory conditions, and outstanding strains (SR19, SR26 and N05) were mediumly flocculant, with killer effect, and acetic and sulfhydic acid producers. In general terms yeast promoted LAB growth. Selected yeast SR19 and N05 were fermentative efficient and produced good quality wines, however strain SR19 started the fermentation faster. *L. plantarum* FU39 was faster consuming malic acid (0.027 g/h) than *O. oeni* VC32 (0.011 g/h). Fifty-three volatile compounds were identified in the wines produced, which, by multivariate analysis, allowed to discriminate among fermentative processes occurred and particularly the combination N05-FU39 from the rest of the treatments. The genes HSP12 (stress) ADH1 (fermentation efficiency) and BAT1 (Ehrlich pathway), along with the coinoculation treatment with VC32, showed an overexpression with respect to the control condition. The combined and multifasic approach of this study offered a wide picture for an appropriate selection of native yeast-LAB combination.

Key words: native strain selection, yeast-LAB interactions, winemaking, growth kinetics, volatile profile, gene expression.

ÍNDICE

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
ÍNDICE	III
INDICE DE TABLAS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. El vino.....	3
2.1.1. Generalidades	3
2.1.2. Producción e importancia económica.....	3
2.1.2. Clasificación	6
2.2. Composición del vino.....	7
2.2.1. Alcoholes.....	8
2.2.2. Ácidos orgánicos	8
2.2.3. Compuestos fenólicos	10
2.2.4. Compuestos volátiles	11
2.2.5. Compuestos tóxicos	12
2.3. Factores que determinan la composición del vino.....	13
2.3.1. Clima y Suelo	14
2.3.2. Manejo del viñedo	14
2.3.3. Cepaje (cultivar) y portainjerto.....	15
2.3.4. Proceso de vinificación.....	16
2.3.5. Los microorganismos y las etapas microbiológicas.....	17
2.4. Fermentación alcohólica (FA).....	18
2.4.1. Generalidades	18
2.4.2. Levaduras enológicas	19
2.4.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
2.4.4. Características de selección y mecanismos implicados	21
2.5. Fermentación Maloláctica (FML)	25
2.5.1. Generalidades	25
2.5.2. Bacterias ácido lácticas (BAL) de importancia enológica	27
2.5.3. <i>Oenococcus oeni</i>	28
2.5.4. Características para la selección de <i>O. oeni</i>	28
2.5.5. <i>Lactobacillus plantarum</i>	30
2.6. Interacciones entre microorganismos fermentativos.....	31
HIPÓTESIS	34
OBJETIVOS.....	35
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
3.1 Sitio experimental.....	36
3.2 Material biológico	36
3.2.1. Variedades de vid.....	36
3.2.2. Microorganismos	37
3.3 Metodología general de trabajo.....	37
3.4 Aislamiento y caracterización de poblaciones de BAL en vinícolas de la región.	38

3.4.1.	Muestreos.....	38
3.4.2.	Recuperación de BAL y aislamientos.....	39
3.4.3.	Identificación de poblaciones de BAL.....	40
3.5.	Caracterización fenotípica de levaduras <i>Saccharomyces</i> y BAL.....	41
3.5.1	BAL	41
3.5.2	Levaduras <i>Saccharomyces</i>	42
3.5.3	Compatibilidad Levadura-BAL.....	44
3.5.4	Caracterización fermentativa de BAL seleccionadas	44
3.6.	Ensayos microvinificación con cepas nativas de levaduras y BAL.....	45
3.6.1.	Fermentación alcohólica	46
3.6.2.	Fermentación maloláctica	47
3.6.3	Análisis de volátiles	47
3.7.	Expresión de genes	48
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
4.1.	Recuentos de las poblaciones de BAL dentro de las vinícolas	52
4.2.	Distribución de especies de BAL en las bodegas	54
4.3.	Tolerancia de las especies de BAL a condiciones de vinificación	59
4.4.	Caracterización genotípica y fenotípica de <i>L. plantarum</i> y <i>O. oeni</i>.....	62
4.4.1.	Pruebas de tolerancia (SO ₂ , bajo pH y etanol).....	63
4.4.2.	Perfil genotípico.....	66
4.5.	Caracterización genotípica y fenotípica de levaduras <i>Saccharomyces</i>.....	69
4.5.1.	Desarrollo en condiciones de estrés osmótico y nitrógeno limitante ..	69
4.5.2.	Tolerancia a SO ₂ , bajo pH y etanol	70
4.5.3.	Floculación	72
4.5.4.	Análisis conjunto de características cuantitativas.....	73
4.5.5.	Características cualitativas.....	75
4.5.6.	Perfil genotípico.....	78
4.6	Compatibilidad Levadura-BAL	80
4.7	Caracterización fermentativa de BAL seleccionadas	82
4.7.1.	Eficiencia fermentativa de BAL seleccionadas en medio sintético	82
4.7.2	Preparación de inóculos y preadaptación de cepas autóctonas.....	83
4.8	Ensayos de microvinificación con de levaduras y BAL seleccionadas.....	85
4.8.1	Fermentación alcohólica	85
4.8.2	Fermentación maloláctica	89
4.8.3	Perfil de compuestos volátiles	93
4.9.	Expresión genética de <i>S. cerevisiae</i> SR19 en dos sistemas de inoculación	106
4.9.1.	Expresión relativa de genes	106
4.9.2.	Comportamiento de poblaciones de levaduras y BAL seleccionadas en inoculación secuencial y coinoculación.....	110
V.	CONCLUSIONES.....	114
VI.	REFERENCIAS.....	117
VII.	ANEXOS	132

INDICE DE TABLAS

	Pag
2.1 Etapas de la vinificación y algunas alternativas que influyen en la calidad del vino.	16
2.2 Características deseables para selección de levaduras	21
3.1 Características de empresas vinícolas donde se llevará a cabo el presente estudio	36
3.2 Descripción de cepas de levaduras y BAL empleadas en este estudio	37
3.3 Condiciones de amplificación por PCR realizadas en el estudio	40
3.4 Pruebas a realizar, para la caracterización de las cepas de levaduras <i>Saccharomyces</i> y BAL aisladas de vinícolas queretanas.	41
3.5 Genes estudiados durante vinificaciones secuenciales y co-inoculadas empleando las cepas seleccionadas SR19 (<i>S. cerevisiae</i>), VC32 (<i>O. oeni</i>) y FU39 (<i>L. plantarum</i>)	50
4.1 Poblaciones de BAL obtenidas en las distintas muestras dentro de cuatro vinícolas queretanas.	53
4.2 Porcentaje de cada especie detectada en relación al total de muestras manejadas en cada bodega.	56
4.3 Características y composición del mosto 'Cabernet Sauvignon' empleado para las fermentaciones a microescala	87
4.4 Composición obtenida por la FA del mosto 'Cabernet Sauvignon' inoculando cepas <i>S. cerevisiae</i> nativas queretanas	87
4.5 Composición de la mezclas de tres FA de las cepas N05 y SR19 (respectivamente).	89
4.6 Composición promedio de los vinos obtenidos tras la FA y la FML respectivamente, independientemente de las cepas empleadas.	92
4.7 Composición final de los vinos obtenidos por los distintos tratamientos en combinación de levadura (N05, SR19) y BAL (VC32, FU39 y CH11).	93
4.8 Promedio de la concentración total de los cinco tipos de compuestos volátiles determinados mediante HS-SPME con GC/MS en las microvinificaciones con las cepas nativas.	98
4.9 Valores de actividad aromática (OAV) de los 23 compuestos con OAV>1	103
A1 Secuencias de los cebadores utilizados para los ensayos moleculares	132
A2 Caracterización fenotípica semi-cuantitativa de 27 levaduras <i>Saccharomyces</i> .	136
A3 Prueba de medias para determinar diferencias en interacción levadura-BAL.	137

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
2.1 Distribución de las zonas vitivinícolas en México	5
2.2 Proporción de los compuestos químicos minoritarios presentes en el vino tinto	7
2.3 Comportamiento de los microorganismos clave presentes durante la vinificación	17
2.4 Metabolismo de la fermentación alcohólica	19
2.5 Desarrollo de especies de levaduras enológicas y producción de etanol en la fermentación espontánea mosto de Malbec	20
2.6 Esquema de las rutas metabólicas implicadas en los procesos de síntesis de compuestos aromáticos	24
2.7 FML, conversión de L-málico a L-láctico y CO ₂ por la enzima maloláctica de células de BAL como <i>Oenococcus oeni</i> .	26
3.1 Estrategia general para la realización del proyecto	38
3.2 Preparación y pre-adaptación de inóculos y su efecto en el consumo de ácido málico en vino estéril obtenido por las levaduras nativas	45
3.3 Esquema de trabajo para ensayo microvinificación.	47
3.4 Diseño experimental para el análisis de expresión de genes de <i>S. cerevisiae</i> en interacción con BAL de distinto género en dos esquemas de inoculación.	49
4.1 Identificación de aislados (izquierda) y detección de especies en las muestras de las bodegas (derecha) por PCR múltiple.	55
4.2 Proporción de aislados de cada especie capaz de desarrollar en medio SW con SO ₂ 30 mg/L, pH 3.5 y etanol (10, 12 y 13 % v/v).	61
4.3 Incremento de la densidad óptica en cepas de <i>L. plantarum</i> y <i>O. oeni</i> evaluada en MRS modificado (12 % etanol) y vino enriquecido.	64
4.4 Dendrograma de las cepas de <i>L. plantarum</i> obtenido a partir de la caracterización genotípica mediante RAPD (M13). Empleando el índice de similitud de Jaccard y el algoritmo de UPGMA (Past3).	67
4.5 Dendrograma de las cepas de <i>O. oeni</i> obtenido a partir de la caracterización genotípica mediante RAPD (Coc-On2). Empleando el índice de similitud de Jaccard y el algoritmo de UPGMA (Past3).	68
4.6 Incremento (superior) y velocidad de desarrollo (inferior) de 27 levaduras <i>Saccharomyces</i> evaluadas en medio reducido en nitrógeno (66 mg/L) y elevado en azúcares (35 % sacarosa).	69
4.7 Velocidad de desarrollo de 27 levaduras <i>Saccharomyces</i> en medio GJM con 14 % de etanol, 50 mg/L de SO ₂ y pH 3.5.	71
4.8 Floculación de 27 levaduras <i>Saccharomyces</i>	72

4.9	Análisis de componentes principales y agrupamiento de K-medias de 26 cepas de levaduras con base en su índice de floculación, tiempo de duplicación (DT) e incremento de densidad óptica (ODi) en las cinéticas de crecimiento en dos condiciones.	74
4.10	Dendrograma de 27 cepas de <i>Saccharomyces</i> spp. obtenido con la caracterización fenotípica de: factor <i>killer</i> , producción de ácido acético, H ₂ S, capacidad floculante y de desarrollar a 8 °C (Tabla A2). Construido mediante distancia Euclideana y el algoritmo UPGMA.	77
4.11	Dendrograma de las cepas de levaduras <i>Saccharomyces</i> obtenido a partir de la caracterización genotípica mediante RAPD (RF2). Empleando el índice de similitud de Jaccard y el algoritmo de UPGMA (Past3).	79
4.12	Incremento relativo de DO $\left[\frac{DO_{i\text{Con levadura}} - DO_{i\text{sin levadura}}}{DO_{i\text{sin levadura}}} \right]$ para determinar la compatibilidad entre cuatro BAL y cinco levaduras <i>Saccharomyces</i> nativas, más una cepa comercial como control de cada grupo (450® y K1, respectivamente).	81
4.13	Cinética de consumo de ácido málico de las dos BAL nativas seleccionadas en WLM.	83
4.14	Consumo de ácido málico de las cepas nativas FU39 y VC32 en vino producido por las levaduras N05 y SR19, evaluando dos formas de preparación de inóculo: MRS adicionado de glutatión (GSH) y una preadaptación en medio MRS con vino proporción 1:1 (W/M).	84
4.15	Evolución de la fermentación alcohólica realizada por las levaduras nativas <i>S. cerevisiae</i> N05 y SR19, en vinificación en tinto con 'Cabernet Sauvignon'.	86
4.16	Cinética de la FML realizada por las cepas nativas FU39 (<i>L. plantarum</i>), VC32 (<i>O. oeni</i>) y la comercial CH11 (<i>O. oeni</i>) a partir de los vinos obtenidos por las levaduras N05 y SR19.	90
4.17	Gráfica de dos vías del conglomerado Jerárquico (método de Ward) obtenido a partir de los datos de concentración de 53 compuestos volátiles (ppb).	95
4.18	Conglomerado Jerárquico (método de Ward) en dos vías obtenido para los 24 tratamientos (repeticiones incluidas) con los valores de actividad olfativa (OAV) superiores a uno.	101
4.19	Análisis de componentes principales de 23 compuestos cuyos valores de actividad aromática (OAV's) fueron superiores a 1.	104
4.20	Expresión genética relativa de los genes BAT2, MSN4 HSP12, ADH1 y CTT1 (cada gráfica) en <i>S. cerevisiae</i> SR19, determinada mediante $R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$.	108
4.21	Cinética de desarrollo de la levadura SR19 (líneas continuas) y las BAL (líneas discontinuas) FU39 (negro), VC32 (azúl) y Lactoenos 450® (rojo) en microvinificaciones inoculadas de forma secuencial (izquierda) y coinoculación (derecha).	111
A1	Velocidad de desarrollo en medio cuya única fuente de nitrógeno fueron 66 mg/L se sulfato de amonio.	135

I. INTRODUCCIÓN

El estado de Querétaro ocupa actualmente el segundo lugar como productor de vinos en México, encontrándose en expansión. No obstante, los vinos queretanos carecen de una tipicidad y suelen presentar una limitada graduación alcohólica y una elevada acidez, lo que limita su competitividad comercial. Tales limitantes podrían reducirse mediante el uso de microorganismos nativos seleccionados.

La elaboración de vino suele incluir dos procesos microbiológicos: la fermentación alcohólica (FA) y la fermentación maloláctica (FML). La primera consiste en la conversión de azúcares en etanol por acción de levaduras, principalmente *Saccharomyces cerevisiae*. Por su parte, la FML es la conversión del ácido málico en láctico producida por bacterias ácido lácticas (BAL), destacando tradicionalmente *Oenococcus oeni* (BAL) y recientemente algunas cepas de *Lactobacillus plantarum*. Estas especies se distinguen de otras por tolerar condiciones adversas del vino, producir pocos compuestos indeseables y contribuir positivamente a la complejidad y tipicidad del vino. Dentro de las especies, a nivel cepa, estos aspectos varían y tales diferencias suelen estar asociadas a diferencias sutiles en los mecanismos que originan las características de interés.

El origen y la forma en que se incorporan estos microorganismos al proceso deriva en tres tipos de fermentaciones: a) espontáneas, b) inoculadas con cepas comerciales e c) inoculadas con cepas nativas. Esta última técnica consiste en elegir de entre las cepas naturalmente presentes en el ambiente del viñedo, de la bodega o durante el proceso, aquellas con características enológicas interesantes para inducir la fermentación. El contar con cepas seleccionadas permite tener procesos controlables y vinos con características distintivas, que realcen la tipicidad de una región. El esquema tradicional para esto se basa en el aislamiento de cepas y su posterior caracterización en aspectos de interés enológico. Un factor frecuentemente relegado es la compatibilidad entre cepas, es decir, que no exista inhibición de las BAL por parte de las levaduras o viceversa.

Por otro lado, el amplio desarrollo que se ha tenido en las técnicas moleculares durante los últimos años ha permitido que éstas sean empleadas con distintos fines durante los procesos de selección, desde el estudio de poblaciones *in situ* y la identificación de cepas nativas, hasta la elucidación de los mecanismos que determinan la supremacía fenotípica de algunas cepas en vinificación. Estudios transcriptómicos realizados en las principales especies enológicas (*S. cerevisiae*, *O. oeni* y *L. plantarum*), han revelado que genes que codifican para proteínas de choque térmico (*hsp*), estrés oxidativo y ciertos factores de transcripción, favorecen una rápida adaptación y mejor eficiencia fermentativa en condiciones de vinificación. Asimismo, se han observado genes con efecto regulador de vías metabólicas que pueden modificar el perfil aromático de los vinos. Al tratarse de mecanismos regulados a nivel de transcripción, éstos pueden verse modificados por diferencias en composición y condiciones del medio fermentativo. De forma similar, las cepas empleadas y las posibles interacciones entre microorganismos, podrían jugar un papel importante en la regulación de dichos mecanismos de transcripción.

Si bien los estudios de selección de cepas enológicas han sido efectuados ampliamente a nivel mundial, diversos aspectos han sido considerados sólo parcialmente. La selección típicamente se enfoca ya sea sólo a levaduras o a BAL dejando de lado las interacciones entre éstas, por lo que el efecto que cada tipo de microorganismo puede ejercer sobre el otro aún no ha sido totalmente descifrado. Particularmente, el impacto en características sensoriales y la expresión de genes de asociados a características de interés enológico no ha sido evaluado. En particular, en México se desconoce el potencial de cepas nativas para la elaboración de vinos, la tipicidad que pueden aportar y el tipo de interacción que pueden presentar.

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue seleccionar cepas de BAL y levaduras *Saccharomyces* en empresas vitivinícolas queretanas con base en aspectos de interés enológico y compatibilidad levadura-BAL. Asimismo determinar la eficiencia, calidad, perfil aromático y el efecto en expresión genética de tales interacciones entre cepas nativas.

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. El vino

2.1.1. Generalidades

De acuerdo con la organización internacional de la viña y el vino (OIV) desde el año 2003 y hasta la fecha se define al vino como la bebida resultante de la fermentación alcohólica completa o parcial de la uva fresca, estrujada o no, o del mosto de uva cuya graduación alcohólica adquirida debe ser superior a 8.5 % en volumen. Se consideran sus orígenes hacia el 3000 a. C. en la región del Cáucaso, actualmente Turquía, Siria e Irán (McGovern, 2003). Desde la antigüedad se le atribuyen diversos beneficios a la salud y a hasta la fecha es de gran importancia económica, social y cultural en todo el mundo (Bisson *et al.*, 2002).

2.1.2. Producción e importancia económica

2.1.2.1. Mundial

El vino acompaña a la humanidad desde hace más de 7000 años, siendo pieza fundamental en la cultura, principalmente en países del viejo mundo (Fálder, 2003). Este negocio está valuado en cerca 300 mil millones de dólares, con un volumen que supera 243 millones de hectolitros para el año 2016 (OIV, 2017). De éstos, Europa aporta 65 %, Estados Unidos y Latinoamérica en conjunto aportan cerca de 18 %, Sudafrica, Australia y China cada uno aporta aproximadamente 5 %. Los principales países productores de vino en el mundo son Italia, Francia, España, Estados Unidos (EE.UU.) y China (OIV, 2017).

Respecto al consumo de vino, a nivel mundial se observa que en países históricamente muy productores como Francia, Italia y España el consumo en las últimas décadas ha sufrido un descenso. En contraste, en países poco productores como EE.UU. o México, el consumo *per capita*, si bien sigue siendo bajo, ha ido incrementándose durante los últimos 10 años (OIV, 2017). Actualmente la preferencia de los consumidores, se inclina hacia el vino tinto, debido principalmente a la difusión

de sus atributos a la salud, por lo que la tendencia general es aumentar la producción y mejorar la calidad de éste (Bisson *et al.*, 2002).

2.1.3.2. Nacional

México ocupa el 31º lugar en producción de uva a nivel mundial, destinando alrededor de 32,000 ha a este cultivo, cerca de 24 % se destinan a producir vino generando alrededor de 20 millones de litros al año (Ortíz de Zarate, 2017; CMV, 2017). En esta actividad destacan los estados de Baja California, Zacatecas, Coahuila y Querétaro, este último produciendo anualmente alrededor de 27 mil toneladas de uva y 3 millones de botellas de vino (El financiero, 2017a). En el país se distinguen tres regiones vitivinícolas, distribuidas como se muestra en la Figura 2.1 (FOCIR, 2005):

- *Zona norte*: De los vinos elaborados en México, 83 % son producidos en esta zona, considerada la más importante del país, ésta comprende los estados de Baja California y Sonora. Es conocida como la franja del vino y sus características climáticas permiten obtener cosechas de máxima calidad.
- *Zona Comarca Lagunera*: Abarca 4 % de la producción vinícola del país y comprende los estados de Coahuila y Durango
- *Zona Centro*: Incluye los estados de Aguascalientes, Guanajuato, Querétaro y Zacatecas, abarcando 13 % de la producción nacional.

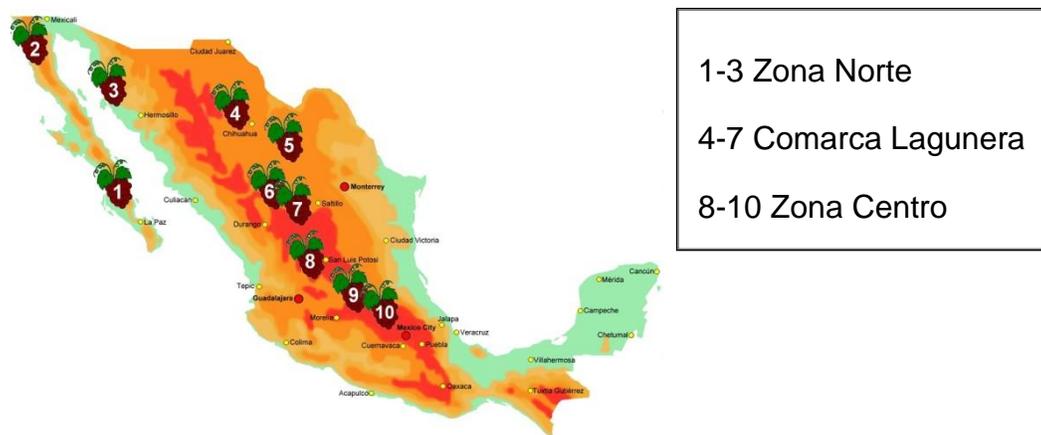


Figura 2.1 Distribución de las zonas vitivinícolas en México.

El mercado del vino en México se encuentra en crecimiento, tanto en producción nacional como en consumo, alcanzando para 2016 una producción de 18.9 millones de hectolitros. Adicionalmente, este mismo año el vino nacional superó por primera vez al vino español en consumo interno al alcanzar 33.9 % de las ventas, contribuyendo con 29.2 % del valor total del mercado, seguido de España con 22.7 % y Chile con 12.8 % (El financiero, 2017b). Por su parte, el consumo *per capita* anual ha aumentado hasta alcanzar 750 mL, y se espera que continúe creciendo a una tasa sostenible de 10 a 12 % para los próximos años (Ortiz de Zarate, 2017).

2.1.3.3. Regional

El estado de Querétaro cuenta con características favorables de clima y suelo para el cultivo de la vid y la obtención de vinos de calidad. Entre los frutos perennes del estado de Querétaro la producción de uva (2943 Ton) ocupó el primer lugar en 2017, seguida de la tuna (698 Ton) y la manzana (680 Ton) (SIAP, 2017). Los principales municipios productores son: Ezequiel Montes, El Marqués, Tequisquiapan, San Juan del Río y Colón, donde se encuentran bodegas como Freixenet de México, La Redonda, Viñedos Azteca, entre otras. Las principales variedades cultivadas son: ‘Cabernet Sauvignon’, ‘Malbec’, ‘Merlot’, ‘Syrah’, ‘Cabernet Franc’, ‘Pinot Noir’, ‘Tempranillo’, ‘Chardonnay’, ‘Ungi Blanc’, ‘Muscat Blanc’ y ‘Macabeo’ (Martínez-Peniche, 1995).

Actualmente, Querétaro ocupa el segundo lugar en producción de vino de mesa y el primer lugar nacional en producción de vino espumoso, aumentando cada vez más el número de empresas productoras establecidas en el estado (El Financiero, 2017b), con lo que la vitivinicultura parece ir resurgiendo de manera prometedora, sin embargo, existen aún problemas por resolver. Entre ellos, la uva obtenida generalmente presenta una elevada acidez y una insuficiente acumulación de azúcares, lo que impide obtener una graduación alcohólica propia de vinos de calidad (De la Cruz de Aquino, 2012). Esto propicia que se recurra a técnicas como la sobremaduración de los frutos en la planta, proceso que repercute en el rendimiento y propicia cambios indeseables en el vino, como la pérdida de aromas y acidez (Togores, 2006).

2.1.2. Clasificación

El vino puede clasificarse de acuerdo a su color, contenido de azúcar, tiempo de crianza, contenido de gas carbónico o por denominaciones de origen, entre otras. Dentro de las clasificaciones más utilizadas se encuentran las siguientes (OIV, 2012b):

a) Contenido de azúcar:

- Seco, si su contenido de azúcar residual es igual o inferior a 4 g/L o a 9 g/L, si la acidez total en ácido tartárico no es inferior en más de 2 g/L al contenido de azúcar residual.
- Semiseco, si se supera la cifra del párrafo anterior con tope máximo de 12 g/L o de 18 g/L cuya acidez total en ácido tartárico no sea inferior en más de 2 g/L al contenido de azúcar residual.
- Semidulce, cuando supera la cifra anterior con un máximo de 45 g/L.
- Dulce, si el contenido de azúcar residual es superior a 45 g/L.

b) Color:

- Blanco: Procedente del mosto de uva blanca o tinta con pulpa no coloreada y evitando la maceración.

- Tinto: Procedente de mostos de uvas tintas con proceso de maceración, al menos con 50 % de variedades tintas.
- Tinto de doble pasta: Procedente de uvas con hollejos muy tintos o uvas de pulpa tinta, en las que el color se consigue con el propio hollejo o el añadido.
- Rosado: Procedente de uva tinta o mezcla de tintas y blancas, cuyos mostos se fermentan sin orujos, al menos con 25 % de variedades tintas.
- Clarete: Procedente de mostos de mezclas de uvas blancas y tintas o de sus mostos y cuya fermentación se hace en presencia de hollejos tintos, al menos con 25 % de variedades tintas.

2.2. Composición del vino

El vino se encuentra constituido principalmente por agua, etanol y compuestos minoritarios, entre ellos: otros alcoholes, ácidos orgánicos, azúcares, vitaminas, compuestos fenólicos, nitrogenados y volátiles, cuya presencia y proporción determinan su calidad (Figura 2.2). Gracias a técnicas cromatográficas como HPLC y GC/MS, se han identificado más de 500 compuestos en los vinos, la mayoría en concentraciones inferiores al límite de percepción sensorial para el humano (Jackson & Lombard, 1993).

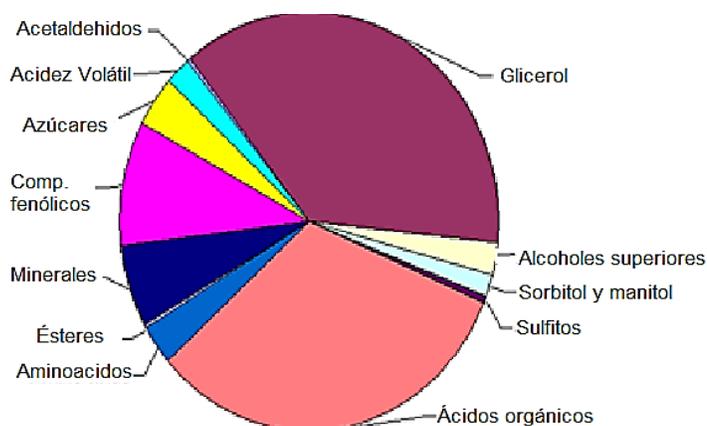


Figura 2.2 Proporción de los compuestos químicos minoritarios presentes en el vino tinto (Waterhouse 2005).

2.2.1. Alcoholes

Después del agua, el etanol es el compuesto más abundante en el vino, conteniendo de 10 a 16 %. Éste es producido principalmente por la fermentación realizada por las levaduras, las cuales requieren aproximadamente 18 g/L de azúcar para producir 1 % de etanol. Se considera que el contenido máximo de alcohol en el que pueden sobrevivir las levaduras es de 16 %, aunque en condiciones de laboratorio algunas pueden resistir hasta 18 % (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006)

Los alcoholes superiores (con más de dos átomos de carbono) se producen durante la fermentación alcohólica (FA) y llegan a alcanzar concentraciones de 150-420 mg/L en el vino. Estos alcoholes y sus ésteres tienen olores que juegan un papel importante en los aromas del vino. Los principales son el isobutilo (metil-2-propanol-1) y los amilo alcoholes (mezcla de metil-2-butanol-1 y metil-3-butanol-1) (Tao *et al.*, 2008). El contenido de alcoholes superiores en el vino varía en función de las condiciones de fermentación, y de manera especial en función de las especies y cepas de levadura presentes. En general, aquellos factores que aumenten la tasa de fermentación (biomasa, oxigenación, temperatura y nutrientes) también incrementan la formación de alcoholes superiores (Styger, 2013).

El glicerol es el polialcohol predominante en el vino; es el producto más abundante de la fermentación después del etanol y el dióxido de carbono. Sus concentraciones van de 4 a 10 g/L en el vino seco (Ribéreau-Gayon *et al.* 2006). Éste favorece la calidad del vino, gracias a las sensaciones de suavidad y viscosidad que produce en boca. Entre los factores que afectan los niveles de glicerol en el vino está la madurez de la uva, la microbiota nativa, la cepa inoculada, el pH, la temperatura de fermentación y las fuentes de nitrógeno (Scanes *et al.*, 1998).

2.2.2. Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos realizan importantes contribuciones a la composición, estabilidad y cualidades organolépticas de los vinos, especialmente los blancos; por su

parte, los vinos tintos se prefieren de baja acidez. Se pueden distinguir dos orígenes de los ácidos presentes en el vino, los procedentes de la uva, como el ácido tartárico, málico, cítrico, glucónico, cumárico y caféico. Así como, aquellos originados por los microorganismos durante la fermentación, como el ácido láctico (L+ y D-), pirúvico, succínico y acético (Kennedy, 2008). Entre ellos destacan:

El ácido tartárico es conocido como el ácido del vino, en mostos y uvas maduras las concentraciones van de 2 g/L a 6 g/L (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). El ácido L-málico (dicarboxílico) en las uvas puede llegar a 25 g/L antes del envero (cambio de coloración). Su concentración tiende a disminuir conforme el fruto madura, su bajo contenido puede llevar a obtener vinos “planos” y su presencia elevada otorga un sabor amargo (Togores, 2006). Es consumido y transformado a ácido láctico por bacterias ácido lácticas (BAL) durante la fermentación maloláctica (FML).

El ácido láctico es un ácido monocarboxílico con enantiómeros L (+) y D (-), es de origen principalmente bacteriano, producido en su mayoría por BAL. El isómero L, el más abundante en el vino, proviene de la FML, mientras que el isómero D se origina por la fermentación de azúcares y puede ser utilizado como indicador de contaminación bacteriana durante la FA (Lonvaud-Funel, 2006). También las levaduras contribuyen en la generación de ácido láctico durante la FA, pero su aporte total es mínimo comparado con el de las bacterias.

El ácido acético es producido en pequeñas cantidades por las levaduras (< 300 mg/L). En las concentraciones adecuadas favorece el perfil aromático y es importante en la producción de acetatos de éster que le dan un carácter afrutado al vino (Villamor, 2013). Si éste excede esos límites otorga un sabor amargo y corrompe los olores; además elevados niveles de éste ácido indican contaminación del mosto o el vino con bacterias acéticas o lácticas (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

2.2.3. Compuestos fenólicos

Los fenoles son un grupo grande y complejo de compuestos de gran importancia en la calidad de los vinos, particularmente tintos, ya que contribuyen a su color, sabor, sensaciones en la boca y propiedades antimicrobianas. Químicamente son compuestos cíclicos del benceno con uno o más grupos hidroxilo asociados directamente en la estructura de anillo. Aunque pueden provenir de microorganismos y la madera durante la crianza, la mayoría son derivados de la uva. Los fenoles presentes en uvas y vino pueden separarse en dos grupos flavonoides y no-flavonoides (Jackson & Lombard, 1993).

2.2.3.1. Flavonoides

Los flavonoides del vino se originan en el fruto, encontrándose principalmente en el epicarpio y las semillas. La cantidad en el fruto varía en función del cepaje, las condiciones climáticas, la madurez del fruto, etc. Y su presencia en el vino se ve afectada por el pH, el tiempo y la temperatura de maceración. Los más abundantes son flavanoles, taninos y las antocianinas (en vinos tintos). Pueden existir libres, polimerizados con otros flavonoides, azúcares, no-flavonoides, o combinaciones de éstos (Kennedy, 2008). Los antocianos son los pigmentos responsables del color de los vinos tintos. Su producción en el fruto se relaciona con la temperatura, exposición al sol y la puesta del envero. Los flavanoles (taninos o flavan-3-Ol) están presentes en el fruto como monómeros y oligopolímeros, localizados principalmente en las semillas, tallo y hollejo (Ojeda, 2007).

2.2.3.2. No flavonoides

Son estructuralmente más simples que los flavonoides, pero sus orígenes son más diversos. En vinos no añejados en roble, el principal tipo de no-flavonoides se deriva de los ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinámicos, que se almacenan en el hollejo y son extraíbles mediante el estrujado (Kennedy, 2008).

Algunas sustancias sintetizadas por las plantas en respuesta al estrés (fitoalexinas) pertenecen a la familia de los estilbenos. Dentro de éstos, en la uva se

encuentra el resveratrol, bajo su forma *trans* y de su derivado glicosilado. Su concentración varía entre 0 y 10 mg/L en vino tinto, y entre 0 y 1.3 mg/L en vinos blancos. Este compuesto tiene acción antioxidante y actividad anticarcinogénica (purificado), por lo que su contenido resulta de interés para los consumidores (Jackson & Lombard 1993).

2.2.4. Compuestos volátiles

Los ésteres se forman cuando un grupo funcional alcohol reacciona con un grupo ácido. En las uvas su presencia es limitada y en el vino tienen dos orígenes: esterificación enzimática durante la fermentación, y esterificación química durante la crianza (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

El acetato de etilo es el éster de mayor prevalencia en el vino debido a la gran cantidad de etanol presente, una pequeña cantidad se forma por las levaduras, pero la actividad aeróbica de las bacterias acéticas produce grandes cantidades, es éste el principal responsable del olor avinagrado. Su umbral de percepción olfativa es de aproximadamente 160 mg/L, incluso menor y, si bien puede estropear el *bouquet* del vino, a dosis muy bajas (50-80 mg/L) favorece la complejidad olfativa del vino y puede tener impacto positivo en la calidad (Cordenete *et al.*, 2012).

Los acetatos de etilo de ácidos grasos, principalmente caproato y caprilato de etilo son producidos por las levaduras durante la FA en cantidades elevadas, pero durante el envejecimiento se hidrolizan y las concentraciones tienden a disminuir. Estos compuestos tienen olores agradables de cera y miel que contribuyen a la finura aromática de los vinos blancos, están presentes en concentraciones totales de unos pocos mg/L (Robinson *et al.*, 2014).

Los ésteres acéticos de alcoholes superiores (acetato isoamílico y acetato de fenil-etilo) están presentes en cantidades moderadas, pero tienen intensos olores como a plátano y a manzana. La formación de estos ésteres se promueve cuando la fermentación es lenta, debido a la ausencia de oxígeno, bajas temperaturas y mostos clarificados (Styger, 2011).

El lactato de etilo se vincula a la fermentación maloláctica, debido a la formación de ácido láctico durante esta etapa y a que se requiere la participación de una esterasa de origen bacteriano para su producción. Sus aromas dan toques lácteos que recuerdan a la mantequilla e incluso a leche agria (Cordenete *et al.*, 2012).

En general, la formación de ésteres continúa a lo largo del proceso de envejecimiento gracias a la presencia de los diferentes ácidos presentes en el vino aunados a las grandes cantidades de etanol. El contenido de ésteres alcanza aproximadamente 30 % del límite teórico después de un año, 50 % después de dos o tres años y 80 % después de 50 años. La concentración total de ésteres se rige por la composición y la edad del vino, y varía desde 2 o 3 mEq/L en vinos jóvenes, hasta 9 o 10 mEq/L en vinos viejos (Robinson *et al.*, 2014).

2.2.5. Compuestos tóxicos

2.2.5.1. SO₂

El SO₂ se utiliza para la desinfección y limpieza de las bodegas, en los vinos funge como antioxidante, antimicrobiano y clarificante, por lo que resulta esencial para la vinificación (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Sin embargo, dosis elevadas pueden producir aromas azufrados y provocar daños a la salud del consumidor. Casi 1 % de la población mundial muestra intolerancia o alta sensibilidad a los sulfitos, riesgo más elevado para asmáticos y niños. Por esto, la OIV ha establecido los límites de sulfitos entre 150 a 400 mg/L de SO₂ total de dependiendo del tipo de vino (Artés-Hernández *et al.*, 2003).

2.2.5.2. Ocratoxina A (OTA)

La OTA es una de las micotoxinas más comunes y se le considera un posible carcinógeno en humanos. Es producida por el metabolismo secundario de hongos como *Penicillium* y *Aspergillus*, siendo este último el principal productor en las uvas. En la dieta europea el vino, especialmente el tinto, se ha identificado como la segunda fuente de exposición humana a la OTA, limitándose su tolerancia a 2 g/L en vinos y productos vitícolas (CE N ° 123/2005).

2.2.5.3. Carbamato de etilo

El carbamato de etilo (uretano) es el éster del ácido carbámico producido a partir de la urea bajo condiciones de temperatura elevada, presencia de etanol y bajo pH; compuesto genotóxico y cancerígeno en animales (Pozo-Bayón, *et al.*, 2012). Su formación en el vino se atribuye principalmente a las levaduras, importantes productoras de urea, aunque también las BAL pueden producir precursores como citrulina y carbamil fosfato. En ambos casos, el sustrato inicial es la arginina, uno de los principales aminoácidos presentes en el mosto de uva y el vino (Lehtonen, 1996). Mira de Orduña *et al.* (2001) concluyen que la formación de precursores de carbamato de etilo durante la FML puede reducirse mediante la inoculación con cultivos puros de *Oenococcus*, seguidos de la inactivación bacteriana una vez terminado el proceso.

2.2.5.4. Aminas biogénicas (AB)

Son compuestos nitrogenados de bajo peso molecular formados por la descarboxilación de aminoácidos. Las más comunes en el vino son la histamina, tiramina, feniletilamina, putrescina y la cadaverina. Algunas de sus reacciones adversas incluyen erupciones cutáneas, migraña, hiper- o hipotensión, vómitos, palpitaciones, diarrea, entre otras. La putrescina y cadaverina pueden aumentar los efectos de las otras AB, interfiriendo en su desintoxicación. El etanol y acetaldehído presentes en el vino pueden aumentar sus efectos inhibiendo a las enzimas responsables de su eliminación (Pozo-Bayón *et al.*, 2012).

Las AB pueden encontrarse desde el fruto, pero se cree que la producción mayoritaria ocurre durante la FML, en presencia de cepas que produzcan las enzimas descarboxilasas. Se han encontrado cepas de lactobacilos heterofermentativos (*L. hilgardii* y *L. brevis*) y *Pediococcus* spp. (Landete *et al.*, 2005) productoras de histamina, y *O. oeni* de putrescina (Marcobal *et al.*, 2006).

2.3. Factores que determinan la composición del vino

Desde el cultivo de la vid hasta el proceso de producción, una gran diversidad de factores afectarán la composición y con ello la calidad del vino (Togores, 2006). Algunos

son independientes del enólogo, otros pueden manipularse en el campo y durante la producción (Reynolds, 2010).

2.3.1. Clima y Suelo

El clima y el suelo tienen efectos en las características adquiridas por el fruto durante su desarrollo, las cuales se trasladarán al vino. Gracias a su gran variabilidad alrededor del mundo, estos dos aspectos imparten características particulares, dando lugar a vinos típicos de una región, concepto denominado *terroir* (Martínez De Toda, 2002). Tanto la temperatura, las precipitaciones, la humedad, como la cercanía del océano, ríos o montañas, son todos factores que inciden en la cantidad y la calidad de la uva. Las características químicas que más se ven afectadas por estas variables son la acidez, el contenido de nitrógeno, la acumulación de azúcares y de polifenoles (Kennedy, 2008).

2.3.2. Manejo del viñedo

Se dice que la calidad de un vino depende en más de 50 % de la calidad del fruto a la entrada en la bodega. La viticultura, tiene por objetivo conjugar vides con los elementos variables de un viñedo (suelo, nutrientes, luz, agua, etc.), de una forma equilibrada para la obtención de la mejor uva (Togores, 2006).

Uno de los factores que mayormente afecta en el manejo del cultivo es la poda, esta busca modificar el crecimiento natural de la vid eliminando de partes de ésta, para alcanzar objetivos específicos, como incitar a la fructificación, aumentar la irradiación solar de los racimos o moderar los rendimientos. Las cepas de mayor altura de tallo presentan una menor producción de uva y las de menor tallo ofrecen una mayor producción (Minguez, 2010).

Otro factor es el riego, éste junto con la fertilización favorecen el desarrollo vegetativo, a costa de mermar la calidad de la materia prima, ya que en términos generales se sabe que un ligero estrés hídrico y terrenos pobres mejoran la calidad de los vinos aumentando la concentración de azúcares y polifenoles presentes en la uva (Kennedy, 2008).

El control de plagas y enfermedades incide directamente en la calidad de los frutos y por ende de los vinos. Algunos de los defectos en los vinos, como aromas mohosos, picaduras lácticas, acéticas o la presencia de compuestos tóxicos como OTA son ocasionados por la actividad de microorganismos que puede controlarse desde el campo (Minguez, 2010).

2.3.3. Cepaje (cultivar) y portainjerto

Existen más de 10, 000 variedades reconocidas de *Vitis vinifera* que muestran diferencias entre ellas en aspectos como los compuestos aromáticos presentes, niveles de acidez, grosor y color de la cáscara; además de su comportamiento en la viña, periodo de madurez, densidad de los racimos, vigorosidad, etc. Algunos de los cepajes más ampliamente utilizados para la vinificación son (Galet, 2000):

- ‘Cabernet Sauvignon’: De origen francés, da una producción regular y constante, con racimo y grano pequeño, piel de color azul-violáceo, pulpa consistente. Sus vinos son de color rojo intenso, alcohólicos, aromáticos y con una buena estructura tánica, muy aptos para el añejamiento.
- ‘Merlot’: De brotación precoz, sensible a las heladas y a la sequía. Racimo mediano, más o menos esparcido. Produce vinos de color rojo rubí bastante intenso, ricos en alcohol y en color, estructurados con buenos taninos para el añejamiento.
- ‘Syrah’: Variedad originaria de Francia da racimos medio-pequeños y bayas ovoideas, pequeñas. Se elaboran vinos finos, de color intenso, aromáticos, tánicos y poco ácido; con grandes cualidades para el añejamiento..

Algunas otras variedades importantes a nivel mundial incluyen tintas como ‘Pinot noir’, ‘Malbec’, ‘Garnacha’ y ‘Cabernet franc’, así como las blancas ‘Chardonnay’, ‘Muscatel’, ‘Sauvignon’ y ‘Macabeo’.

Los portainjertos se utilizaron originalmente para combatir la filoxera en Europa, están formados por otros miembros de la familia de las vitáceas como *V. labrusca*, *V. riparia*, *V. berlandieri* y sus híbridos (Galet, 2000). El portainjerto es la parte que da

origen al sistema radical de la vid, regulando el alimento y por lo tanto la calidad de la variedad implantada sobre él, además de brindarle resistencia a sequía, a suelos calcáreos, a ciertas plagas de la raíz, humedad permanente, modulan la asimilación de nutrientes del suelo y pueden incluso modificar la microbiota asociada al suelo (Marasco *et al.*, 2018).

2.3.4. Proceso de vinificación

Si más de 50 % de la calidad de un vino se determina en el campo, el porcentaje restante lo determina el procesamiento, es decir todas las posibles variaciones que se pueden tener en la vinificación otorgarán al vino características sensoriales diferentes y en cada una de ellas se pueden realizar modificaciones a fin de obtener un producto distinto, original y de mejor calidad. Estas prácticas se describen de manera general en la Tabla 2.1 (Togores, 2006).

Tabla 2.1 Etapas de la vinificación y algunas alternativas que influyen en la calidad del vino.

Etapa de procesamiento	Alternativas
Vendimia	A mano o mecánicamente
Despalillado	Puede o no efectuarse
Anhídrido sulfuroso	Adición o no, a la vendimia, al mosto o ambas.
Tipo de vinificación	Tinto, blanco, rosado, maceración carbónica, termovinificación.
Fermentación maloláctica	Puede o no efectuarse
Inoculación de microorganismos fermentativos	Fermentación espontánea, levadura seca activa comercial, cultivos nativos seleccionados.
Métodos de clarificación	Colas proteicas, enzimas, filtración
Conservación y maduración	Uso o no de bodega, tipo de bodega, tiempo transcurrido.

2.3.5. Los microorganismos y las etapas microbiológicas

La vinificación es un proceso esencialmente microbiológico que dependerá en gran medida de los microorganismos presentes o que se inoculen durante su elaboración (Belda *et al.*, 2017). De manera natural en la uva y en las bodegas se encuentran bacterias, levaduras y mohos, que pueden impartir características, tanto deseables como indeseables a los vinos producidos. Estos microorganismos tienden a proliferar al inicio de la fermentación, cuando se estrujan las uvas liberando su mosto rico en nutrientes. Conforme avanza la fermentación el medio resulta cada vez más inhóspito, lo que disminuye las poblaciones de los microorganismos menos adaptados, principalmente bacterias y mohos (principales agentes de alteración) además de algunas levaduras, principalmente del tipo no-*Saccharomyces* (Fleet, 2008). Dicho comportamiento se ilustra en la Figura 2.3.

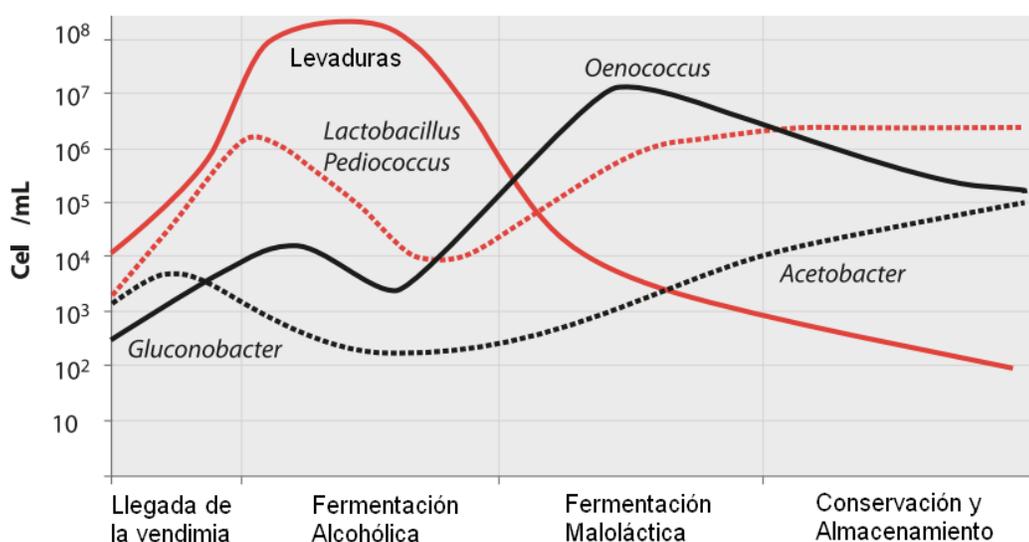


Figura 2.3. Comportamiento de los microorganismos clave presentes durante la vinificación (Morenzoni *et al.*, 2005).

El mosto es un medio más favorable para las levaduras que para los otros microorganismos presentes, ya que éstas desarrollan en anaerobiosis, toleran la presencia de SO_2 , así como elevadas concentraciones de azúcares y etanol. Una vez que han fermentado los azúcares y consumido prácticamente todos los nutrientes

disponibles, las levaduras comienzan su etapa de muerte celular, con lo cual dan pie a que nuevos microorganismos dominen el medio. Entre las BAL, *Oenococcus oeni* es la especie mejor adaptada a ambientes de vinificación, capaz de desarrollar en un medio mínimo en nutrientes, de elevada acidez y etanol (Bauer & Dicks, 2004). Con la prevalencia de esta bacteria tiene lugar la segunda etapa fermentativa en la vinificación conocida como fermentación maloláctica (FML) (Combina, 2005).

2.4. Fermentación alcohólica (FA)

2.4.1. Generalidades

La palabra fermentación proviene del vocablo latín *fervere* que significa hervir. Históricamente, Lavoisier demostró que el azúcar es transformado en alcohol y gas carbónico, Gay-Lussac estableció la ecuación de esta transformación y en 1866, Pasteur demostró que las levaduras son las responsables de realizarla, y es a él a quien se debe el entendimiento de este proceso (McGovern, 2003).

La FA es un proceso biológico anaeróbico, originado por la actividad de algunos microorganismos, en el vino principalmente levaduras, que metabolizan azúcares para obtener: etanol, CO₂ y energía en forma de ATP. El mecanismo de esta transformación se ilustra en la Figura 2.4. Esta vía produce únicamente dos moléculas de ATP por molécula de glucosa, en contraparte con la vía respiratoria que produce 30 a 32 ATPs por molécula de glucosa, por lo que ésta es la vía que menos favorece a la levadura, aunado al hecho que el subproducto de principal interés (etanol) es tóxico y eventualmente resulta en la muerte del microorganismo (Lois & Segal-Kischinevzky, 2010).

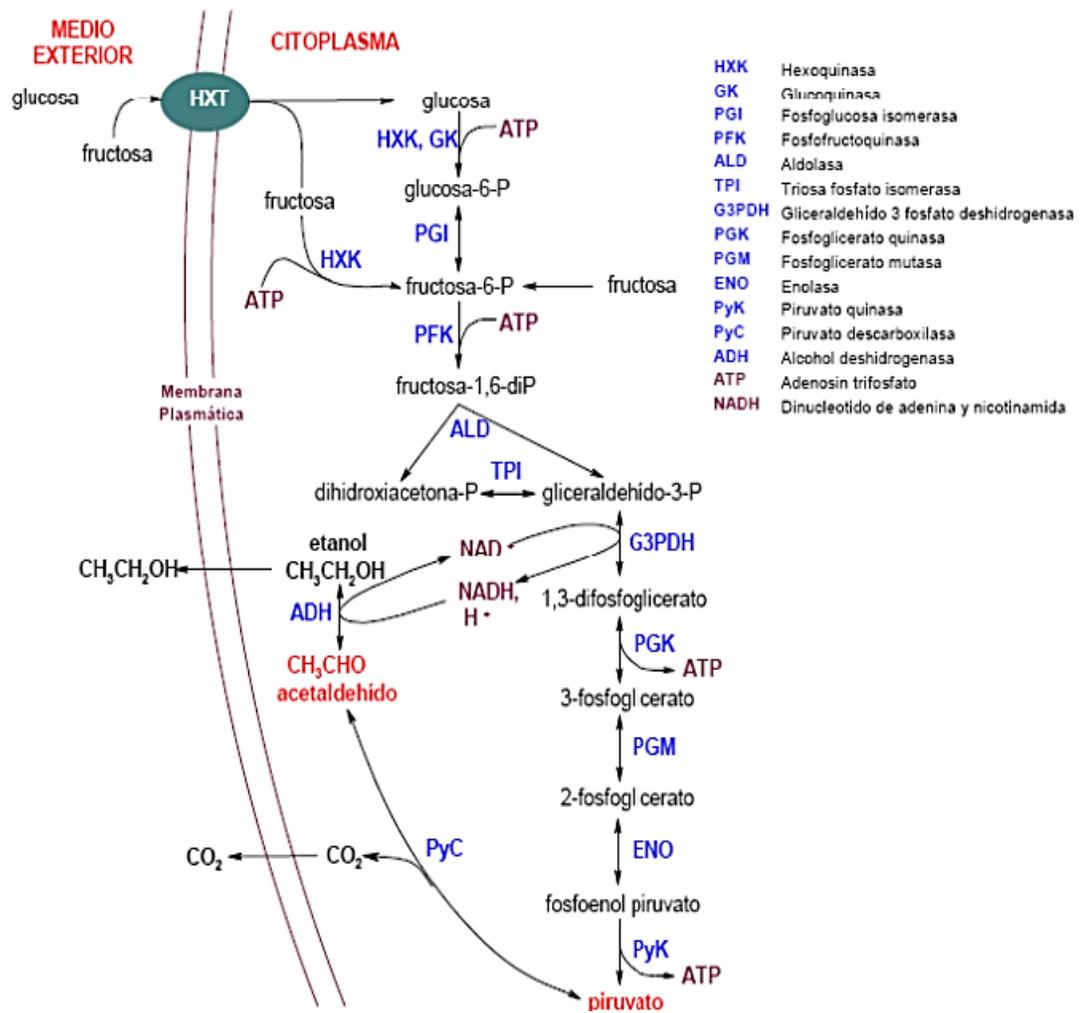


Figura 2.4 Metabolismo de la fermentación alcohólica

2.4.2. Levaduras enológicas

Las levaduras son las eucariotas más simples que existen y tienen una gran diversidad en cuanto a tamaño, forma y color; se definen como hongos unicelulares que se reproducen predominantemente de forma asexual por gemación. De los 100 géneros de levaduras descritas en *The yeast, a taxonomic study*, 15 están asociadas a la elaboración de vinos, e incluyen: *Brettanomyces* y su equivalente *Dekkera*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora* y su equivalente sexual *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Schizosaccharomyces*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces* y por supuesto, *Saccharomyces* (Kutzman,

2011). Esta diversidad es encontrada de manera natural, tanto en los viñedos, como en las bodegas y su presencia en cada localidad depende de una suma de factores químicos, físicos y bióticos (Pretorius, 2000).

En enología se distinguen dos grupos, el de las *Saccharomyces* y el de las No-*Saccharomyces*, constituidas por el resto de los géneros. Dependiendo de la especie y cepa, las No-*Saccharomyces* se asocian tanto a procesos de alteración como al aporte de tipicidad y complejidad aromática del vino, en general son abundantes en estadios iniciales de la fermentación y sólo unas pocas perduran hasta el final (Viana *et al.*, 2008; Styger *et al.*, 2011) (Figura 2.5). Por otro lado, las pertenecientes al género *Saccharomyces* dominan hacia el final de la FA, siendo las principales productoras de etanol y las que presentan mayor tolerancia a este compuesto (Bauer & Pretorius, 2000).

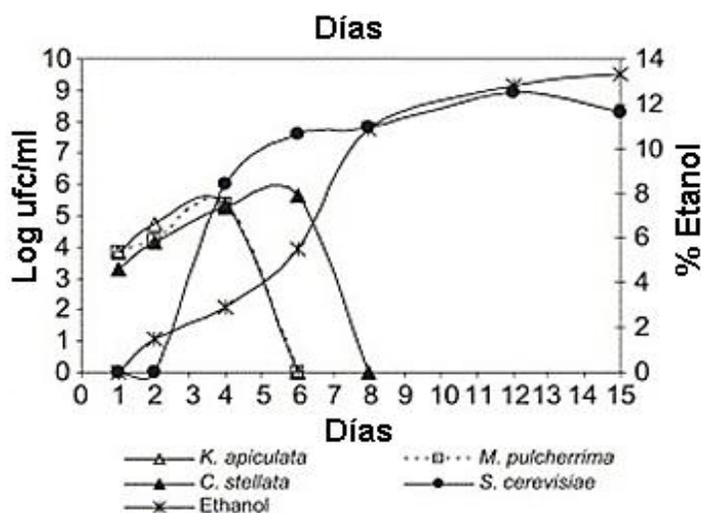


Figura 2.5 Desarrollo de especies de levaduras enológicas y producción de etanol en la fermentación espontánea de mosto de Malbec (Combina *et al.*, 2005).

2.4.3. *Saccharomyces cerevisiae*

Las levaduras *Saccharomyces* se reconocen como el género fermentativo por excelencia, llegando a producir hasta 17 % de etanol. Dentro de éstas, la especie

S. cerevisiae constituye la levadura y el microorganismo eucariótico más estudiado y utilizado en vinificación (Cordero-Bueso *et al.*, 2016).

S. cerevisiae es un hongo ambiental, unicelular que se reproduce típicamente por gemación, sus células son elípticas de entre 5 y 10 μm . Su metabolismo le permite crecer y fermentar tanto en condiciones de aerobiosis como de anaerobiosis. En condiciones aerobias produce biomasa, alcanzando a duplicar su población cada 90 minutos. Por su parte, la máxima producción de etanol es en anaerobiosis, fermentando alrededor de 90 % de los azúcares del medio (Querol *et al.*, 2003; Walker & Stewart, 2016).

2.4.4. Características de selección y mecanismos implicados

Los criterios para seleccionar levaduras enológicas dependerán en gran medida de lo que se busca en el vino producido, así como de las problemáticas a las que se enfrente cada productor o en cada región. Sin embargo, existen características que en general se consideran deseables, las cuales se consignan en la Tabla 2.2 y algunas se describen a continuación (Suarez-Lepe & Morata *et al.*, 2012; Pretorius, 2000).

Tabla 2.2 Características deseables para selección de levaduras.

Propiedades fermentativas	Propiedades tecnológicas	Características en sabor
Iniciación rápida de la fermentación	Alta estabilidad genética	Baja productividad de derivados azufrados
Eficiencia fermentativa elevada	Tolerancia al sulfitado	Baja producción de acidez volátil
Alta tolerancia a etanol	Baja formación de espuma	Liberación de precursores de sabor
Osmotolerante	Propiedades de floculación	Producción elevada de glicerol
Baja temperatura óptima de desarrollo	Sedimentación compacta	Autólisis
Producción moderada de biomasa	Efecto <i>killer</i>	Producción de alcoholes superiores
	Baja demanda de nitrógeno	

a) Eficiencia fermentativa

Se consideran mejores las cepas capaces de producir más alcohol a partir de un mosto con un contenido de azúcar determinado. El interés en este criterio puede variar dependiendo del potencial de los mostos (contenido de azúcares) y el tipo de vino que se busque producir con mayor o menor graduación alcohólica. De cualquier forma se considera que valores de entre 10.5 y 13 % de etanol son óptimos para un vino de mesa (OIV, 2012b). Cada cepa de *S. cerevisiae* muestra diferentes rendimientos durante la fermentación, y en términos generales la eficiencia de conversión de azúcar a etanol se encuentra alrededor de 92 % de rendimiento teórico (18 g azúcar producen 1 grado alcohólico) (Suárez-Lepe & Morata, 2012).

b) Velocidad de fermentación

Si la fermentación es demasiado lenta se corre el riesgo del desarrollo de microorganismos de alteración, y aumentan los costos de producción. Sin embargo, si es muy rápida ocasiona problemas de control, pudiéndose presentar paros de la fermentación, y pérdida de aromas. En términos generales, se busca que una levadura seleccionada se imponga y domine la fermentación lo antes posible. El tiempo de fermentación para vinos tintos varía entre siete y 15 días (Mas *et al.*, 2002).

c) Tolerancia a anhídrido sulfuroso (SO₂)

La adición de este compuesto al mosto es una práctica muy establecida, la cual ejerce una acción selectiva entre las levaduras, siendo cepas de *S. cerevisiae* las que muestran mayor tolerancia. Es deseable que las levaduras sean tolerantes a concentraciones superiores a las utilizadas, para que así puedan iniciar la fermentación rápidamente en mostos sulfitados (Regodón, 1997).

d) Baja producción de H₂S

Este compuesto se forma durante la fermentación por reducción de azufre elemental, sulfatos, sulfitos y azufre orgánico presente en los mostos. El umbral olfativo del H₂S es de los más bajos, variando de 50 a 80 µg/L, concentraciones excedentes originan un olor a “huevo podrido”. Además, durante el almacenamiento puede reaccionar con otros compuestos y originar otros aromas indeseables, por lo que resulta conveniente que el H₂S producido por la fermentación sea mínimo (Regodón, 1997).

e) Efecto *Killer*

Descubierto en 1963 por Bevan y Makower, esta característica o fenotipo se presenta en algunas levaduras, las cuales secretan polipéptidos que resultan tóxicos para otras especies de levaduras e incluso otros microorganismos. Se han definido tres fenotipos de esta característica (Marquina *et al.*, 2002):

- *Killer (K)*. Son resistentes y producen la toxina
- *Neutro (N)*. Son resistentes, pero no son productoras
- *Sensible (S)*. No producen ni son resistentes a la toxina

Este fenómeno ha sido ampliamente estudiado, siendo particularmente importante durante la selección de cepas, ya que la competencia entre fenotipos *K* y *S* llevan a una disminución y posible eliminación de las cepas *S* durante la fermentación. En ese mismo sentido, las levaduras secas activas (LSA) comerciales suelen presentar fenotipo *K*, y debido a su uso generalizado en las bodegas del mundo, se vuelve indispensable verificar que cepas nativas seleccionadas no sea fenotipo *S*, que las haría susceptibles a ser eliminadas por otras cepas nativas o comerciales. Diversos factores pueden afectar la presencia del factor *K*, entre ellos están (Marquina, *et al.*, 2002):

- Condiciones de vinificación: pH, temperatura, sulfitado, presencia de compuestos fenólicos y enzimas pectinolíticas.

- Diferentes grados de sensibilidad y actividad del fenotipo por cepa
- Pérdida del fenotipo durante la conservación

f) Producción de aromas

Además de la sola producción de etanol, *S. cerevisiae* también es capaz de aportar metabolitos secundarios (volátiles principalmente) capaces de permear a través de la membrana celular y contribuir al perfil sensorial de los vinos (Cordenete *et al.* 2012, Belda *et al.*, 2017). De los compuestos volátiles que pueden producirse los más importantes son ésteres, alcoholes superiores y ácidos grasos. Todos ellos derivan de rutas biosintéticas y degradativas de carbohidratos, aminoácidos y de lípidos (Figura 2.6).

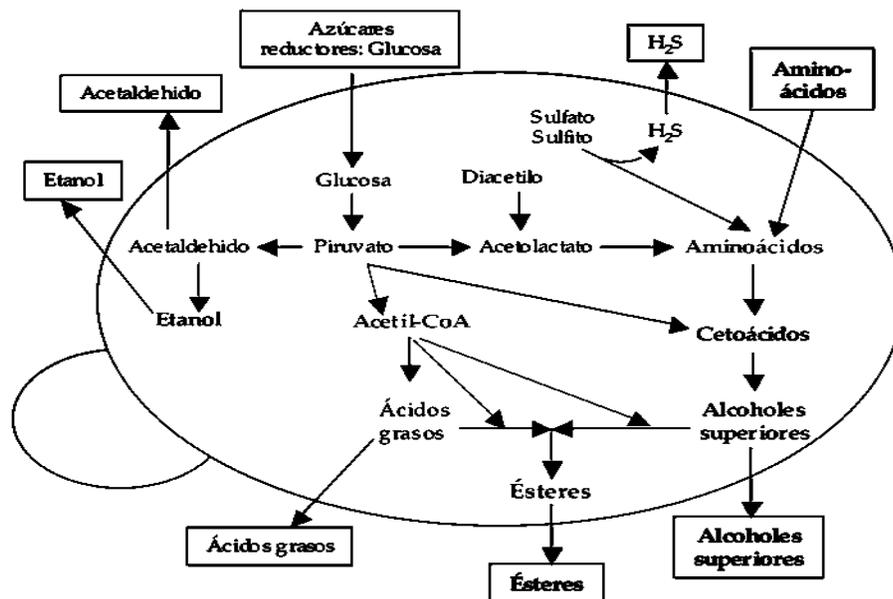


Figura 2.6 Esquema de las rutas metabólicas implicadas en los procesos de síntesis de compuestos aromáticos.

Diferentes cepas de levaduras producen significativamente distintos compuestos aromáticos y los criterios para su selección en el laboratorio suelen estar ligados a su capacidad para impartir ciertos perfiles sensoriales, en función del vino deseado. Las

redes metabólicas asociadas a la producción de estos compuestos son abundantes y complejas. No obstante diversas rutas metabólicas son conocidas en *Saccharomyces* y algunas de éstas han sido asociadas a la producción de compuestos aromáticos. Algunos de los genes implicados en tales vías se describen en revisiones como la de Cordenete *et al.* (2012) y en trabajos científicos como el de Chiva-Thomas (2010) y Styger *et al.* (2011 y 2013).

2.5. Fermentación Maloláctica (FML)

2.5.1. Generalidades

El papel más beneficioso conocido de las BAL en los vinos es la FML, que como ya se ha mencionado es la conversión de ácido L-málico (dicarboxílico) en L-láctico (monocarboxílico), que típicamente se presenta de manera secuencial a la FA. Esta conversión puede ocurrir mediante tres rutas metabólicas en las BAL. Una es la conversión del ácido málico en pirúvico, que es luego reducido por una lactato deshidrogenasa, ésta vía se ha visto en *Lactobacillus casei* y *Enterococcus faecalis*. Otra vía encontrada en *Lactobacillus fermentum* involucra la reducción del malato a oxalacetato por la malato deshidrogenasa, seguido de una descarboxilación a piruvato y posterior reducción a malato. La tercera, que es la típica del proceso de vinificación y es la ruta metabólica seguida por *O. oeni* y *L. plantarum*, es una conversión directa por acción de una malato descarboxilasa conocida como enzima maloláctica, y es acompañada por la producción de CO₂, lo que genera el burbujeo de la llamada segunda fermentación (Figura 2.7) (Labarre 1996). El beneficio fisiológico de este proceso dentro de las BAL, es la generación de una fuerza motriz de protones que deriva en la activación de una ATPasa de membrana, generando ATP y un equilibrio en el pH intracelular (Konings, 2002).

En el vino, el principal beneficio de la FML es la reducción de acidez; al pasar de un ácido dicarboxílico a uno monocarboxílico se incrementa ligeramente el pH. También se ha comprobado que la FML brinda una mayor estabilidad microbiológica, pues las

fuentes energéticas que pudieron haber quedado tras la FA son consumidas por las BAL. Más aún, la acción microbiológica es acompañada por la producción de metabolitos secundarios, entre ellos múltiples compuestos volátiles de impacto aromático, que ocasionan importantes cambios en la calidad del vino, amalgamando de una mejor forma el gusto y aroma del vino, mejorándolo en general (Grimaldi *et al.*, 2005; Bartowsky & Borneman, 2011; Capello *et al.*, 2017). Hoy en día la FML es considerada esencial en vinificaciones tintas y para algunas en blanco (Bartowsky *et al.*, 2015).

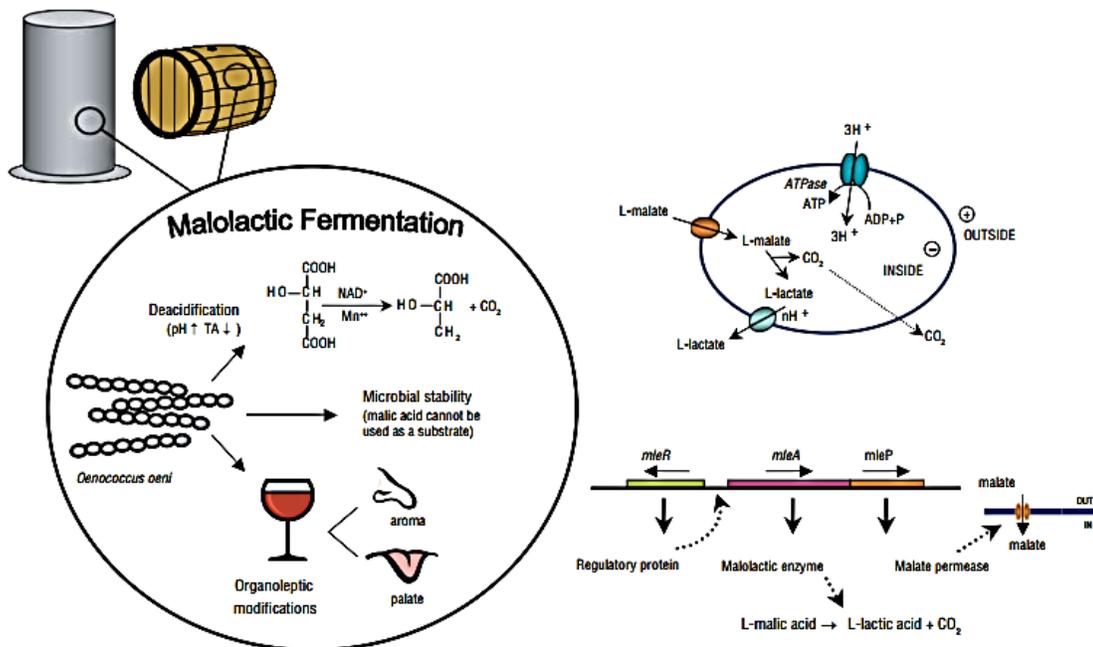


Figura 2.7 FML, conversión de L-málico a L-láctico y CO₂ por la enzima maloláctica de células de BAL como *Oenococcus oeni* y *Lactobacillus plantarum*

El incremento en el interés enológico por este proceso recae en su impacto sobre la calidad del vino (Liu, 2002). Es necesario estudiar los factores que limitan la FML, las interacciones que surgen entre los diferentes microorganismos participantes, así como el potencial riesgo de producción de algunos compuestos tóxicos como aminas biogénicas y precursores de etil carbamato que pueden afectar su inocuidad (Araque

et al., 2009). Es así que en algunos estudios, haciendo uso de la información global generada hasta el momento, se plantean diversas estrategias con la finalidad de controlar y mejorar la FML (Vila-Crespo *et al.* 2010):

2.5.2. Bacterias ácido lácticas (BAL) de importancia enológica

Las poblaciones de BAL dependerán de la zona en que se encuentre el viñedo, así como de los reservorios que se encuentren en las bodegas, el equipo de procesamiento y la tonelería usada (Bokulich *et al.*, 2013). Aunque un bajo número de bacterias malolácticas ha sido detectado en vides durante la cosecha, niveles significativos suelen presentarse durante el procesamiento y la fermentación. Los tipos de BAL que se encuentran en los mostos y los vinos incluyen principalmente *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Oenococcus*. Destacan ciertas cepas de *O. oeni* que prevalecen y dominan en el proceso, pese a las deficiencias en nutrientes y compleja composición química del vino (contenido en etanol > 12 % v/v), bajo pH (< 3.5) y alta concentración de SO₂ (> 30 mg/L) (Lerm *et al.*, 2010).

Cuando las condiciones son distintas (elevado pH) puede favorecerse el desarrollo de otras especies (*Pediococcus* y *Lactobacillus*) asociadas a deterioro. Y ello conlleva a la producción de niveles excesivos de ácido láctico y menores de alcohol (picadura láctica), así como producción de compuestos indeseables, tales como ácido acético, concentraciones elevadas de diacetilo, y acroleína, que generan olores “ratunos”, “sudorosos”, “avinagrados”, “grasosos” y con resabios amargos (Bartowsky, 2009).

Si bien la FML puede ocurrir de manera espontánea, se logra un mayor control en el tiempo y establecimiento de ésta mediante la inoculación con un cultivo bacteriano seleccionado, típicamente de *O. oeni* (Couchenehy *et al.* 2005).

2.5.3. *Oenococcus oeni*

Oenococcus oeni es una bacteria Gram positiva perteneciente al grupo de las BAL, con un cromosoma de 1932 kb. Anteriormente era conocida como *Leuconostoc oenos*, hasta que en 1995 fue reclasificada en un nuevo género, debido a singularidades como su carácter acidófilo y su presencia casi exclusiva en ambientes enológicos. Se distingue también de *Leuconostoc* spp. por su crecimiento a un pH inicial de 4.8, en medios que contienen 10 % (vol / vol) de etanol, por requerir (la mayoría de cepas) un factor de crecimiento “de jugo de tomate” (ácido pantoténico) y su falta de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa NAD-dependiente (Dicks *et al.*, 1995). Esta especie es de gran importancia para la industria del vino. Las principales características buscadas para su selección, así como los mecanismos genéticos asociados, se enumeran a continuación.

2.5.4. Características para la selección de *O. oeni*

a) Metabolismo del ácido málico

Las cepas de *O. oeni* varían en su capacidad para metabolizar ácido L-málico, esta habilidad constituye el principal criterio de selección. El metabolismo de este ácido en *O. oeni* es por descarboxilación directa, mediante la enzima maloláctica, con NAD y Mn^{2+} como cofactores (Figura 2.7). Los genes que codifican la enzima maloláctica (*mleA*), la malato permeasa (*mleP*) y una proteína reguladora (*mleR*) se han clonado, secuenciado y estudiado en *O. oeni* (Bartowsky, 2005 y 2011).

b) Adaptación a estrés

La inducción de la FML por inoculación con cepas no es siempre exitosa, debido al ambiente hostil que representa el vino (Morenzoni *et al.*, 2005). El conocimiento de la fisiología a nivel molecular de *O. oeni* en condiciones de estrés puede ser utilizado para generar herramientas de selección. El incremento en la expresión de genes como *hsp18*, que codifica a Lo18, es un indicador del estrés en cepas de *O. oeni* que se ha asociado con un aumento en el metabolismo de ácido málico, así como con una mejor adaptación a medios con bajo pH y escasos nutrientes

(Coucheney *et al.*, 2005). Otros genes (*clpX* y *trxA*) han sido clonados y estudiados por su papel en respuesta al estrés (Jobin *et al.*, 1999; Delmas *et al.*, 2001). La expresión de dichos marcadores proporciona información respecto al estado fisiológico de la bacteria en estudios de interacciones de levadura-bacteria y podrían ser utilizados para selección de cepas.

c) Producción de compuestos aromáticos y sabores

Esta bacteria tiene una amplia gama de rutas metabólicas para generar compuestos volátiles a concentraciones por encima de su umbral de detección, incluyendo acetatos y sus ésteres, alcoholes superiores, carbonilos, ácidos grasos volátiles y compuestos azufrados (Swiegers *et al.*, 2005).

El diacetilo es un importante metabolito secundario asociado con el metabolismo del ácido cítrico durante las FML inoculadas con *O. oeni*. Este compuesto imparte aromas “mantequillosos” que, en dosis moderadas, dan complejidad al vino durante su añejamiento. Los genes (*alss* y *alsd*) codifican las principales enzimas involucradas en la producción de este compuesto; α -acetolactato sintetasa y α -acetolactato descarboxilasa, respectivamente (Bartowsky, 2011).

Compuestos latentes de impacto aromático y de sabor frecuentemente se encuentran glucosilados y pueden ser liberados mediante procesos enzimáticos. *O. oeni* es productor de glucosidasas que contribuyen a la liberación de numerosos compuestos aromáticos, tales como monoterpenos, norisoprenoides y compuestos alifáticos, los cuales otorgan atributos afrutados y florales al vino, actualmente buscados por los productores (Bartowsky, 2005).

d) Toxicidad

Como ya se había discutido anteriormente (sección 2.2.5), algunas cepas de *O. oeni* pueden producir aminas biogénicas, siendo un criterio de selección la ausencia de los mecanismos que las producen. El gen de la histidina descarboxilasa (*HDC*) de *O. oeni* ha sido clonado y caracterizado, lo que ha permitido el desarrollo de técnicas de PCR para detectar cepas capaces de producir esta amina (Coton y Coton, 2005). La

arginina puede conducir a la producción de carbamato de etilo y putrescina. Ésta se cataboliza a través de la arginina deiminasa (*ADI*), codificada por cuatro genes que han sido bien caracterizados. Estos cuatro genes codifican tres enzimas y una membrana proteína de transporte. Las tres enzimas, arginina deiminasa (*ADI*, codificada por *arcA*), ornitina transcarbamilasa (*OTC*, codificada por *arcB*) y carbamato quinasa (*CK*, codificada por *arcC*) forman un grupo y hay pruebas de que éste se encuentra precedido por una proteína reguladora catabólica (*CRP*) codificada por *arcR* (Tonon *et al.*, 2001). Gracias a la caracterización de estos genes, hoy en día mediante técnicas moleculares simples, puede detectarse la presencia de estos genes en cepas de interés, para asegurar que los microorganismos seleccionados no puedan producir estos compuestos tóxicos.

2.5.5 *Lactobacillus plantarum*

Como se ha mencionado en secciones anteriores, la especie *O. oeni* es la que mejor se adapta a las condiciones más hostiles de vinificación, por ello sigue siendo la especie predilecta para la selección de microorganismos enológicos. No obstante, algunas cepas de *Lactobacillus plantarum* han demostrado un potencial enológico en diversas regiones, siendo Sudáfrica uno de los países pioneros en su uso, mientras que Italia y Argentina trabajan en el área de forma más reciente (Lerm *et al.*, 211; Berbegal *et al.*, 2016; Iorizzo *et al.*, 2016; Lerena *et al.*, 2016). *L. plantarum* es una bacteria bacilar de aproximadamente 0.9–1.2 μm de ancho por 1–8 μm de largo, puede agruparse en cadenas cortas o encontrarse en células individuales. Es anaerobia facultativa y se considera homofermentativa facultativa, ya que fermenta a las hexosas vía metabolismo Embden Meyerhof Parnas (EMP), resultando en la formación de ácido láctico y es únicamente el metabolismo de las pentosas el que produce ácido acético (Todorov & Gombossy, 2010). Esto resulta particularmente interesante para ser considerada como cultivo iniciador en los vinos con pH elevado (>3.5), que son los más expuestos a un aumento de acidez volátil por paradas de fermentación o proliferación microbiana durante la FA (Fumi *et al.*, 2010).

Las características deseables para su selección como cultivo iniciador enológico son las mismas que para *O. oeni*, no obstante el estudio de esta especie es más reciente, por lo que la información respecto a los mecanismos genéticos que intervienen aún no es tan abundante. Los estudios transcriptómicos realizados han visto mecanismos homólogos, encontrando por ejemplo que la expresión del gen de proteína de choque térmico (*hsp1*) se ve incrementada tras la exposición a 8 % de etanol, efecto probablemente regulado por el gen promotor CtsR (Regulador P de la respuesta a estrés canónico clase I y III) (Bokhorst-van de Veen *et al.*, 2011). Por su parte, en el metabolismo de ácido málico, ya se mencionó al igual que *O. oeni* emplea solo la enzima malato descarboxilasa; el gen que codifica para esta enzima en *L. plantarum* fue secuenciado en 2011 por Miller *et al.*

Uno de los principales motivos por los que *L. plantarum* ha tenido cada vez mayor interés como cultivo enológico es que varios estudios han demostrado una mayor presencia de genes que codifican para enzimas asociadas a la producción de aromas, en comparación con cepas de *O. oeni* (Mtshali *et al.*, 2010; Iorizzo *et al.*, 2016). Algunos de estos genes incluyen los que codifican a enzimas β -glucosidasas (*bgl*), proteasas (*HtrA*), esterases (*est*), citrato liasasas (*cit*) y descarboxilasas de ácidos fenólicos (*pad*) (Spano & Massa 2006; Mtshali *et al.*, 2010; Lerm *et al.*, 2011). Ésto apoya la hipótesis de que la utilización de otros cultivos en alternativa a *O. oeni* puede dar lugar a una mayor liberación de componentes aromáticos procedentes de la uva (Fumi *et al.*, 2010).

2.6. Interacciones entre microorganismos fermentativos

Conforme a lo anterior, el proceso de vinificación involucra dos procesos microbiológicos, en la FA son las levaduras las protagonistas y en una segunda fermentación (FML) actúan las BAL. Los tipos de microorganismos involucrados determinarán en buena medida la calidad final del vino, siendo hoy en día aceptado que el uso de cepas nativas seleccionadas favorece la tipicidad de los vinos (Swiegers *et al.*, 2005, Callejon *et al.*, 2010). Por ello, a nivel mundial se sigue trabajando con selección de cepas para la vinificación, pero los enfoques son dirigidos hacia un solo grupo de microorganismos, ya sea a la selección de levaduras (Capece *et al.*, 2014;

Cordero-Bueso *et al.*, 2016) o BAL (Bordas *et al.*, 2013; Garofalo *et al.*, 2015; Iorizzo *et al.*, 2016), dejando de lado la compatibilidad levadura-BAL.

Las interacciones microbianas pueden derivarse tanto del contacto directo (depredación, parasitismo, simbiosis, etc.), como de la presencia de metabolitos extracelulares (Nissen *et al.*, 2003). Este tipo de interacción es el que suele presentarse entre los microorganismos enológicos, llegando a inducir competencia, mutualismo o comensalismo (Liu *et al.*, 2015). En el proceso de vinificación el resultado más frecuente es la inhibición de las BAL causada por las levaduras, esto debido al orden sucesivo que suelen presentar dichos microorganismos (levadura antes que BAL). Y los metabolitos más comúnmente responsabilizados por este efecto han sido el etanol, el SO₂, algunos péptidos, proteínas, ácidos grasos de cadena corta y media (Fleet 2008; Comitini *et al.*, 2005; Nehme *et al.*, 2010). Menos común, pero también posible es que la levadura estimule el crecimiento de BAL, por efecto de la liberación de compuestos como aminoácidos y vitaminas como consecuencia de su autólisis, también se ha demostrado que la biomasa de las levaduras inactivas tiene un efecto “bioadsorbente” de compuestos tóxicos (Fleet, 2003; Guilloux-Benatier & Chasagne, 2003). De forma inversa, las BAL pueden inhibir a las levaduras, ya que pueden secretar proteasas, glucanasas, compuestos como bacteriocinas y ácidos grasos de cadena corta, que pueden degradar las paredes celulares y/o acelerar la muerte de la levadura (Halil *et al.*, 2014; Liu, 2015).

En algunos estudios se ha explorado la interacción de cepas comerciales en vinificaciones sucesivas (Arnink & Henick-Kling 2005, Nehme *et al.*, 2008) y la posibilidad de inoculación simultánea (Muñoz *et al.*, 2014). Sin embargo, sólo unos pocos autores han evaluado las interacciones entre cepas nativas para fines de selección, y han seguido un enfoque un tanto sesgado, es decir observando cómo afectan distintas levaduras a una BAL (Zapparoli *et al.*, 2003) o cómo actúan diferentes cepas de BAL con una levadura determinada (Garofalo *et al.*, 2015). Como se observó en estos estudios, las relaciones dependerán siempre de las cepas evaluadas tanto de levadura como de BAL, por lo que un enfoque de selección conjunta es una estrategia interesante y factible para evaluar.

Con el conocimiento generado por las investigaciones realizadas a nivel mundial en el área, en la actualidad es factible, e incluso recomendable, abordar la selección de microorganismos nativos en forma conjunta. Nuestro grupo de trabajo ha reportado previamente el potencial enológico de levaduras nativas, contando así con un conjunto de cepas candidatas a ser seleccionadas, mientras que respecto a las BAL se desconoce diversidad, abundancia y potencial enológico de éstos microorganismos nativos de zonas vitivinícolas nacionales.

HIPÓTESIS

La selección conjunta de levaduras y BAL nativas queretanas permitirá obtener combinaciones de cepas que interaccionen positivamente, generando eficiencias fermentativas comparables con la de cepas comerciales y que den a los vinos producidos en Querétaro un perfil de compuestos volátiles distintivos para cada combinación levadura-BAL, dicha interacción entre cepas seleccionadas modificarán, en función de la especie de BAL y el tiempo de inoculación, la expresión de genes asociados con características de interés enológico en la cepa *S. cerevisiae* nativa.

OBJETIVOS

General

Seleccionar de forma simultanea cepas de levaduras y BAL nativas de vinícolas queretanas con base en cualidades enológicas, compatibilidad (interacciones positivas), eficiencia fermentativa y perfil de compuestos volátiles, así como evaluar la expresión de genes en microvinificaciones realizadas con las cepas seleccionadas.

Objetivos específicos

1. Determinar la diversidad de poblaciones y aislar cepas de BAL provenientes de uvas, equipos y vino en procesamiento en vinícolas queretanas.
2. Seleccionar cepas de BAL y *Saccharomyces* spp. con base en su tolerancia a condiciones de vinificación, producción de compuestos de interés enológico y compatibilidad en interacciones levadura-BAL.
3. Evaluar el desempeño fermentativo, la calidad de los vinos y el perfil de compuestos volátiles producidos por levaduras y BAL seleccionadas en vinificaciones a pequeña escala.
4. Evaluar interacciones entre cepas de levadura y BAL seleccionadas, determinando la expresión de los genes HSP12, MSN4, CTT1, BAT2 y ADH1 en *S. cerevisiae* en función del tiempo de inoculación y del tipo de BAL utilizada.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Sitio experimental

Los experimentos se desarrollaron en los laboratorios de: “Inocuidad Microbiana de los alimentos” y “Fermentaciones y Fisiología de frutos” de la UAQ, México, así como en la Universitat Rovira i Virgili en Tarragona, España.

Se trabajó en cuatro vitivinícolas del estado de Querétaro, cuyas principales características se consignan en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Empresas vinícolas queretanas participantes

Bodega	Localización	Años de producción	Forma de inducir la fermentación
Viñedos Azteca	Carr. San Juan del Río – Ezequiel Montes Km. 40.4	5 años	FA inoculada; FML espontánea
Bodegas de Cote	Carr. San Juan del Río – Cadereyta Km. 40.5	1er año	FA y FML inoculadas
Freixenet de México	Carr. San Juan del Río - Cadereyta Km. 40.5	30 años	FA y FML inoculadas
Vinícola San Patricio	Carr. Tequisquiapan - Tecozautla Hidalgo Km. 2.0	10 años	FA ocasionalmente inoculada y FML espontánea

FA: Fermentación alcohólica. FML: Fermentación maoláctica

3.2 Material biológico

3.2.1. Variedades de vid

- Para aislamiento de BAL: ‘Cabernet Sauvignon’, ‘Merlot’, ‘Syrah’, ‘Tempranillo’, ‘Salvador’, ‘Ruby Cabernet’, ‘Malbec’ y ‘Macabeo’ (variedad blanca).
- Para elaboración de vinos: ‘Cabernet Sauvignon’

3.2.2. Microorganismos

Las cepas de microorganismos que se utilizaron se consignan en la Tabla 3.2. En cuanto a las cepas nativas, se tuvieron 27 levaduras *Saccharomyces* evaluadas en un estudio previo y un total de 822 BAL aisladas en éste estudio. Se tuvieron cepas comerciales que fungieron como testigos en los procesos de vinificación, así como cepas ATCC empleadas para verificar las reacciones de PCR específicas para las especies

Tabla 3.2 Descripción de cepas de levaduras y BAL empleadas en este estudio.

Cepas	Origen	Uso	Características
<i>S. cerevisiae</i> K1-V1116	Comercial (Lallemand)	Testigo comercial en vinificaciones	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Killer</i> (K2). - Rápida fermentación - Fase lag corta - Toleran hasta 14 % etanol - 16.7 gr de azúcar por grado alcohólico. - Ácido acético 0.16 g/L
<i>S. cerevisiae</i> AH22	ATCC 38626	Determinación de efecto <i>killer</i>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Killer</i> sensible
<i>Saccharomyces</i> nativas (27)	Aisladas de viñedos queretanos (2012)	Caracterización fenotípica y selección	<ul style="list-style-type: none"> - Capaces de desarrollar en presencia de SO₂, etanol y toxina <i>killer</i>
<i>Oenococcus</i> Garvie	<i>oeni</i> ATCC 39402	Testigo PCR	<ul style="list-style-type: none"> - Produce FML en vinos con elevada acidez
<i>Oenococcus</i> Lactoenos 450®	<i>oeni</i> Comercial (Laffort)	Testigo comercial en vinificaciones y caracterización.	<ul style="list-style-type: none"> - Adaptada para inoculación secuencial. - Tolerante a elevado grado alcohólico
BAL nativas (822)	Aisladas de vinícolas queretanas (2014)	Caracterización fenotípica y selección	Por evaluar

3.3 Metodología general de trabajo

El esquema general de trabajo se representa en la Figura 3.1. Primeramente se realizó el estudio de poblaciones y el aislamiento de BAL nativas de las bodegas y viñedos queretanos. Las BAL aisladas de la primera etapa y las levaduras obtenidas en estudios anteriores (Miranda *et al.*, 2015) se caracterizaron fenotípicamente para

seleccionar cepas con interacciones positivas (compatibles) y evaluarlas en ensayos de vinificación en microescala. Estos ensayos nos permitieron evaluar la eficiencia fermentativa, la calidad de los vinos y los perfiles de compuestos volátiles que producen las combinaciones de cepas seleccionadas. Finalmente, se estudió la expresión de algunos genes asociados con características de interés enológico en *S. cerevisiae* al combinarla con distintas cepas de BAL en un proceso de microvinificación.

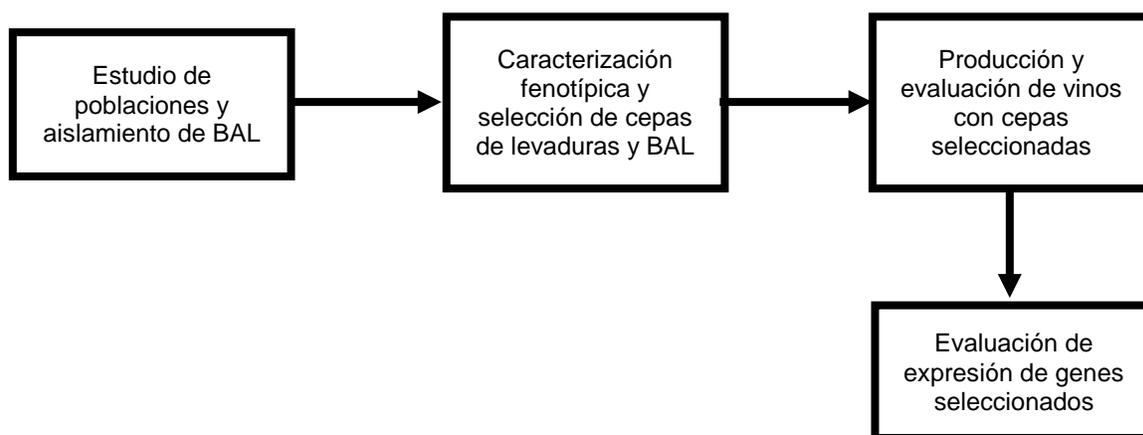


Figura 3.1. Estrategia general para la realización del proyecto

3.4 Aislamiento y caracterización de poblaciones de BAL en vinícolas de la región.

3.4.1. Muestras

De acuerdo a la disponibilidad en cada bodega se tomaron tres distintos tipos de muestras, como se describe a continuación.

A. Frutos: En las bodegas con viñedo propio se recolectaron de manera aséptica cinco racimos de uva madura en bolsas de polipapel de 15 x 30 cm (por triplicado). Una vez en el laboratorio la uva se estrujó y dejó fermentar de manera espontánea dentro de frascos tipo Schott de 500 mL. Si en bodega se contaba

con mosto recién estrujado, se tomaron 500 mL en un frasco estéril y se siguió el procedimiento de forma similar. Para el aislamiento de BAL, se tomaron alícuotas de 1 mL a los 0, 5 y 10 días de fermentación. Y para los ensayos moleculares se obtuvo un *pellet* celular a partir de 15 mL, en los mismos días.

B. Vinos: En las vinícolas donde se deja ocurrir de manera espontánea la FML, de tres barricas o tanques de fermentación se tomaron 250 mL de vinos. Los muestreos se realizaron cada dos meses, que correspondieron aproximadamente a las tres etapas de la FML (inicial, intermedia y avanzada). Para ensayos microbiológicos se utilizaron alícuotas de 1 mL y para los moleculares de 15 mL.

C. Barricas y filtros: En las barricas se realizó un enjuague con 500 mL de diluyente de peptona (0.1 %), recuperando el líquido en un frasco Schott estéril. Los filtros de celulosa se colocaron en 100 mL de diluyente de peptona, una vez en el laboratorio se homogenizaron con un equipo *Stomacher*® (1 min, velocidad media). Igualmente se tomaron alícuotas de 1 y 15 mL para ensayos microbiológicos y moleculares respectivamente.

3.4.2. Recuperación de BAL y aislamientos

Se evaluaron tres formulaciones de medios de cultivo que tienen como base el agar Man Rogosa Sharpe (MRS), adicionado de cicloheximida (100 mg/L) y azida de sodio (50 mg/L) para inhibir el desarrollo de levaduras y bacterias acéticas, respectivamente (Corry *et al.*, 2012): a) MRS b) MRS + 15 % de jugo de tomate (MRS-T) y c) MRS + 20 % de jugo de manzana (MRS-M).

Para llevar a cabo los aislamientos, a partir de las muestras tomadas se realizaron diluciones decimales en diluyente de peptona y se sembraron en placas con el medio seleccionado, incubándose a 30 °C durante cinco días. Se realizó el

aislamiento y purificación de aproximadamente 5 % de las colonias observadas, a las que se efectuaron pruebas de catalasa y tinción Gram (Ruiz *et al.* 2010).

3.4.3. Identificación de poblaciones de BAL

Un total de 15 mL de muestra de mosto, vino y diluyente proveniente de filtros y barrica respectivamente Se concentró en 200 μ L, mediante centrifugación. Al concentrado se realizó la extracción de ADN de los microorganismos presentes mediante el lote comercial MoBIO PowerSoil, siguiendo las indicaciones del proveedor y utilizando para la lisis celular el homogeneizador PowerLyzer (4500 rpm, 1 min).

Para detectar las especies de BAL más abundantes en las muestras empleó una PCR múltiple, que detecta 13 de las especies más frecuentemente encontradas en vinificación (Petri *et al.*, 2013). La identificación de aislados de la especie *Oenococcus oeni* se realizó amplificando el gen que codifica la enzima maloláctica (On1 y On2) (Zapparoli *et al.*, 1998; Capozzi *et al.*, 2010). Para diferenciar a nivel de cepa los aislados de *O. oeni* y *L. plantarum*, se emplearon técnicas de polimorfismo de ADN amplificado al azar (RAPD, por sus siglas en inglés) con los iniciadores Coc y On2, (Reguant & Bordons, 2003) y M13, respectivamente. Los iniciadores de cada técnica se indican en la Tabla A1 de los anexos. Las mezclas de reacción fueron de 15 μ L: 1X de mezcla preparada (Promega), 0.5 μ M de cada iniciador y 5 ng de ADN extraído. Las condiciones de la reacción se detallan en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Condiciones de amplificación por PCR realizadas en el estudio

Etapa/ Técnica	Desnat. inicial	Ciclos	Desnat.	Hibridación	Extensión	Extensión final
PCR	95° C	13 y	95° C	39 y 41° C	72° C	72° C
Multiple	(5 min)	21	(1 min)	(1 min)	(2 min)	(10 min)
Detección	95° C	30	94	64	72° C	72° C
<i>O. oeni</i>	(5 min)		(45 seg)	(2 min)	(2 min)	(5 min)
RAPD	95° C	30	94° C	40° C	72° C	72° C
Coc/On2	(5 min)		1 min)	(1 min)	(2 min)	(10 min)
RAPD M13	95° C	35	94° C	45	72° C	72° C
	(5 min)		(1 min)	(20 seg)	(2 min)	(2 min)
RAPD RF2	95° C	35	95° C	36° C	72° C (1.5	72° C
	(5 min)		(30 seg)	(1 min)	min)	(5 min)

Los patrones de bandas obtenidos con el RAPD fueron transformados a una matriz binaria en función de la presencia o ausencia de las bandas de cada cepa. Finalmente, se calculó el coeficiente de similitud de Jaccard para la elaboración de un dendrograma (Reguant & Bordons, 2003).

3.5. Caracterización fenotípica de levaduras *Saccharomyces* y BAL

Para la selección de los microorganismos se analizó su tolerancia a condiciones de vinificación (elevada azúcar, bajo nitrógeno, presencia de etanol y SO₂), así como la baja producción de compuestos indeseables como el ácido acético y sulfhídrico, entre otras características descritas en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Pruebas para la caracterización de las cepas *Saccharomyces* y BAL aisladas de vinícolas queretanas.

	Levaduras	BAL	Técnica
Tolerancia a etanol y sulfitado	✓	✓	Bioscreen
Requerimiento de N y azúcar 35 %	✓	X	Bioscreen
Factor <i>Killer</i>	✓	X	Placa
Floculación	✓	X	Espectrometría
Producción de Ac. Acético	✓	X	Placa
Producción de Ac. Sulfhídrico	✓	✓	Placa
Desarrollo a 8°C	✓	✓	Caldo
Metabolismo Ac. Málico	X	✓	Enzimático
Pruebas de Interacción	✓	✓	Placa

✓ - Prueba efectuada para el microorganismo

X – Prueba no efectuada para el microorganismo

3.5.1 BAL

Pruebas de tolerancia en medios definidos y vino

Todas las BAL se sometieron a pruebas de tolerancia utilizando el equipo Bioscreen C. Como medio base se empleó vino sintético (SW; Anexo 2), adicionado de 56 mg/L de metabisulfito de potasio, equivalente a 30 mg/L de SO₂ y concentraciones de 10, 12 y 13 % de etanol. En este caso la evaluación fue cualitativa, considerando que la cepa era capaz de desarrollar en el medio cuando el tiempo de detección del equipo fue menor al tiempo total de incubación (72 h).

Por su parte para la selección en cepas de *L. plantarum* y *O. oeni* se observaron las cinéticas en dos medios: 1) Vino de la región esterilizado mediante microfiltración (0.2 µM), adicionado de 20 % de medio MRS y ajustado a 12 % de etanol. Y 2) Medio MRS adicionado de 12 % de etanol, 30 mg/L de SO₂ y pH de 3.5. En ambas pruebas se inocularon 5 Log UFC/mL de cada cepa para un total de 200 µL de medio en cada pozo. La programación de lecturas en el equipo fueron las mismas que las indicadas para las levaduras incubando a 35 °C durante 72 h.

3.5.2 Levaduras *Saccharomyces*

a) Pruebas de tolerancia en medios definidos

Para determinar la tolerancia a condiciones de interés enológico se analizaron dinámicas de desarrollo obtenidas mediante el equipo Bioscreen C. En las pruebas, el medio a evaluar (180 µL) y su respectivo control sin inhibidores, se distribuyeron en placas estériles de plástico de 100 fosas. Las cepas se inocularon a razón de 5 log UFC/fosa y se incubaron en el analizador Bioscreen C a 25° C por 72 h. De manera automática a intervalos de 30 min, se agitaron las placas a intensidad media por 5 s y se midió la densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 600 nm.

De ésta forma se evaluó la tolerancia a bajas concentraciones de nitrógeno y estrés osmótico, empleando un medio con 35 % de sacarosa y sustituyendo la fuentes de nitrógeno con sulfato de amonio para una concentración de 66 mg/L de N (Mendes-Ferreira *et al.* 2007). La tolerancia a etanol (12 y 14 %) junto con SO₂ (50 mg/L) y bajo pH (3.5) se evaluó utilizando como medio base jugo de uva sintético (GJM; Anexo 2).

b) Fenotipo *killer*

Para detectar las cepas nativas con efecto *killer* se empleó la metodología propuesta por Lopes y Sangorrín (2010). Se sembró por vaciado en placa, a una concentración de 10^6 UFC/mL la cepa de referencia *killer* sensible (*Saccharomyces*, ATCC 38626) en medio YPD-MB (Anexo 2), una vez solidificado el medio se colocaron las cepas a evaluar en gotas de 10 μ L a una concentración de 1×10^7 UFC/mL. Tras cuatro días de incubación a 25 °C se observaron y midieron (Vernier) los halos de inhibición formados por las cepas *killer* positivas.

c) Producción de ácido acético y sulfhídrico

Se determinaron *in vitro* utilizando los medios (OIV 2012a).

- Agar Chalk. El ácido acético producido reacciona con el carbonato de calcio presente en el medio. El medio es turbio y en el caso de producción de ácido, éste se aclara. La incubación es de 10 días a 25 °C (Kurtzman 2011).
- Medio Biggy. Las cepas se inocularán en el medio y las placas se incubarán a 26 °C durante 24 h. Las colonias desarrolladas pasarán de color blanco-crema hasta marrón-negro en función de la concentración de H₂S producido.

d) Floculación

Las cepas de levadura previamente activadas en caldo YPD (5 mL), se centrifugaron y después se re-suspendieron en 5 mL de reactivo de Helm (3 mmol/L de cloruro de calcio, 50 mmol/L de solución amortiguadora de acetato-acético pH 4.5). Al cultivo suspendido se le midió la densidad óptica (620 nm) al tiempo 0 y a los 60 min de añadido el reactivo de Helm. El porcentaje de floculación se determinó a partir de la relación entre estas dos mediciones ($OD_{60}/OD_0 \times 100$). Y la escala de floculación se consideró de la siguiente forma: > 90 % (no floculante); de 70 % a 90 % (poco floculante); entre 30 % y 70 % (floculación intermedia); y <30 % (muy floculante) (Ramos *et al.*, 2013).

3.5.3 Compatibilidad Levadura-BAL

A partir de las pruebas anteriores, cinco cepas nativas de levadura (N42, N5, SB27, SR19 SR25) y cuatro de BAL (CU15, FU39, VA91 y VC32) fueron seleccionadas para verificar compatibilidad levadura-BAL. La prueba se realizó empleando 10 mL de jugo de uva sintético (GJM; Anexo 2), el cual se inoculó con 5 Log UFC/mL de la levadura a evaluar. Se dejó fermentar durante 12 h a temperatura ambiente. Posteriormente, el medio se centrifugó (5000 G por 10 min) para eliminar biomasa y se esterilizó mediante microfiltración (0.45 nm). El caldo resultante se utilizó como medio para observar el desarrollo de las respectivas cepas de BAL, el mismo medio sin la inoculación de ninguna levadura fue utilizado como control positivo del desarrollo de las BAL. El efecto de la levadura en el crecimiento de BAL se determinó como crecimiento relativo empleando la siguiente ecuación: $DOI_{\text{relativo}} = \frac{DOI_{\text{Con levadura}} - DOI_{\text{sin levadura}}}{DOI_{\text{sin levadura}}}$.

3.5.4 Caracterización fermentativa de BAL seleccionadas

a) Eficiencia fermentativa de BAL seleccionadas en medio sintético

Considerando las características de interés enológico evaluadas y verificando la compatibilidad entre cepas de levaduras y BAL, se seleccionaron dos cepas nativas de BAL: VC32, de especie *Oenococcus oeni*, proveniente de vino de Bodegas de Cote, y FU39 de especie *L. plantarum*, proveniente de uva de la bodega Freixenet. Para determinar su eficiencia fermentativa primero se realizó una cinética de consumo en 50 mL de medio sintético tipo vino, denominado WLM, que contenía aproximadamente 2 g/L de A. málico inicial (Anexo 2). Los inóculos se prepararon mediante dos pases sucesivos en medio MRS-CT, incubado a 30°C por 20 h en el caso de FU39 y 72 h en el caso de VC32, hasta alcanzar una DO de aproximadamente 1.5. Las cepas así preparadas se utilizaron para inocular el medio WLM en una proporción de 2 %, equivalente a aproximadamente 7 log de UFC/mL en el medio final. Para determinar la concentración de ácido málico, se tomaron lecturas cada 24 horas empleando el

analizador Miura® (TDI) basado en reacciones enzimáticas específicas, hasta el consumo total del ácido.

b) Pre-adaptación de cepas autóctonas

Para garantizar la mayor supervivencia de células al choque ocasionado por entrar a un medio hostil como es el vino, se evaluaron dos formas de obtención de inóculo. La primera en medio nutritivo MRS-CT adicionado de glutatión (GSH) a una concentración final 10 mM; la segunda empleando un medio conteniendo medio MRS-CT y vino en proporción 1:1, denominado W/M. En ambos medios se realizó una incubación a 30° C; en el medio con glutatión hasta alcanzar una $DO_{600} > 1.2$ y por tres días en el caso del medio W/M. Las cepas provenientes de estos tratamientos fueron posteriormente inoculadas en vino obtenido por las dos levaduras autóctonas, a razón de 2 % en el caso de las adicionadas con glutatión y 5 % en el caso de las W/M cuya biomasa solo alcanzó una DO_{600} de 1. De manera análoga a la evaluación de eficiencia fermentativa, cada 24 horas se midió la concentración de ácido málico hasta su total consumo. Se hicieron recuentos para verificar la población inicial y final de BAL (Figura 3.2).

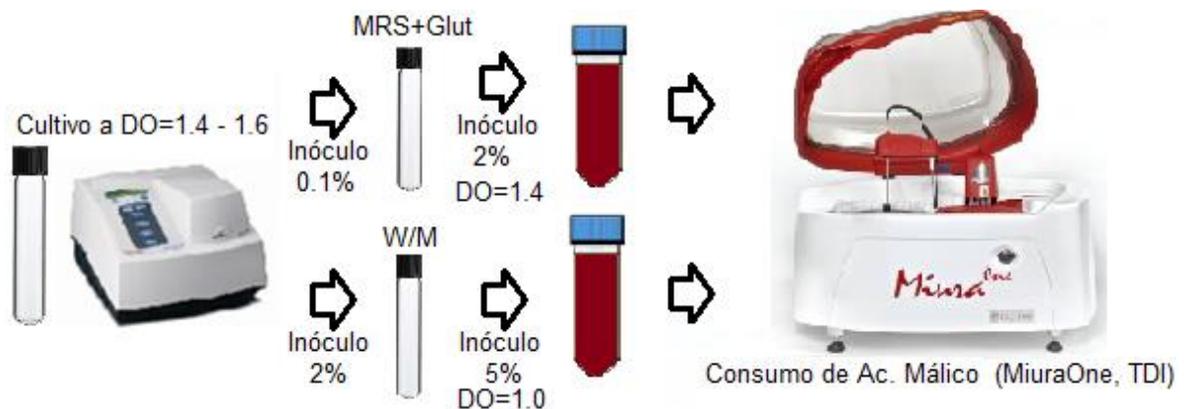


Figura 3.2. Preparación y pre-adaptación de inóculos y su efecto en el consumo de ácido málico en vino estéril obtenido por las levaduras nativas.

3.6. Ensayos microvinificación con cepas nativas de levaduras y BAL

El diseño experimental del ensayo comprende 2 factores, la levadura y la BAL, con dos y tres distintas cepas respectivamente, representado en total 6 tratamientos. Dos levaduras nativas llevan a cabo la FA (SR19 y N05) y a continuación, en el vino resultante de cada una de ellas se inoculan de forma individual tres BAL, una comercial y dos nativas (CH11, VC32, FU39). Cada tratamiento está constituido por 3 réplicas, lo que supone un total de 6 fermentadores para la FA y 18 para la FML.

3.6.1. Fermentación alcohólica

Para la primera etapa (FA) se utilizaron en total 6 contenedores de 10 L de capacidad (tres por cepa de levadura), cada uno se llenó con aproximadamente 7 kg de uva despalillada a la cual se le añadieron 30 mg/L de SO₂. El inóculo de la levadura nativa consistió de aproximadamente 2 % en volumen del cultivo obtenido previamente en YPD, para obtener una población final de alrededor de 7 Log de UFC/mL en el mosto, la cual se verificó mediante recuento en placa y se procedió con una vinificación tradicional en tinto. Se monitoreo la evolución de la fermentación mediante mediciones diarias de densidad y temperatura.

Una vez concluida la fermentación alcohólica (densidad constante < 0.995 g/L) se realizó un prensado manual y el vino se trasegó a garrafas de 2 L las cuales se llevaron a estabilización en cámara fría por 1 día. El vino se decantó en otro recipiente para eliminar el depósito formado y realizar su análisis químico (ATT, AV, grado alcohólico, pH). El volumen total de vino obtenido por cada cepa (proveniente de tres fermentaciones independientes) se mezcló para homogeneizar lo que fue el vino de arranque para la fermentación maloláctica (FML). El ensayo se esquematiza en la Figura 3.3 y se detalla a continuación.

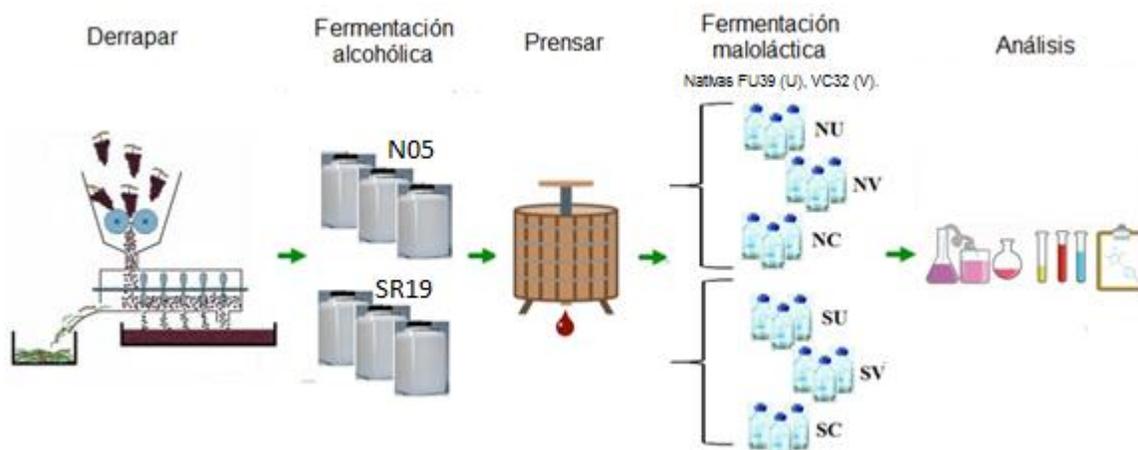


Figura 3.3. Esquema de trabajo para ensayo microvinificación. En FML las claves de los tratamientos indican en la primer letra la levadura: N (N05) y S (SR19), y en la segunda la BAL: U (FU39), V (VC32 y C (CH11)

3.6.2. Fermentación maloláctica

El vino obtenido de cada levadura se distribuyó en frascos tipo Schott de 1L (nueve por levadura, 18 en total), previamente esterilizados y acoplados con una válvula para la toma de muestras. Para esterilizar el vino antes de la inoculación de las bacterias se les agregó Velcorin® (dimetil dicarbonato; DMDC) a razón de 1mL/L, dejando a 3 °C por 24h (Costa *et al.* 2008). Posteriormente se realizó una siembra en placa para verificar que no hubiera levaduras ni bacterias viables antes de la inoculación con las cepas nativas a evaluar. El inóculo de las BAL se preparó empleando medio W/M (sección 3.5.2 inciso b). Los frascos se incubaron a 20 °C y diariamente se tomaron muestras para evaluar el consumo de ácido málico.

3.6.3 Análisis de volátiles

Una vez finalizada cada etapa fermentativa se realizó un análisis para determinar el perfil de compuestos volátiles producidos en los vinos por las cepas nativas. Para ello se empleó cromatografía de gases acoplada a masas (GC/MS), con un pre-tratamiento de la muestra mediante microextracción en fase sólida del espacio de

cabeza (HS-SPME) (Zhang *et al.*, 2011). Para esta última, en un vial de 20 mL se colocaron 10 mL de vino (espacio de cabeza de 10 mL) con 30 % de NaCl. El oxígeno presente en el espacio de cabeza se desplazó con nitrógeno para evitar la oxidación de los compuestos, posteriormente el vial fue sellado y la extracción se realizó por 120 min a 40 °C con agitación continua utilizando fibras Supelco-57348-U DVB/CAR/PDMS (divinylbenzene/ Carboxene/ Polydimethylsiloxane) (Sigma-Aldrich) de 2 cm de longitud. Para el análisis en el cromatógrafo de gases, se realizó una inyección en modo *splitless*, la temperatura del inyector fue de 270°C y se establecieron las siguientes condiciones de horno: 40 °C (5 min), 40–120 °C (1°C/min), 120–180 °C (1.7 °C/min) y 180–220 °C (25 °C/min). El espectro de masas se registró mediante el impacto de ionización (EI) a 70 eV, con una fuente de iones y la captura de masas ajustada a 180 °C.

Las curvas de calibrado para la cuantificación de compuestos volátiles se realizaron utilizando cinco patrones correspondientes a los principales grupos funcionales presentes en el vino: 1-Pentanol (alcohol), Butirato de Etilo (éster), Acetato de fenil etilo (éster de acetato), Acido octanóico (ácido orgánico) y Linalool (terpeno), a cinco distintas concentraciones, considerando rangos previamente reportados en que éstos pueden encontrarse en las muestras. Para ello se preparó una solución acuosa con 12.5 % de etanol (mismo grado alcohólico que las muestras), ácido tartárico y mezclas en distintas concentraciones de cada uno de los patrones de referencia. La corrida cromatográfica se realizó por triplicado y se ajustaron las curvas de calibrado correspondientes en función del área observada. Ningún patrón interno fue añadido a las muestras para evitar que se ocultara algún compuesto.

3.7. Expresión de genes

La expresión de ciertos genes de *S. cerevisiae* asociados a características de interés enológico podría verse modificada por interacciones con las BAL que realicen la FML, siendo el tiempo de inoculación de la BAL y su especie dos factores que podrían influir. Para determinar tal efecto se diseñó un experimento empleando una cepa *S. cerevisiae* nativa seleccionada (SR19), dos BAL nativas una *O. oeni* (VC32) y una *L. plantarum*

(FU39), así como un control comercial (Lactoenos 450®) las cuales actuarán en forma secuencial y en coinoculación como se muestra en la Figura 3.4

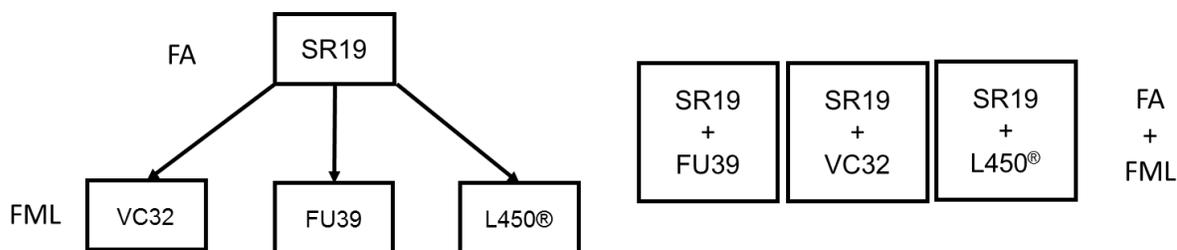


Figura 3.4 Diseño del experimento para el análisis de expresión de genes de *S. cerevisiae* en interacción con BAL de distinto género en dos esquemas de inoculación.

El experimento se realizó mediante vinificaciones tradicionales en tinto, empleando 1 kg de uva despalillada a mano y adicionada de 100 mg/L de SO₂ y 1 mL/L de dimetil dicarbonato (DMDC; Velcorin®) para su esterilización en matraces Erlenmeyer de 1L. Los inóculos consistieron en 2 % en volumen de los cultivos obtenidos previamente en YPD o MRS-CT respectivamente, para obtener una población final de alrededor de 7 Log de UFC/mL de cada tipo de microorganismo en el mosto o vino, según sea el caso. Se monitoreó la evolución de la FA mediante mediciones diarias de peso y realizando recuentos de levaduras y BAL los primero cuatro días de cada fermentación empleando agar YPD y MRS, respectivamente. Pasados cinco días de iniciada la FA, se realizó un prensado manual y se trasegó a frascos de rosca de 500 mL donde, para los tratamientos en esquema secuencial fue inoculada la BAL. En el caso de las coinoculaciones los procesos continuaron hasta alcanzar un peso constante (12 días desde iniciada la FA). El consumo de ácido málico, formación de ácidos láctico y acético, así como de etanol se midieron mediante HPLC-UV-IR empleando una curva estándar de cada compuesto. Se determinó la expresión relativa en SR19, de los genes descritos en la Tabla 3.5 y cuyos iniciadores se enlistan en la Tabla A1 de la sección de anexos.

Tabla 3.5 Genes estudiados durante vinificaciones secuenciales y co-inoculadas empleando las cepas seleccionadas SR19, VC32 y FU39.

Gen	Codifica	Atributo	Referencia
BAT2	Aminotransferasa ramificados.	de Producción de alcoholes superiores (via de Ehrlich)	Belda <i>et al.</i> (2017)
MSN4	Proteína regulatoria	Factor de transcripción en estrés fermentativo	Nardi <i>et al.</i> (2010)
HSP12	Proteína de choque térmico	Adaptación a estrés asociado a fermentación	Capece <i>et al.</i> (2012)
ADH1	Alcohol deshidrogenasa	Eficiencia fermentativa	Nardi <i>et al.</i> (2010)
CTT1	Catalasa T citosólica	Estrés oxidativo	Capece <i>et al.</i> (2016)
ALG9	Manosiltransferasa (putativa)	Gen de referencia (<i>housekeeping</i>)	Nadai <i>et al.</i> (2015)
UBC6	Ubiquitina 6	Gen de referencia (<i>housekeeping</i>)	Nadai <i>et al.</i> (2015)

Se llevó a cabo un estudio de cuantificación relativa de los genes anteriormente señalados, empleando como genes de referencia UBC6 y ALG, cuya expresión no varía en condiciones asociadas a vinificación en presencia de sulfitos (Nadai *et al.*, 2015). Para determinar la tasa de expresión (*ratio*) o expresión relativa, se emplearon dos modificaciones de la técnica $\Delta\Delta Ct$. En la primera, el valor $\Delta\Delta Ct$ se obtiene por la siguiente ecuación: $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{gen interés}} - Ct_{\text{gen referencia}})_{\text{experimental}} - (Ct_{\text{gen interés}} - Ct_{\text{gen referencia}})_{\text{control}}$ y la expresión relativa se obtiene de $R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$. La otra metodología considera la eficiencia de amplificación de los genes y se obtiene mediante la siguiente ecuación: $R = \frac{(E_{\text{gen interés}})^{\Delta Ct_{\text{gen interés}}(\text{control}-\text{experimental})}}{(E_{\text{gen referencia}})^{\Delta Ct_{\text{gen referencia}}(\text{control}-\text{experimental})}}$ Donde E es la eficiencia de amplificación, ΔCt es la resta del ciclo umbral de los genes estudiados y los de referencia, en condiciones experimentales o condiciones control, respectivamente (Kozera & Rapacz, 2013). Se consideró como condición control a los

microorganismos en medio de cultivo al momento de la inoculación y la condición experimental, una hora después de la inoculación de la BAL en mosto o vino según el caso.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Recuentos de las poblaciones de BAL dentro de las vinícolas

Recordemos que para cuantificar las poblaciones de BAL en los distintos materiales obtenidos de las vinícolas queretanas, se realizaron recuentos empleando MRS con 20 % de jugo de manzana, MRS + 15 % de jugo de tomate y MRS sin aditivos. La finalidad de la inclusión de los distintos medios en el estudio fue evaluar la eficiencia de cada uno de ellos y maximizar la recuperación de bacterias. Sin embargo, no se observaron diferencias, ni en la diversidad morfológica aparente, ni en los recuentos obtenidos con los tres medios, por lo que se consideraron repeticiones. Diversos medios de cultivo han sido reportados para la recuperación de BAL de muestras vínicas. Empleando los mismos tres medios que en nuestro estudio, y contrastando con éste, Solieri *et al.* (2010) reportaron una mayor recuperación utilizando MRS con 20 % de jugo de manzana en comparación con los otros dos medios, resultados que difirieron con lo observado en este estudio.

Se analizaron 61 muestras obtenidas de las cuatro vinícolas consideradas en este estudio, de donde se recuperaron 822 cepas de BAL. En la Tabla 4.1 se muestran las medianas de las concentraciones de BAL y el número de cepas aisladas de acuerdo al punto de muestreo y vinícola. Cabe recordar que tanto en mosto en fermentación y en vino se colectaron muestras en tres etapas. En los vinos éstas corresponden sensiblemente a tres estadios de la FML (inicial, intermedia y avanzada) realizada en la bodega, mientras que en los mostos corresponden a los 0, 5 y 10 días de fermentación efectuada en el laboratorio.

Tabla 4.1 Poblaciones (medianas) y número de aislados de BAL obtenidos en las distintas muestras dentro de cuatro vinícolas queretanas.

Vinícola	Tipo de muestra	Número de muestras	Población por etapa* (UFC/mL)			Número de aislados
			1	2	3	
Viñedos Azteca	Mosto	12	2x10 ³ **	7x10 ²	8x10 ¹	23
	Vino	9	4x10 ²	7x10 ⁸	1x10 ⁷	213
	Barrica/filtro	4	9x10 ⁸	-	-	156
Bodega de Cote	Mosto	15	2x10 ¹	1x10 ⁴	8x10 ²	96
	Vino	3	3x10 ⁴	-	-	89
Freixenet	Mosto	9	2x10 ⁴	4x10 ⁴	1x10 ⁵	103
S. Patricio	Vino	9	3x10 ⁵	1x10 ⁹	8x10 ⁵	142
Total		61				822

* Etapas correspondientes al estadio inicial (1) intermedio (2) y avanzado de la FML.

**Valores expresados como la mediana de tres repeticiones (medios de cultivo) en cada muestra.

En el caso de los mostos no se observó ningún efecto a lo largo de las tres etapas de la FML. En cuanto a los vinos obtenidos con uva de Viñedos Azteca y Bodega de Cote los recuentos fueron más bien bajos y en algunas muestras (5/12 en Viñedos Azteca 8/15 en Bodega de Cote) no se observó desarrollo bacteriano en las placas, por lo que de estar presentes las BAL, se encontraban por debajo del umbral de detección de la técnica (10 UFC/mL) o en un estado viable no cultivable (Millet & Lonvaud-Funel, 2000). Estos bajos recuentos concuerdan con Barata *et al.* (2012) quienes reportaron poblaciones bajas de BAL (2 Log UFC/mL), particularmente en uvas no dañadas, mientras que en frutos con daño, cuantificaron hasta 5 Log UFC/mL. Confirmando así que a pesar de que la principal fuente de microorganismos en la vinificaciones proviene de las uvas, las BAL constituyen poblaciones minoritarias y difíciles de recuperar en este tipo de muestras (Barata *et al.*, 2012). En contraste, en los mostos de Freixenet se observaron recuentos considerablemente más elevados (4 Log UFC/mL), lo cual puede estar relacionado con la variedad empleada, que fue blanca ('Macabeo'). Al respecto, en otros cepajes blancos como 'Chardonnay', 'Sauvignon' y 'Semillon'

también se han reportado concentraciones de BAL más elevadas con respecto a variedades tintas (Bae *et al.* 2005). Esto puede deberse a la baja concentración fenólica asociada a estas variedades, ya que ciertos compuestos fenólicos pueden ejercer un efecto tóxico sobre las BAL (efecto cepa y compuesto -dependiente) (Reguant *et al.*, 2000; García-Ruiz *et al.*, 2008).

En cuanto a los vinos, en las dos vinícolas (Viñedos Azteca y San Patricio) donde se dio seguimiento a la FML, las poblaciones de BAL al inicio fueron de aproximadamente 10^2 UFC/mL, incrementaron hasta 10^9 UFC/mL en la segunda etapa, correspondiente al clímax de la FML y en estadios avanzados, con limitaciones de nutrientes y condiciones fuertemente inhibitorias, disminuyeron hasta 10^5 UFC/mL. Saguir *et al.* (2009) y Pérez-Martín *et al.* (2014) reportaron recuentos similares, siendo bajos al inicio de la FML, e incrementándose a lo largo del proceso. Por su parte, en etapas avanzadas Solieri *et al.*, 2010 y González-Arenzana *et al.*, 2012 reportaron poblaciones de hasta 8 Log UFC/mL.

4.2. Distribución de especies de BAL en las bodegas

Además de determinar las concentraciones de BAL presentes, se buscaba identificar aquellas especies que pudieran ejercer un mayor efecto en la calidad de los vinos, ya sea por su abundancia en las muestras o porque fueran capaces de tener actividad en las condiciones limitantes que representa el vino. Para ello utilizamos dos enfoques, el primero fue en un ensayo de PCR múltiple aplicado directamente a las muestras (método independiente de cultivo), y el segundo consistió en la identificación de aquellos aislados capaces de desarrollar en presencia de SO_2 , bajo pH (3.5) y al menos 10 % de etanol (condiciones de vinificación). Para la identificación de las cepas se utilizó el mismo ensayo de PCR múltiple, el cual nos permite identificar al microorganismo mediante el tamaño del amplicón obtenido (Figura 4.1)

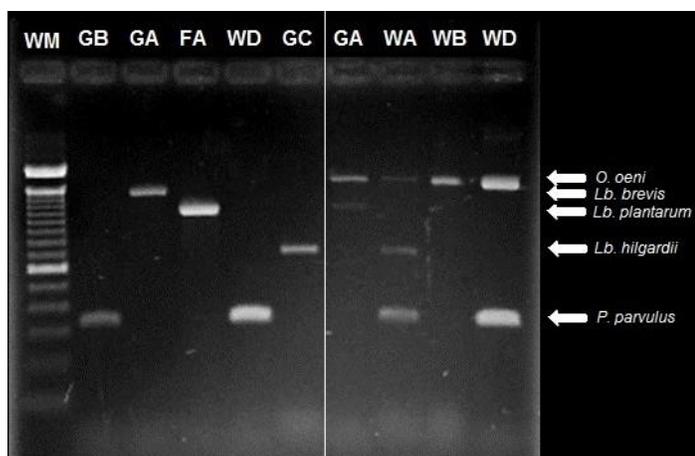


Figura 4.1 Identificación de aislados (izquierda) y detección de especies en las muestras de las bodegas (derecha) por PCR múltiple. Los carriles indican el origen de la muestra: Mosto (G) Barrica/filtro (F), Vino (W), Viñedos Azteca (A), Bodega de Cote (B), Freixenet (C) San patricio (D). Especie correspondiente a cada producto de la PCR señalado a un costado.

Mediante el cultivo, se identificaron 119 cepas de las 822 aisladas (14 %), que fueron tolerantes a condiciones de vinificación (10 % de etanol, 50 mg/L de SO₂ y pH de 3.5). Entre los dos enfoques aplicados se detectaron cinco especies: *Oenococcus oeni*, *Pediococcus parvulus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus hilgardii*. La Tabla 4.2 resume los porcentajes de muestras en que se detectó cada especie, considerando los distintos tipos de muestra de cada bodega y resaltando aquellas en que hubo discrepancia en el método de detección.

Tabla 4.2 Porcentaje de cada especie detectada en relación al total de muestras manejadas en cada bodega.

Vinícola	Tipo y total de muestras	Especie de BAL detectada				
		<i>O. oeni</i>	<i>P. parvulus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. hilgardii</i>	<i>L. brevis</i>
Viñedos Azteca	Mosto (12)	ND	ND	58 %	ND	ND
	Vino (9)	100 %	100 %	22 %	22 %	† 11 %
	Barrica/filtro (4)	100 %	100 %	† 50 %	100 %	† 50 %
Bodega de Cote	Mosto (15)	† 67 %	† 6.7 %	ND	ND	ND
	Vino (3)	100 %	100 %	† 33 %	ND	† 33 %
Freixenet	Mosto (9)	44 %	ND	††100 %	† 22 %	ND
San Patricio	Vino (9)	100 %	100 %	56 %	ND	ND

ND: Especie no detectada

† Detectada únicamente mediante cultivo

†† Detectada únicamente por molecular

En general, las especies observadas en cada muestra con el método molecular fueron las mismas que se identificaron mediante cultivo, a excepción de *L. brevis*, que únicamente se detectó por cultivo. Esto pudo deberse a una “amplificación preferencial”, en la cual especies más abundantes (como *O. oeni* o *P. parvulus*) agotan los reactivos de la PCR, impidiendo que microorganismos menos abundantes generen producto amplificado (Sint *et al.*, 2012). En general, el enfoque independiente de cultivo fue poco efectivo en muestras con poblaciones bajas de BAL, tales como mostos y vinos en etapas iniciales de la FML; lo cual se explica por el límite de detección de la técnica (10^4 UFC/mL) (Petri *et al.*, 2013). Por lo que sería recomendable utilizar ésta técnica en etapas intermedias o avanzadas de la FML o en materiales con poblaciones suficientemente elevadas.

Respecto a la distribución de las especies en mostos *L. plantarum* se encontró en Viñedos Azteca (58 %) y Freixenet (100 %). *P. parvulus* sólo se encontró en 7 % de las muestras de Bodega de Cote y *L. hilgardii* en 22 % de Freixenet. Estas tres especies son consideradas parte de la microbiota típica de las uvas (Renouf *et al.*, 2005; Bae *et al.*, 2006; Barata *et al.*, 2012). *P. parvulus* y *L. hilgardii*, son también conocidas por producir aromas desagradables (Costello & Henschke, 2002), viscosidad (Dols-Lafargue *et al.*, 2008) y aminos biogénicos en los vinos (Lonvaud-Funel, 2001). Por el contrario, *L. plantarum* se considera un cultivo iniciador alternativo a *O. oeni* para la FML (Lerm *et al.*, 2011; Bravo-Ferrada *et al.*, 2013).

O. oeni se detectó en 67 % de las muestras de mosto de Bodega de Cote y 44 % de Freixenet. Su detección en este tipo de muestras resultó sorprendente, ya que este microorganismo se recupera con baja frecuencia de fruto o mosto (Bae *et al.*, 2005; Mesas *et al.*, 2011). Además, su detección en Freixenet fue únicamente por el método molecular, mientras que en Bodega de Cote fue mediante cultivo (Tabla 4.2). Al respecto, se ha visto que *O. oeni* crece lentamente en medios de cultivo como MRS donde puede demorar hasta ocho días en desarrollar, mientras que otras BAL toman uno o dos días (Bae *et al.*, 2006). Una menor abundancia de otras especies en Bodega de Cote pudo facilitar el desarrollo de *O. oeni* en el medio, mientras que en Freixenet se encontraron poblaciones más variadas y abundantes, que pudieron competir por el espacio y nutrientes e impedir su detección mediante cultivo.

En los vinos se detectaron las cinco especies, *O. oeni* y *P. parvulus* en 100 % de las muestras, hecho que podría sugerir alguna asociación entre estas dos últimas, lo cual ha sido previamente propuesto por Renouf *et al.* (2007) y Pérez-Martín *et al.* (2014). Por su parte *L. brevis* estuvo presente en 11 % de las muestras de Viñedos Azteca y 33 % en Bodega de Cote. Respecto a las etapas fermentativas, *L. brevis* y *L. plantarum* se encontraron principalmente al inicio de la FML, sugiriendo que sus poblaciones disminuyen en etapas avanzadas de la fermentación, posiblemente por una baja tolerancia a las condiciones que se van generando. Por su parte, *L. hilgardii* se encontró únicamente en Viñedos Azteca (22 %) y sólo en etapas avanzadas, lo cual podría sugerir su ingreso hacia el final del proceso, tal vez por las barricas, en donde

también esta especie fue encontrada. A pesar de la presencia de especies deterioradoras durante la FML, cabe destacar que no se han detectado defectos en los vinos, pero hace evidente la necesidad de los productores locales de controlar la FML y limitar el ingreso de estos microorganismos al producto.

En las muestras de filtros y barrica las cinco especies fueron detectadas, y los recuentos en este tipo de muestras fueron los más elevados. Hasta cierto punto, esto respalda la idea de que la barrica podría fungir como reservorio de BAL, ya que además de la diversidad detectada, la población de BAL en estas muestras fue la más alta (Tabla 4.1). En el caso de las barricas, éstas se analizaron tras el trasiego de los vinos, con lo que una parte considerable de la biomasa que precipitó de los vinos permanecía en el fondo. Por su parte, los filtros en sí tienen un efecto de concentración de microorganismos, que probablemente facilitó la detección de un mayor número de especies que se encontraban en concentraciones probablemente no detectables. Estos dos tipos de muestras se conjuntaron debido a que no se lograron analizar suficientes muestras de cada tipo para concluir respecto a cada una.

Este estudio nos permite constatar que las mismas especies se encuentran circulando en las cuatro bodegas incluidas (excepto *P. parvulus*, ausente en Freixenet). También nos permite suponer que varias especies se encuentran desde el campo, otras especies se incorporan al vino dentro de la bodega, probablemente por contacto con superficies como las barricas que llegan a fungir como reservorios, y finalmente durante la FML las poblaciones de BAL se incrementan. Esto enfatiza la necesidad de implementar métodos efectivos de desinfección para estos reservorios, preferir el uso de barricas nuevas en cada lote e inocular cepas seleccionadas (González-Arenzana *et al.*, 2013).

En general, la diversidad de especies de BAL en la región parece no ser tan variada, lo que puede deberse a lo relativamente reciente de las bodegas. No obstante, las técnicas empleadas sólo nos proporcionan un panorama general de las especies mayoritarias y de mayor relevancia (tolerantes a condiciones de vinificación). Para una mejor caracterización de las poblaciones presentes se requieren técnicas moleculares

más robustas como DGGE (Cocolin *et al.*, 2013) o secuenciaciones de nueva generación (Bokulich *et al.*, 2013). Estos estudios de cultivo independientes, junto con la identificación de todos los aislamientos y su caracterización genotípica nos permitiría distinguir hasta nivel de cepa las BAL que están presentes en una bodega, durante todo el proceso e incluso si son las mismas a lo largo del proceso y en toda la región. Este estudio tenía un enfoque distinto, razón por la cual los recursos no se enfocaron a alcanzar este fin.

4.3. Tolerancia de las especies de BAL a condiciones de vinificación

Algunas especies de BAL se asocian a ciertos ambientes de la producción de vino, como *L. plantarum* en la microbiota de los frutos u *Oenococcus oeni* en plena FML; lo cual se asume que está asociado a la tolerancia natural de las especies al ambiente hostil producido por la fermentación alcohólica (Lonvaud-Funel, 1999). Entre las condiciones que limitan el desarrollo de las BAL se encuentran concentraciones elevadas de etanol, de SO₂, bajo pH y escasas de nutrientes, factores que típicamente son valorados de forma separada/independiente durante la selección de cepas (Zapparoli *et al.*, 2006; Reguant *et al.*, 2005; Carrete *et al.*, 2002). Además, pocas ocasiones se ha evaluado tal tolerancia en distintas especies. En este estudio se combinaron estos factores, para representar una condición similar a la que se enfrentan las BAL durante una vinificación y acercarnos al comportamiento que tendrían realmente estos microorganismos.

Recordemos que en una primera prueba de selección, se determinó la capacidad de las cepas para crecer con 10 % de etanol, 30 mg/L de SO₂ y pH de 3.5, resultando 119 tolerantes que fueron identificadas a nivel especie. Posteriormente se evaluó el comportamiento a concentraciones crecientes de etanol (10, 12 y 13 %), en presencia de SO₂ y bajo pH de manera simultánea en estas 119 cepas tolerantes. La Figura 4.2

muestra la proporción de cepas de cada especie que resultaron tolerantes a las distintas concentraciones de etanol, clasificados por tipo de muestras y bodega de origen.

Como era de esperarse, el número de tolerantes se reduce en la medida que se exponen a una concentración mayor de etanol, disminuyendo alrededor de 50 % los aislados tolerantes a 13 % de etanol, con respecto a 10 % del compuesto (Figura 4.2). En casos como el mosto de Freixenet; vino de Viñedos Azteca y Bodega de Cote, la distribución de las especies tolerantes en cada concentración de etanol fue muy estable, solo tendió a disminuir el número de aislados tolerantes. En contraste, en filtros y barricas de Viñedos Azteca, se observa que solo dos aislados de una especie (*P. parvulus*) fueron capaces de desarrollar con 13 % de etanol, las otras tres especies que se habían identificado toleraron hasta 12 %. Esto probablemente se encuentre asociado a la graduación alcohólica típicamente encontrada en los vinos de la región, que ronda 12 %, y debido a que es una potencial deterioradora la especie que presenta mayor tolerancia, implica un alto riesgo de sufrir alteraciones bacterianas para los vinos de esta bodega.

Los aislados de las especies de *Lactobacillus* se vieron fuertemente afectados a 13 % de etanol. G-Alegría *et al.* (2004) encontraron una mayor tolerancia a etanol en cepas de *L. plantarum* y en general las especies de *Lactobacillus* se consideran tolerantes a etanol (Shane Gold *et al.*, 1992). No obstante, esta característica, claramente variable a nivel cepa, podría estar sujeta a la presión selectiva del medio, más que tratarse de algo inherente a la especie. Al respecto, los vinos queretanos suelen tener una graduación alcohólica de alrededor de 12 % (De la Cruz de Aquino *et al.*, 2012), lo que podría explicar por qué una mayor proporción de aislados de estas especies toleran esta misma condición, pero no una mayor (13 %). Sorpresivamente, se observó un elevado número de aislados de *Lactobacillus* spp. de Freixenet tolerantes (10 de 19 toleran 13 % de etanol), que fueron obtenidos de mosto, donde no habían sido expuestos a estas condiciones limitantes. En este caso, se trata de la vinícola más antigua de la región (30 años), lo cual que sugiere que a través de los años podría haberse favorecido una adaptación de las cepas tanto a condiciones de viñedo como de bodega a lo largo de los años.

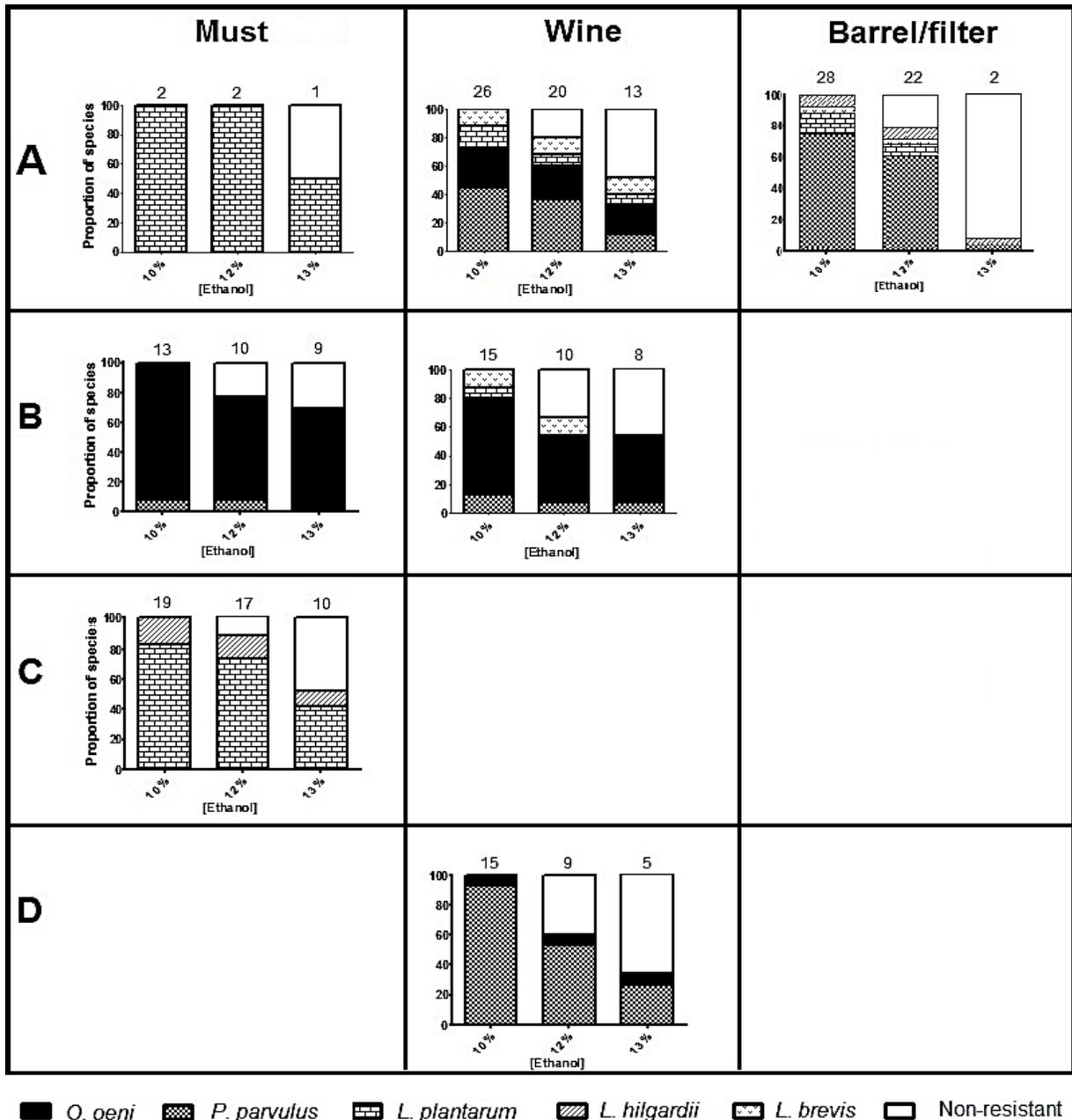


Figura 4.2 Proporción de aislados de cada especie capaz de desarrollar en medio SW con SO₂ 30 mg/L, pH 3.5 y etanol (10, 12 y 13 % v/v) en cada vinícola (secciones horizontales) y tipo de muestra (secciones verticales). El número de aislados tolerantes totales se indica sobre la columna. Letras correspondientes a cada vinícola: Viñedos Azteca (A), Bodega de Cote (B), Freixenet (C) y Vinícola San Patricio (D).

Por su parte, *P. parvulus* una especie indeseable y aparentemente prevalente en las vinícolas locales, se vio fuertemente afectada por concentraciones elevadas de etanol. Particularmente los aislados provenientes de filtros y barricas, de los cuales cerca de 90 % no desarrollaron con 13 % de etanol. Esta sensibilidad podría deberse a que la concentración de etanol en vinos queretanos difícilmente llega a 13 %, y los microorganismos aislados de estas muestras se encuentran adaptados al vino con el que estaban en contacto. Además, el ambiente estresante de las barricas, y su prolongado contacto con etanol, podría ejercer alteraciones en la membrana y a nivel genético que complique una adaptación subsecuente a ambientes más limitantes

El número de aislados de *O. oeni* tolerantes se mantuvo estable o sin disminuciones drásticas al aumentarse los niveles de etanol, incluso con 13 %, lo cual se observa particularmente en aquellos de Bodega de Cote y en las muestras de vino (Figura 4.3). Esto denota una tolerancia natural a este tipo de condiciones que podría llevarla a dominar el vino, característica que previamente ha sido observada en ésta especie (Lonvaud-Funel, 1999).

Con la evaluación anterior podemos constatar que la mayoría de las especies locales consideradas como deterioradoras mostraron poca habilidad para adaptarse a mayores niveles de etanol. Esto puede resultar ventajoso, pues de mejorarse la eficiencia fermentativa e incrementar los niveles de etanol, ya sea con la selección de levaduras o alguna otra estrategia, se disminuye la posibilidad de que estas especies desarrollen y generen compuestos indeseables. Por otro lado, cepas de dos especies sugeridas como cultivos iniciadores (*L. plantarum* y *O. oeni*) muestran capacidad de desarrollar en condiciones fuertemente inhibitorias.

Con la intención ahora de seleccionar cepas con potencial de vinificación, en cepas de estas dos especies se realizó una caracterización en aspectos de interés enológico.

4.4. Caracterización genotípica y fenotípica de *L. plantarum* y *O. oeni*

Se pueden generalizar tres aspectos de interés para la selección de cepas con fines enológicos: el primero es que sean capaces de desarrollar, dominar el mosto y

realizar eficientemente la fermentación. El segundo es que no produzcan compuestos que perjudiquen el perfil sensorial del vino y el tercero que presenten otros posibles beneficios, como la producción de compuestos benéficos al perfil sensorial como volátiles, glicerol u otros, así como capacidad de degradación de sustancias tóxicas y antagonismo de otros microorganismos (Degre, 1993). Para que las BAL funjan como cultivos iniciadores de la FML deben ser capaces, no sólo de permanecer sino de desarrollar en las condiciones limitantes que se han generado tras la FA, que incluyen altas concentraciones de etanol, bajo pH, SO₂ y pocos nutrientes (prácticamente en ausencia de azúcares). Por lo tanto una prueba fundamental es la cuantificación de su desarrollo bajo estas condiciones.

4.4.1. Pruebas de tolerancia (SO₂, bajo pH y etanol)

A partir de los resultados anteriores y las características mencionadas, a las cepas de las especies *O. oeni* (26) y *L. plantarum* (17) que desarrollaron en 12 % de etanol se determinó su capacidad para desarrollar en condiciones de vinificación similares a las que presentan los vinos locales. Para ello, se observaron las cinéticas de desarrollo en dos medios. El primero, medio MRS con 12 % de etanol, 30 mg/L SO₂ con pH de 3.5 y el segundo, vino de la región (estéril; 12 % etanol) enriquecido con 20 % de caldo MRS. Los resultados de tal prueba se muestran en la Figura 4.3. Como una medida del incremento de la biomasa durante la cinética, se empleó el incremento de densidad óptica (DO final – DO inicial) de cada una de las cinéticas generadas para las 44 cepas (43 nativas y un control comercial: CO).

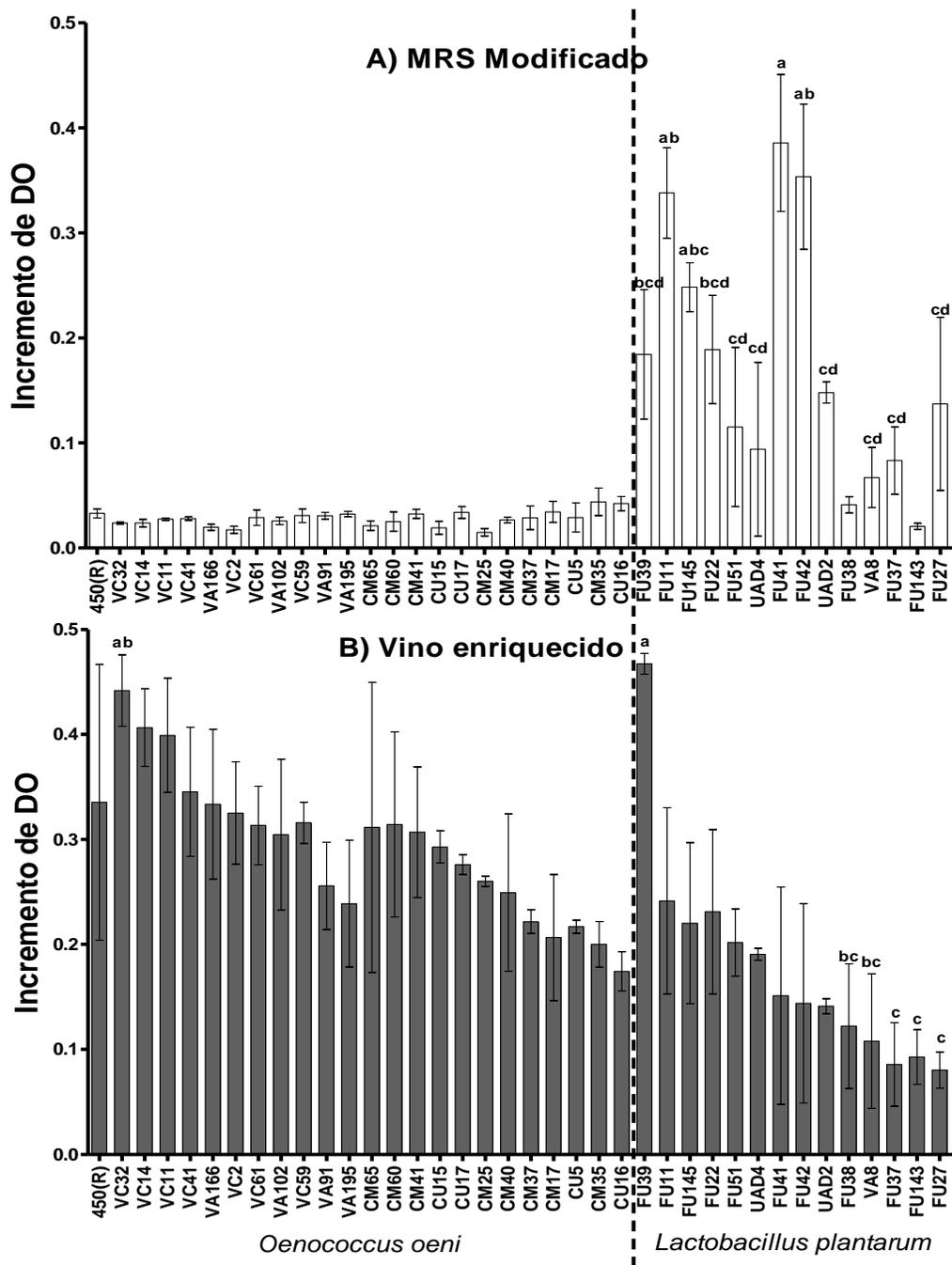


Figura 4.3 Incremento de la densidad óptica en cepas de *L. plantarum* y *O. oeni* evaluada en MRS modificado (A: 12 % etanol) y vino enriquecido (B). Se grafica la medias de tres repeticiones \pm desviación estándar. Letras distintas indican significancia estadística (Tukey; $\alpha < 0.05$). Letras no indicadas en la parte superior corresponden a D y en la inferior a ABC.

A diferencia de la primera prueba de selección a la que se sometieron las 822 cepas (sección 4.3) en que se utilizó medio similar a vino (SW), en ésta se empleó un medio más nutritivo (MRS), con la intención de promover un mayor desarrollo de los microorganismos y así poder estimar parámetros cinéticos que permitieran comparar estadísticamente el desempeño de las cepas. Sin embargo, aún en el caldo MRS el desarrollo de las BAL fue muy discreto, y el modelo no se ajustó a los datos. Por ello se optó por utilizar el incremento alcanzado por cada cepa al final del análisis (72 hr) como variable de respuesta.

En los medios empleados se observó que las cepas de la especie *L. plantarum* mostraron un incremento mayor en medio MRS modificado, opuesto a lo observado en el medio con base de vino. Por su parte, las cepas de *O. oeni* mostraron menor desarrollo en MRS modificado y mayor en el vino enriquecido. Esto, por una parte nos indica que el desarrollo en MRS no se correlaciona con lo que se observaría en un vino, que finalmente es el ambiente donde nos interesa que estos microorganismos desarrollen. A pesar que el medio MRS está diseñado para promover el desarrollo de BAL, el medio a base de vino permitió mayor desarrollo en la mayoría de las cepas. Las BAL son un grupo de microorganismos muy diversos, en específico *O. oeni* desarrolla mejor en vino y a pesar de múltiples modificaciones que se han propuesto hacer al medio MRS para mejorar su recuperación, aún no se tiene una formulación óptima para esto (Corry *et al.*, 2012).

En la Figura 4.3 las cepas de *O. oeni* aisladas de vino (con código que inicia con 'V') corresponden a las primeras 27 barras (hasta VA81) y el resto provienen de mosto. Se observa que las cepas aisladas de vino tienden a mostrar valores de incremento de DO mayores que los de cepas aisladas de mosto. Esto podría estar asociado a la adaptación al medio en que se hicieron desarrollar (vino), donde algunas habían estado previamente expuestas. Por su parte en las cepas de *L. plantarum* no se observó una tendencia clara, si bien la cepa FU39 destacó en el incremento observado en vino. Por

su parte, la cepa *O. oeni* comercial (450[®]) tuvo un comportamiento similar a las nativas de su misma especie, creciendo notoriamente más en vino, pero sin ser sobresaliente.

4.4.2. Perfil genotípico

Un proceso de selección el genotipo fundamentalmente se utiliza para distinguir aislamientos que pudieran ser clonas y disminuir el número de cepas a evaluar, no obstante se sabe que dos genotipos similares no garantizan un comportamiento fenotípico análogo y viceversa (Kunicka-Styczyńska *et al.*, 2012). Por ello se decidió evaluar las 42 cepas tolerantes (y el control comercial; CO) tanto a nivel genotípico como fenotípico y analizar en conjunto los resultados de ambas evaluaciones.

En este caso se incluyeron aislamientos de dos especies por lo que se emplearon dos técnicas de RAPD específicas para cada una. En la Figura 4.4 se muestra el dendrograma generado a partir de los perfiles genéticos para las cepas de la especie *L. plantarum*. En ésta, con las 14 cepas se obtuvieron 13 bandas y formaron 14 grupos, es decir ninguna cepa tuvo un perfil de bandeo idéntico al de otra. Las cepas UAD2 y FU145 con el porcentaje de similitud más alto, de 86 %, provienen de bodegas (Viñedos Azteca y Freixenet, respectivamente) cercanas entre ellas (2 Km aproximadamente) lo que da indicios de presencia de microorganismos comunes entre bodegas cercanas.

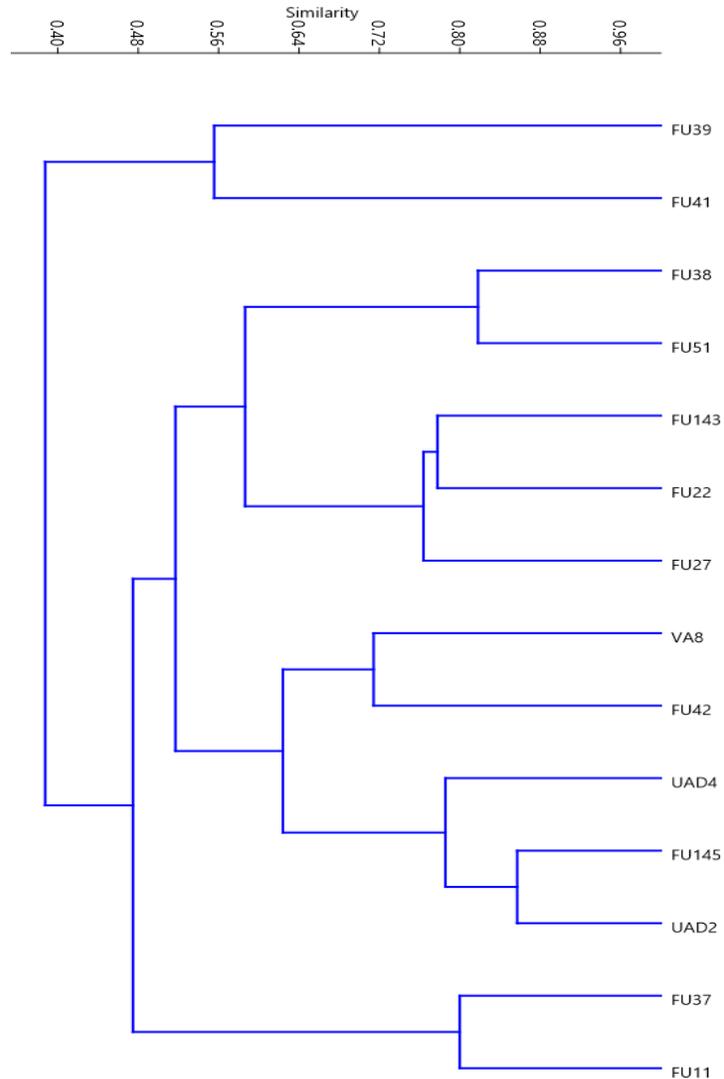


Figura 4.4. Dendrograma de las cepas de *L. plantarum* obtenido a partir de la caracterización genotípica mediante RAPD (M13). Empleando el índice de similitud de Jaccard y el algoritmo de UPGMA (Past3).

En lo que respecta a *O. oeni* (Figura 4.5), con 27 cepas se obtuvieron 19 bandas que formaron 20 grupos, de los cuales tres incluyen a más de un aislamiento, por lo que probablemente se trate de la misma cepa en esos casos. En dos de estos grupos se incluyen aislamientos que provienen tanto de mosto (CU17, CM25) como de vino (VC59, VC61 y VC14), todas de Bodega de Cote. Este resultado sugiere que existen cepas que persisten en el proceso, desde los frutos hasta el vino en FML, dentro de una misma empresa vitivinícola. Otro caso que vale resaltar es el de las cepas VA166

y VC91, las cuales muestran una elevada similitud (90 %) y provienen de dos bodegas geográficamente muy cercanas (Viñedos Azteca y Bodega de Cote, respectivamente), a menos de 3 Km de distancia entre ellas, por lo que resulta factible que las mismas cepas o cercanas en perfil genotípico sean comunes, ya sea por efecto de corrientes de aire o vectores, desde insectos hasta trabajadores.

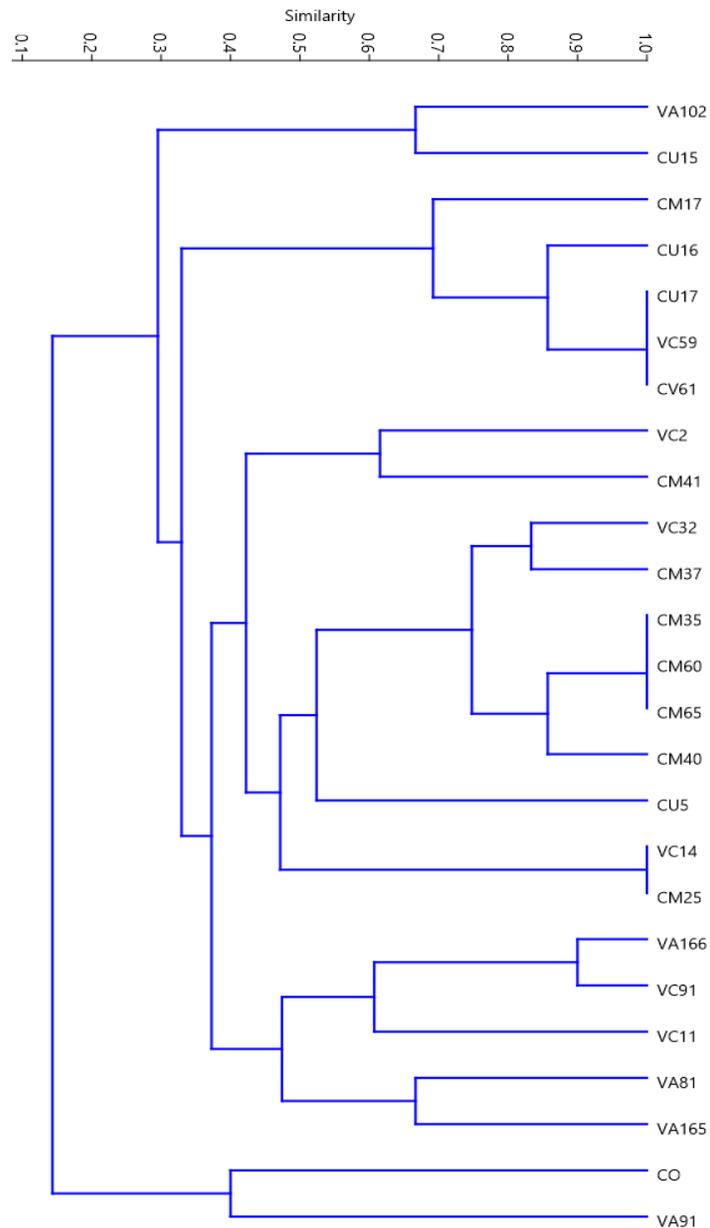


Figura 4.5. Dendrograma de las cepas de *O. oeni* obtenido a partir de la caracterización genotípica mediante RAPD (Coc-On2). Empleando el índice de similitud de Jaccard y el algoritmo de UPGMA (Past3).

4.5. Caracterización genotípica y fenotípica de levaduras *Saccharomyces*

Recordando brevemente, en el caso de las levaduras se partió de 26 cepas nativas del género *Saccharomyces* que habían mostrado capacidad de desarrollar con 200 mg/L de SO₂ y 12 % de etanol (evaluado en medios separados) (Miranda-Castilleja *et al.*, 2015). Para complementar la caracterización fenotípica y realizar una selección de cepas más fundamentada, se decidió evaluar otras características, entre ellas producción de metabolitos indeseables, tolerancia a condiciones inhibitorias combinadas, semejantes a las de vinificación y su compatibilidad con algunas BAL nativas sobresalientes.

4.5.1. Desarrollo en condiciones de estrés osmótico y nitrógeno limitante

Al igual que en las BAL, nos interesaba conocer la capacidad que tienen las levaduras de adaptarse a condiciones limitantes como las presentes en el vino. El primer panorama al que se enfrentan son las condiciones del mosto, en el cual se presenta una elevada concentración de azúcares, que podría causar estrés osmótico en las levaduras (Bauer y Pretorius, 2000). Adicionalmente, la concentración de nitrógeno presente en el mosto suele ser limitada y muy variable (de 60 a 500 mg/L) siendo afectado por numerosos factores como el clima, la variedad, el manejo en campo (fertilización), el procesamiento de la uva, etc. (Bely *et al.*, 1990). Adicionalmente se sabe que el nitrógeno disponible es una variable determinante de la eficiencia fermentativa, pues está relacionada con el metabolismo del carbono y el flujo de hexosas al interior de la célula (Salmon, 1989). Por lo anterior un desarrollo eficiente en condiciones limitantes de nitrógeno y elevadas concentraciones de azúcares, promovería un buen desarrollo en mostos igualmente limitantes.

En la Figura 4.6 se muestra el incremento de DO y la velocidad de desarrollo observada en las 26 cepas de levaduras *Saccharomyces* nativas de viñedos queretanos y un control comercial (K1). Tanto en ésta (Figura 4.6) como en las siguientes dos Figuras de la presente sección, las primeras ocho cepas (incluida K1) son las se destacaron en estudios previos y se habían evaluado hasta ensayos de microvinificación (Miranda-Casilleja *et al.*, 2015).

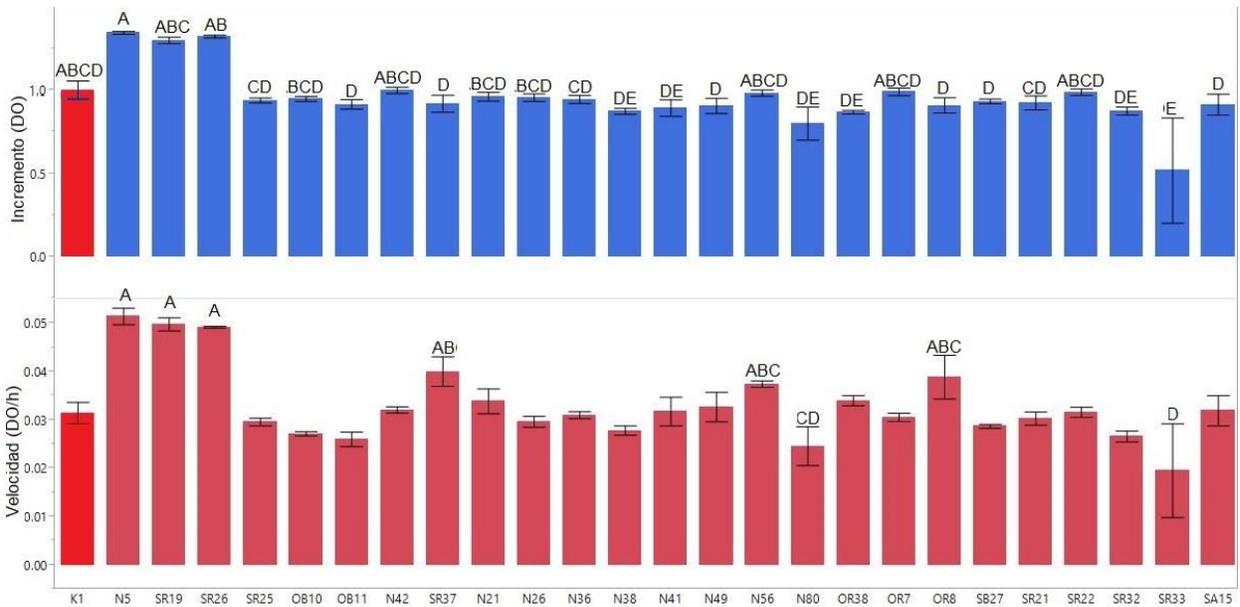


Figura 4.6 Incremento (DO) y velocidad de desarrollo (DO/h) de 27 levaduras *Saccharomyces* spp. evaluadas en medio reducido en nitrógeno (66 mg/L) y elevado en azúcares (35 % glucosa + fructosa). En las barras se representa la media de tres repeticiones \pm su desviación estándar. Letras distintas indican diferencia estadística significativa (Tukey; JMP 11).

Cabe señalar que las dos variables analizadas en esta prueba muestran comportamientos similares ($R^2=0.83$), es decir que las cepas capaces de producir mayor biomasa, fueron también las más rápidas en desarrollar y viceversa. En cuanto al comportamiento de las cepas, observamos que la capacidad de la comercial K1 para tolerar la condición evaluada es intermedia, siendo similar a la de la mayoría de las cepas analizadas. Destacan las cepas N5, SR19 y SR26 que tienen los valores más altos en ambos parámetros cinéticos, lo cual nos indica que son cepas que desarrollan bien en condiciones estresantes. Por el contrario la cepa SR33 se ve con el perfil de desarrollo más bajo.

4.5.2. Tolerancia a SO_2 , bajo pH y etanol

Una vez superadas las condiciones limitantes del mosto, las levaduras incrementan su biomasa, comienzan a fermentar los azúcares y a modificar el medio. El etanol es el principal responsable de inhibir el desarrollo de los microorganismos en

el vino, incluidas las levaduras, por lo que es el mayor factor limitante de la conversión de azúcares en etanol (Ding *et al.*, 2012). Al mostrar capacidad de desarrollar en presencia de elevadas concentraciones de etanol, éste no representaría una limitante para consumir la totalidad de los azúcares y generar un buen rendimiento. La Figura 4.7 muestra la velocidad de desarrollo de las 27 cepas *Saccharomyces* (incluida la cepa comercial) evaluadas en medio GJM con 14 % de etanol, SO₂ y pH de 3.5

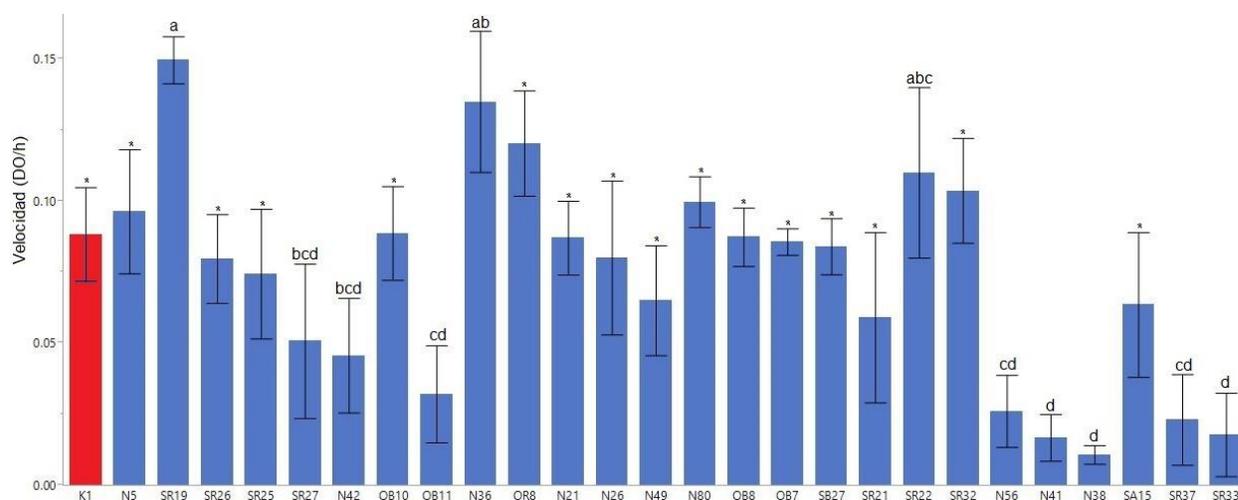


Figura 4.7 Velocidad de desarrollo de 27 levaduras *Saccharomyces* en medio GJM con 14 % de etanol, 50 mg/L de SO₂ y pH 3.5. En las barras se representa la media de tres repeticiones \pm su desviación estándar. Letras distintas indican significancia estadística (Tukey; JMP 11). Barras sin letra corresponden a ABCD.

En este caso se empleó sólo la velocidad de desarrollo para contrastar las cepas, ya que fue el parámetro cinético en el que se observaron las diferencias más marcadas. Nuevamente observamos en K1 un comportamiento intermedio, similar al de la mayoría de las cepas nativas. Entre las nativas las cepas SR19, N36 y OR8 fueron las que desarrollaron más rápidamente, contrastando con las cepas N38, N41, SR37 y SR33. Respecto a lo observado en la condición de bajo nitrógeno y elevada azúcar, algunas cepas coinciden en su buen comportamiento, por ejemplo SR19 nuevamente se destacó del resto, mientras que SR33 fue también poco tolerante.

4.5.3. Floculación

La floculación en levaduras se define como un proceso reversible de agregación celular en masas llamadas flóculos, con la subsecuente sedimentación del medio en que se encuentran suspendidas (Stewart 2009). La habilidad de flocular es característica deseable en una levadura de vinificación, ya que facilita la eliminación de la biomasa formada en el tanque o barrica, disminuyendo el uso de agentes químicos para la clarificación del producto fermentado (Pretorius, 2000). No obstante, lo ideal es que las células permanezcan en un estado no floculante durante el proceso de fermentación, para tener un mayor contacto con el medio, que permita una óptima tasa de fermentación y una eficiente conversión de los azúcares (Soares, 2010). En la Figura 4.8 se muestra el porcentaje de floculación de las 27 cepas *Saccharomyces* analizadas.

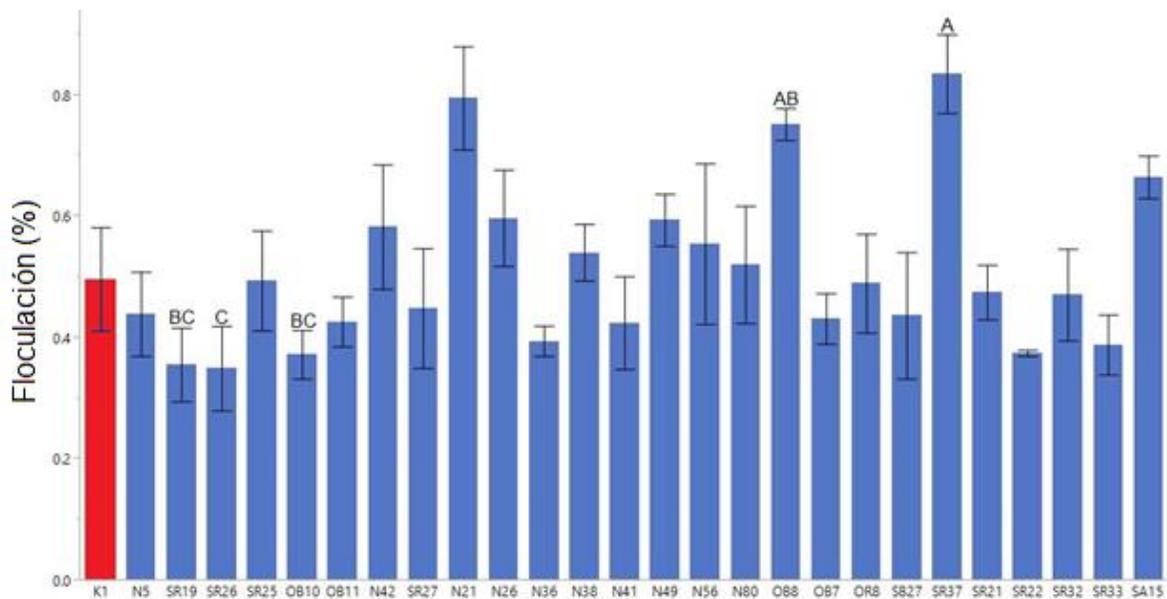


Figura 4.8 Porcentaje de floculación de 27 levaduras *Saccharomyces*. Los valores de las barras representan la media de tres repeticiones \pm su desviación estándar. Letras diferentes indican significancia estadística (Tukey), estimada a partir de la normalización de los datos ($\text{arc-sen } \sqrt{\text{Floc}}$). Letras faltantes ABC

Al igual que en las pruebas anteriores, la levadura de referencia K1 no sobresale. En este caso ninguna de las cepas que había destacado en pruebas anteriores, como SR19, N5, SR26, N36 u OR8 fue altamente flocculante, siendo más bien de éstas de las menos flocculantes (SR19 y SR26). En contraste SR37, OB8, N21 y SA15 se muestran altamente flocculantes, aunque son de las menos hábiles para desarrollar en medios inhibitorios como los probados anteriormente. Esta prueba nos da una idea general de la capacidad que tienen las cepas para floccular, no obstante la flocculación es ampliamente afectada por factores del medio (pH, sales, temperatura, etc.) y de hecho en las levaduras ésta capacidad se ve inducida en las condiciones estresantes (bajo pH, contenido de etanol) que representa la vinificación (Claro *et al.*, 2007).

4.5.4. Análisis conjunto de características cuantitativas

Para observar mejor la relación entre las características que ya se describieron, se realizó un análisis multivariado (Figura 4.9) utilizando los parámetros cinéticos de incremento de densidad óptica (ODi) y tiempo de duplicación $\left[DT = \left(\frac{n2}{\mu}\right)\right]$ en combinación con índice de flocculación, permitiéndonos determinar similitudes entre cepas, así como la contribución de las variables en la distribución de datos y su posible correlación.

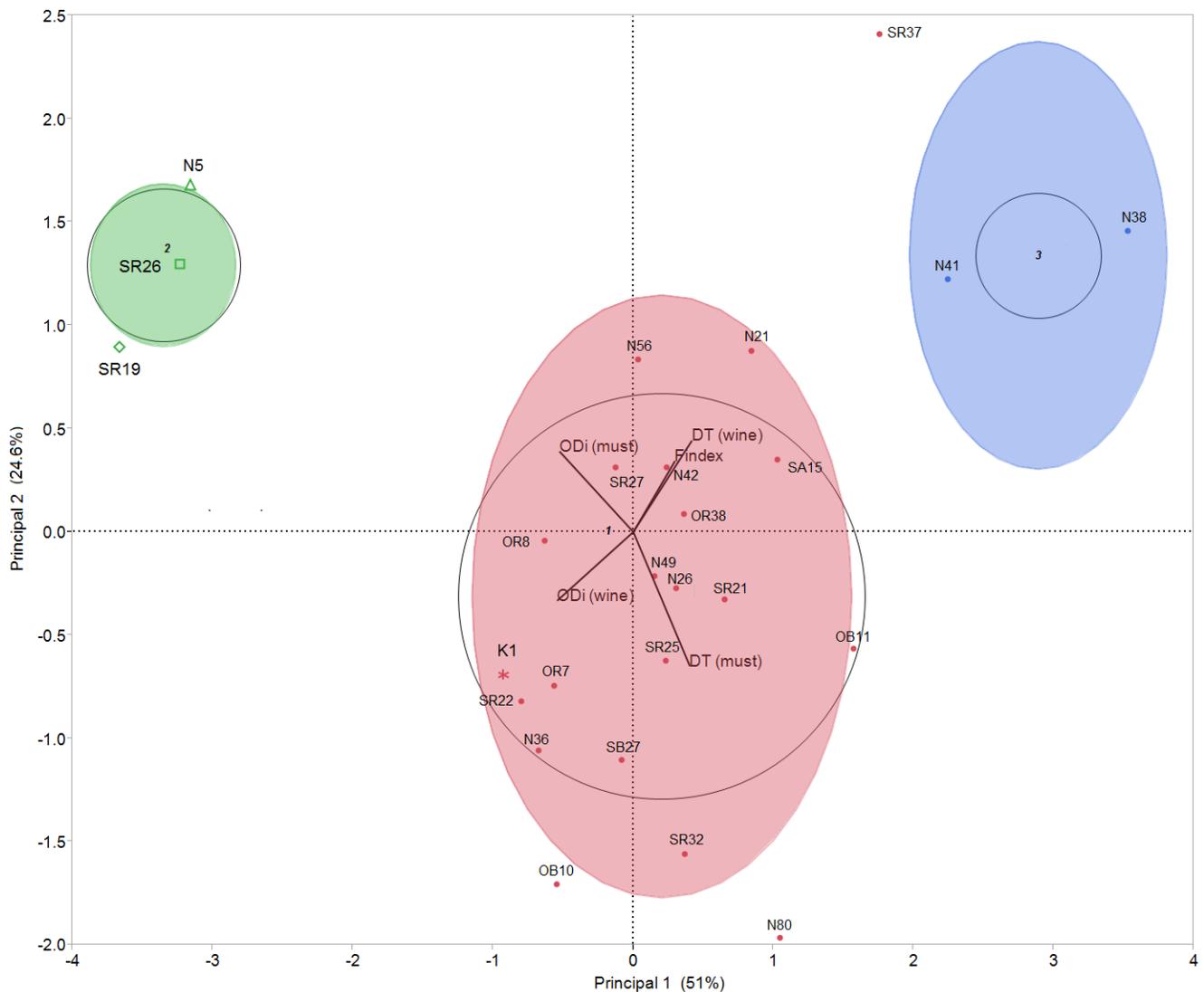


Figura 4.9 Análisis de componentes principales y agrupamiento de K-medias de 26 cepas de levaduras con base en su índice de floculación, tiempo de duplicación (DT) e incremento de densidad óptica (ODi) en las cinéticas de crecimiento en dos condiciones: a) alta concentración de azúcar (350 g/L), bajo contenido de nitrógeno (66 mg/L) con SO_2 (50 mg/L) y b) alto contenido de etanol (14 % v/v), bajo pH (3.5) y SO_2 (30 mg/L) Número de grupo indicado en el centro del elipse.

El análisis multivariado muestra que los dos primeros componentes explican 75.6 % de la variación total de los datos. El componente 1 está influenciado por los parámetros cinéticos de ambas condiciones: positivamente por tiempos de duplicación (TD) y negativamente por ODi, lo cual es lógico ya que estas dos variables suelen ser

opuestas (Lele y Watve, 2014). Particularmente en este estudio las correlaciones entre estos parámetros fueron $r = -0.762$ en el vino y $r = -0.777$ en el mosto, ambos altamente significativos ($p < 0.0001$). Este comportamiento señalaría que las cepas más rápidas también presentarán mayores rendimientos de biomasa en las condiciones evaluadas y, por lo tanto, denota una mayor tolerancia.

Mientras tanto, el índice de floculación (F_{index}) influye positivamente tanto en el componente 1 como en el 2, y aunque en la Figura 4.9 parece estar relacionado con el tiempo de duplicación, la correlación no fue significativa ($r=0.133$; $p=0.518$). Sin embargo, F_{index} se correlacionó significativamente con el incremento de DO en el vino ($r=-0,415$, $p=0,035$). Esto implicaría que la levadura altamente floculante crece pobremente en condiciones similares al vino. La floculación se ha asociado con una mayor tolerancia a algunos inhibidores (Westman *et al.*, 2014), pero no se ha reportado una correlación directa con la producción de biomasa. Por otro lado, las levaduras altamente floculantes y la floculación prematura se han asociado con detenciones de fermentación (Soares, 2010). Esto apoya la idea de que la floculación se desencadena para proteger a las células en condiciones estresantes, pero ello podría ser a expensas de aumentar la producción de biomasa (Stratford, 1992; Verstrepen *et al.*, 2003; Soares, 2010).

De forma general, las cepas de levadura se distribuyeron en tres grupos en función de sus similitudes. El grupo 1 contiene a la mayoría de las cepas, sin un comportamiento sobresaliente, incluyendo a la cepa comercial K1. El grupo 2 contiene a las tres cepas (N05, SR19 y SR26) con el perfil más deseable, floculantes moderadas y con los mayores desarrollos bajo las condiciones limitantes probadas y, finalmente, el grupo 3 incluye a las cepas más floculantes, lentas y pobres en biomasa (N41 y N38).

4.5.5. Características cualitativas

Además de evaluar cuantitativamente la tolerancia a condiciones de vinificación y la capacidad de floculación, se realizaron pruebas cualitativas, que incluyeron: crecimiento a 8 °C, efecto *killer*, producción de ácido acético y ácido sulfhídrico. Estos resultados se analizaron mediante conglomerados junto con la capacidad de floculación transformada a valores semicuantitativos, representando 0 como no floculante, 1

floculante y 2 muy floculante (Tabla A2, anexos). El dendrograma obtenido se representa en la Figura 4.10.

En términos generales de 27 cepas evaluadas 96 % producen H₂S, 85 % no tienen fenotipo *killer* ni producen ácido acético, 81 % son moderadamente floculantes y 61 % crecen a bajas temperaturas, en los grupos formados se señalan características distintivas. Cabe resaltar a la cepa control K1, la cual no se agrupa con ninguna otra ya que ésta tiene efecto *killer* y no produce H₂S, compartiendo en promedio 48 % de similitud fenotípica con las nativas destacadas N05, SR19 y SR26.

Respecto a esta serie de pruebas, lo ideal es que las cepas desarrollen a bajas temperaturas, presenten efecto *killer*, sean floculantes y no produzcan ninguno de estos ácidos. El efecto *killer* les da ventaja competitiva en el medio, y una mayor probabilidad de que dominen al resto de las cepas nativas durante una fermentación comercial (Lopes & Sangorrin, 2010). Los ácidos afectan negativamente el perfil sensorial de los vinos, el sulfhídrico por la producción de mercaptano y consecuente formación de aromas indeseables (huevo podrido) y el acético en cantidades elevadas produce “avinagramiento” del vino (Cordenete *et al.*, 2009). Por último es sabido que la fermentación a bajas temperaturas favorece la producción y estabilidad de ésteres que dan aromas florales y frutales, por lo que es ampliamente deseable que bajas temperaturas no representen un impedimento para el desarrollo de la fermentación (Torija *et al.*, 2003).

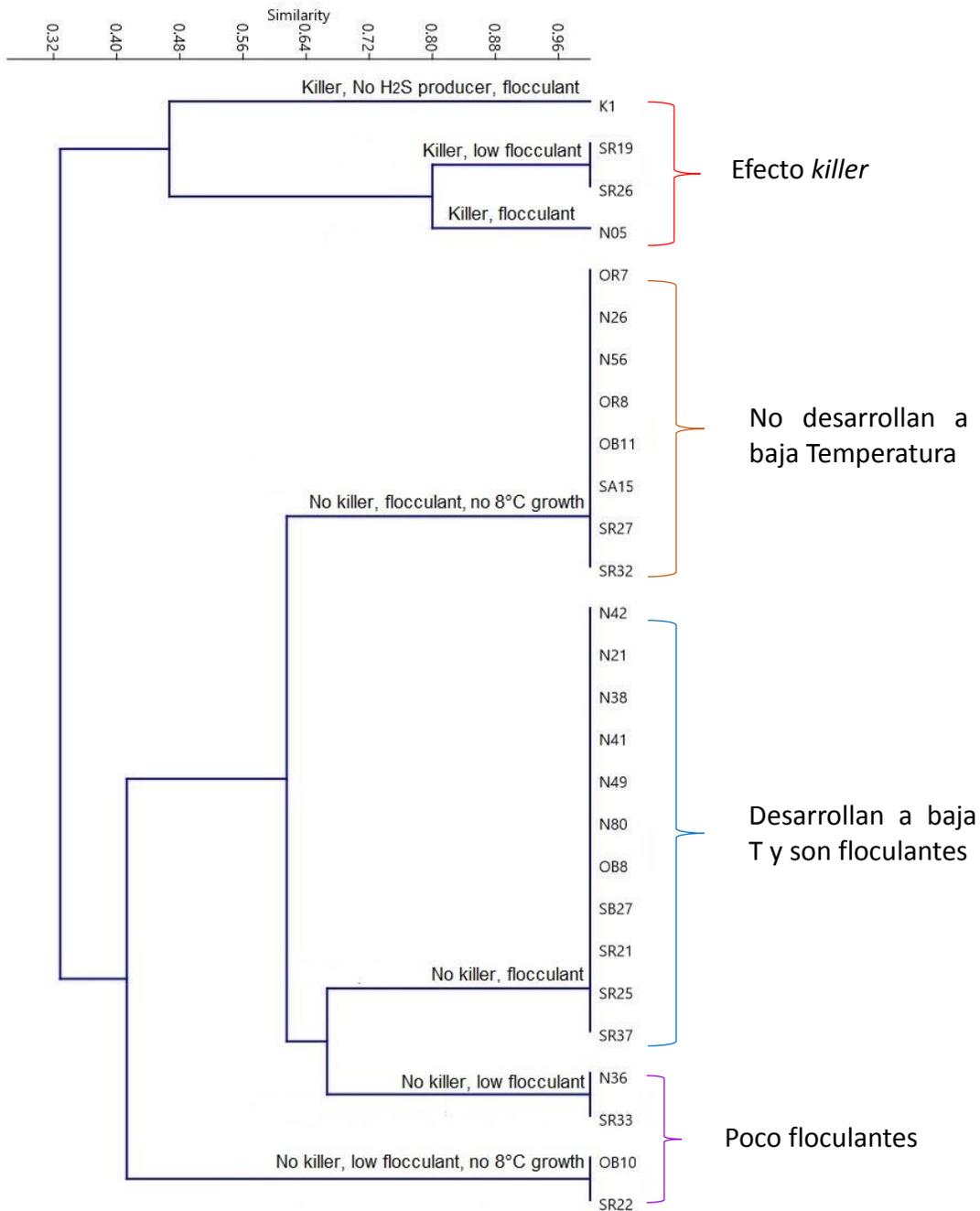


Figura 4.10 Dendrograma de 27 cepas de *Saccharomyces* spp. obtenido con la caracterización fenotípica de: factor *killer*, producción de ácido acético, H₂S, capacidad floculante y de desarrollar a 8 °C (Tabla A2). Construido mediante índices de Jaccard y el algoritmo UPGMA.

4.5.6. Perfil genotípico

La Figura 4.11 muestra el dendrograma de genotipo obtenido a partir de RAPDs de las levaduras *Saccharomyces* (Andrighetto *et al.*, 2000). Con 27 aislados se obtuvieron 14 bandas y se conformaron 20 grupos, tres de éstos incluyen a más de un aislamiento. Dos de estos grupos están formados por aislamientos de distintos viñedos (Barreno y Rosario) que indicaría que, a pesar de que estos viñedos se encuentran en distintos municipios, a unos 60 Km de distancia entre ambos, hay cepas comunes entre ellos. Como se esperaba, el control comercial K1 presentó un perfil genotípico con una similitud de sólo 30 % con el resto de las cepas nativas, diferenciándose bien de éstas. Por su parte la cepa OR8 también se distingue del resto de las cepas nativas, con alrededor de 10 % de similitud, esto debido al poco número de bandas (2) que mostró en su perfil derivado de RAPD.

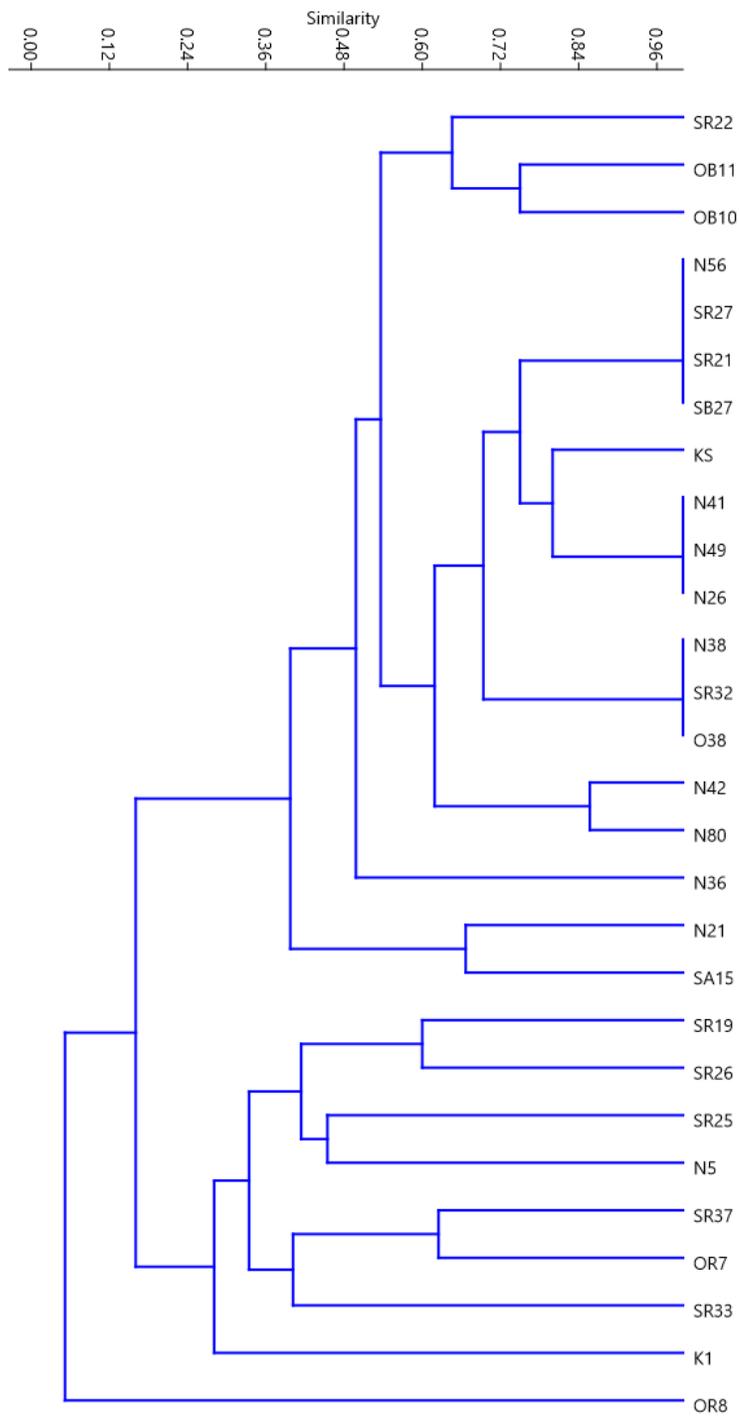


Figura 4.11 Dendrograma de las cepas de levaduras *Saccharomyces* obtenido a partir de la caracterización genotípica mediante RAPD (RF2). Empleando el índice de similitud de Jaccard y el algoritmo de UPGMA (Past3).

4.6 Compatibilidad Levadura-BAL

De los dos conjuntos del dendrograma que reúnen características enológicas interesantes y descartando genotipos idénticos, se seleccionaron cinco cepas de levaduras nativas (N42, N5, SB27, SR19 y SR25), así como las cuatro cepas de BAL (CU15, FU39, VA91 Y VC32) que tuvieron mayor desarrollo en “vino modificado”, incluyendo los respectivos controles comerciales (K1: *S. cerevisiae* y 450[®]: *O. oeni*). Para evaluar en interacciones, se simuló un proceso secuencial en medio similar a jugo de uva (GJM, por sus siglas en inglés), en el cual la levadura modifica el medio en el cuál es posteriormente inoculada la BAL para que desempeñe la FML.

En la Figura 4.12 se observa el incremento DO relativo que mostró cada BAL (eje x), con el medio producido por cada levadura (barras). Primeramente, al ser los valores de incremento relativo positivos significa que las BAL desarrollan más en un medio donde ya ha actuado alguna levadura que en el medio por sí solo. Como se puede observar, existe una interacción positiva o sinérgica en la mayoría de las combinaciones levadura-BAL. En este caso la acción de las levaduras fue detenida tras 12 horas, por lo que los nutrientes del medio no habían sido totalmente consumidos, además algunos metabolitos y/o enzimas de las levaduras, pudieron haber sido secretados favoreciendo la liberación de nutrientes de fácil asimilación al medio (Lonvaud-Funel, 2015). A esta generalidad se exceptúa la BAL CU15, la cual tuvo valores de incremento relativo cercanos a cero, es decir desarrolla de forma similar con o sin la acción previa de las levaduras evaluadas (efecto indiferente).

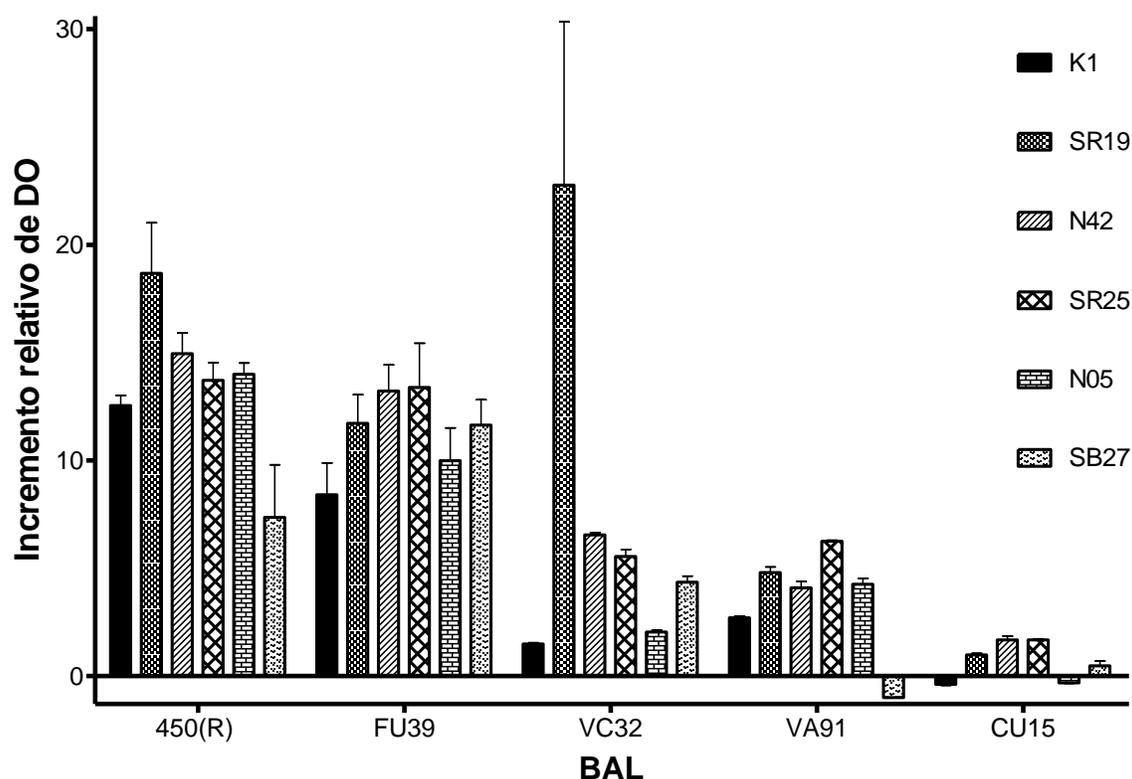


Figura 4.12. Incremento relativo de DO $\left[\frac{DO_{i\text{Con levadura}} - DO_{i\text{sin levadura}}}{DO_{i\text{sin levadura}}} \right]$ de cinco BAL para determinar su compatibilidad con seis levaduras *S. cerevisiae*, las cepas 450[®] (*O. oeni*) y K1 fungieron como referencias comerciales. Las barras representan el valor medio de tres repeticiones y su desviación estándar.

En general, se observa que el desarrollo de la BAL depende de la combinación particular de cepas, un aspecto frecuentemente mencionado en otros estudios de interacción (Frey-Klett *et al.*, 2011; Nehme *et al.*, 2008 & 2010; Sieuwerts *et al.*, 2018). Las combinaciones más destacadas fueron las de la BAL nativa VC32 con SR19, seguida de la combinación de la misma levadura con la comercial 450[®]. Entre las levaduras, destacó SR19 permitiendo en promedio el mayor desarrollo de las BAL, aunque su efecto es estadísticamente similar al de las cepas SR25 y N42 (Anexos, Tabla A3).

Los tratamientos con menor desarrollo fueron los que incluyeron a la BAL CU15 o a la levadura comercial K1. La única combinación donde no hubo desarrollo de la BAL fue VA91 con la levadura SB27. La cepa FU39, única de la especie *L. plantarum*, muestra el comportamiento más uniforme independientemente de la levadura que hubiera actuado en el medio. Lo observado en la Figura 4.12 puede verificarse mediante el análisis de varianza y prueba de medias reportadas en anexos (Tabla A3).

4.7 Caracterización fermentativa de BAL seleccionadas

A los factores hasta ahora considerados para selección de cepas se sumó el efecto de interacción observado y se seleccionaron dos levaduras (*S. cerevisiae*) con características destacadas que permiten un buen (SR19) o moderado (N05) desarrollo de las BAL, y las dos BAL nativas que tuvieron mayor desarrollo con las distintas levaduras; a esto se añadió el interés de contrastar dos distintas especies: FU39 (*L. plantarum*) y VC32 (*O. oeni*). A las cepas de BAL seleccionadas se complementó su caracterización fenotípica, que hasta ahora incluía sólo aspectos de desarrollo, determinando sus cinéticas fermentativas en medios sintéticos y condiciones óptimas de preparación de inóculos, antes de evaluarlas en microvinificaciones secuenciales.

4.7.1. Eficiencia fermentativa de BAL seleccionadas en medio sintético

Ambas cepas nativas probadas mostraron cinéticas de consumo muy similares en las condiciones evaluadas del medio WLM (Figura 4.13). El medio WLM permite tener condiciones estándares y controladas que asemejan las de vinificación, con un bajo pH (3.5), concentraciones modificables de etanol, un mínimo de azúcares (fructosa) y sólo aquellas sales indispensables para la supervivencia de las BAL. Los compuestos nitrogenados se encuentran en una concentración de 2 g/L, que si bien son más elevados que los presentes en un vino estándar (de rango entre 0.1 y 1g/L), son sensiblemente menores al contenido en un medio nutritivo.

La especie *L. plantarum* ha sido previamente reportada como igualmente capaz que *O. oeni* de efectuar la FML, e incluso ofreciendo ventajas por ser homofermentativa (por tanto sin producción de ácido acético) y siendo algunas cepas capaces de degradar aminas biogénicas (G-Alegría, *et al*, 2004; Capozzi *et al.*, 2012). Sin embargo, su tolerancia a etanol suele ser menor a la de *O. oeni* (López *et al.* 2008) y algunas cepas pueden ser productoras de compuestos indeseables en el vino. La cepa que se evalúa en este caso ya había demostrado tolerancia a concentraciones de etanol de hasta 13 %, en esta prueba nuevamente se evidencia su tolerancia a 12 % ajustado en el medio y capacidad el consumir ácido málico de manera comparable a *O. oeni*.

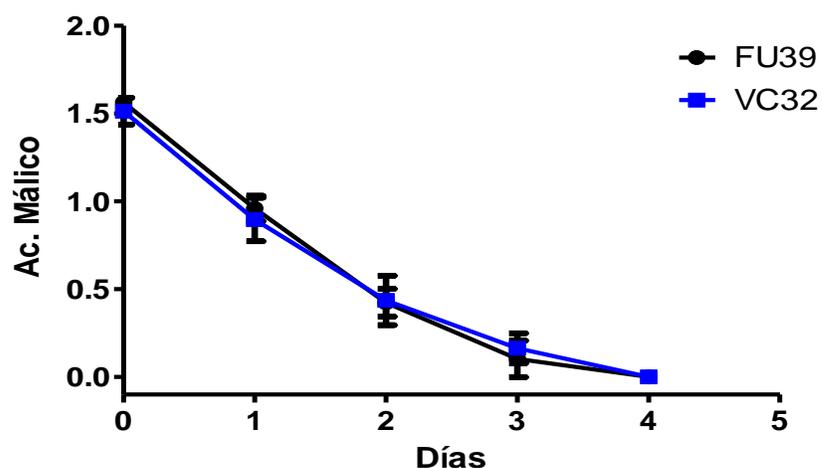


Figura 4.13 Cinética de consumo de ácido málico (g/L) de las dos BAL nativas seleccionadas en WLM.

4.7.2 Preparación de inóculos y preadaptación de cepas autóctonas

Se evaluaron dos medios para la obtención de inóculos y preadaptarlos para el estrés al que se enfrentarían al ser introducidas en el vino. Uno fue el MRS adicionado de glutatión y el segundo MRS suplementado con vino (1:1). En la Figura 4.14 se observa que la cepa VC32 (líneas continuas) fue capaz de consumir la totalidad del ácido málico independientemente del medio empleado para el inóculo. Mientras que la

cepa FU39 (líneas discontinuas) no pudo realizar la FML cuando el cultivo fue preparado en MRS-glutati3n. Tambi3n se aprecian diferencias en relaci3n a la levadura que realiz3 la FA (izquierda N05 y derecha SR19) siendo m3s r3pido y homog3neo el consumo de 3cido m3lico en el vino procedente de la levadura SR19, que conten3a una mayor cantidad inicial de m3lico.

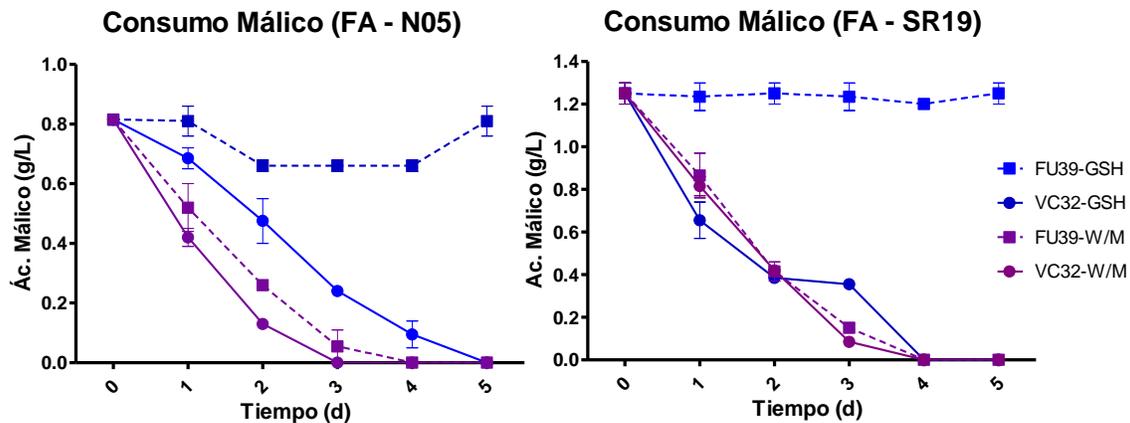


Figura 4.14 Consumo de 3cido m3lico de las cepas nativas FU39 y VC32 en vino producido por las levaduras N05 y SR19, evaluando dos formas de preparaci3n de in3culo: MRS adicionado de glutati3n (GSH) y una pre-adaptaci3n en medio MRS con vino proporci3n 1:1 (W/M). Valores de la media de tres repeticiones \pm desviaci3n est3ndar.

Los recuentos mostraron al momento de la inoculaci3n poblaciones de entre 7 (FU39: *L. plantarum*) y 8 (VC32: *O. oeni*) Log UFC/mL, que disminuyeron alrededor de un ciclo logar3tmico hacia el final de la FML, quedando 6 y 7 Log UFC/mL respectivamente. La cepa FU39 con glutati3n mostr3 al momento de la inoculaci3n una poblaci3n de 7.5 Log UFC/mL, que ser3a suficiente para realizar la FML (S3nchez *et al.* 2010). Al no observar ning3n consumo se realiz3 un nuevo recuento al d3a 3 para comprobar que quedar3n c3lulas suficientes, pero la poblaci3n fue de poco menos de 4 Log UFC/mL, que resultan insuficientes para realizar la FML, concluyendo que para esta cepa, la adici3n de glutati3n durante la preparaci3n del in3culo no le confiere ventaja alguna para su adaptaci3n al medio.

El glutatión es un tripéptido formado por glutamilo, cisteína y glicina, el cual en su estado reducido (GSH) funge como donador de electrones a especies reactivas de oxígeno gracias al grupo tiol de la cisteína, por ello es conocido por su papel como protector de estrés oxidativo en plantas, animales, hongos y diversas bacterias (Pophaly *et al.* 2012). La ruta para su biosíntesis es escasamente presente en bacterias ácido lácticas, particularmente ausente en *O. oeni* por lo que se considera un nutriente esencial, que la bacteria es capaz de incorporar desde el medio a su metabolismo, favoreciendo su adaptación a las condiciones de la vinificación (Margalef-Catalá *et al.*, 2015). Por su parte, algunas especies de *Lactobacillus* son capaces de sintetizar glutatión, pero se considera que *L. plantarum* comparte con *O. oeni* la incapacidad de sintetizarlo; siendo sólo capaz de incorporarlo y reciclarlo, pero su efecto en condiciones de vinificaciones no ha sido aún estudiado (Kullisaar *et al.*, 2010). Los resultados observados en este ensayo nos permitieron definir la forma en que habrían de prepararse los inóculos de las BAL para el proceso de microvinificación, que fue en medio MRS con vino (1:1).

4.8 Ensayos de microvinificación con de levaduras y BAL seleccionadas

En una selección de cepas, es necesario verificar que las características destacadas por las que fueron elegidos los microorganismos se mantengan en un proceso real. En la siguiente etapa de caracterización de las cepas de levaduras y BAL previamente seleccionadas, se realizaron vinificaciones a microescala (microvinificaciones). Siguiendo la metodología tradicional para vinificación en tinto, empleando la variedad 'Cabernet Sauvignon' e inoculando de manera secuencial e individualmente las cepas de levadura (N05 y SR19) y BAL (FU39 y VC32).

4.8.1 Fermentación alcohólica

La Figura 4.15 ilustra la evolución de la FA producida por cada levadura evaluada. Se observa que la cepa SR19 tuvo un consumo más acelerado comparado

con la cepa N05. Sin embargo, para el día 12 la densidad del vino con ambas levaduras era similar (<990), manteniéndose constante por dos días, con lo que se consideró concluida la FA a los 11 días. Durante el proceso la temperatura se mantuvo sobre 22 °C, incrementándose ligeramente durante la fermentación tumultuosa, tal como se espera debido al incremento en población y actividad metabólica de las levaduras.

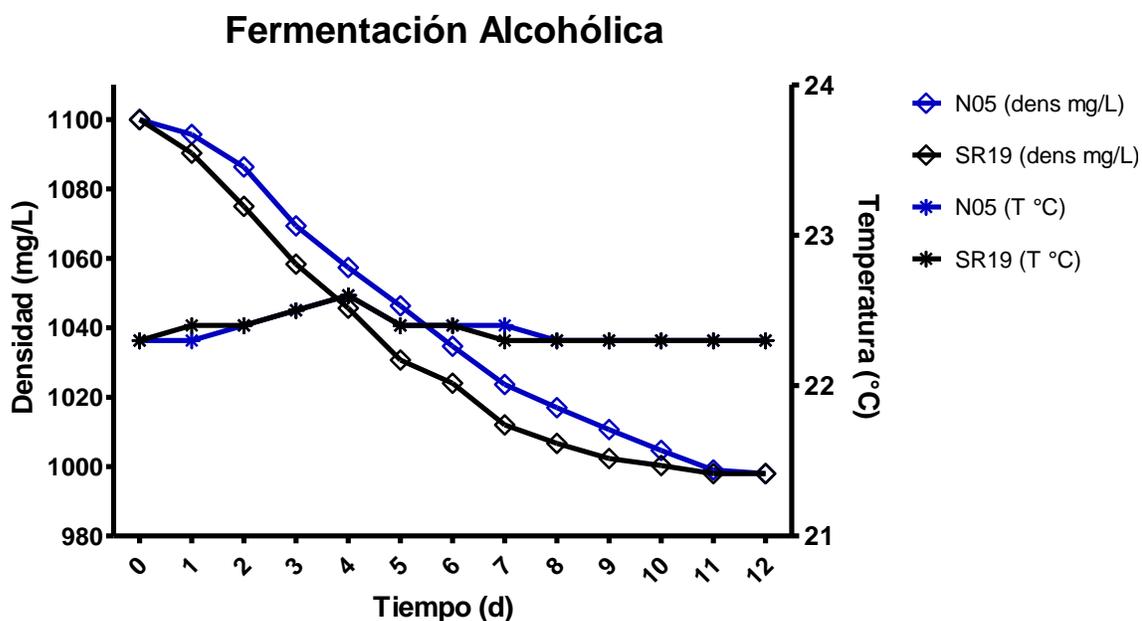


Figura 4.15. Evolución de la fermentación alcohólica realizada por las levaduras nativas *S. cerevisiae* N05 y SR19, en vinificación en tinto con ‘Cabernet Sauvignon’. Valores de la media de tres repeticiones \pm desviación estándar.

Una vez concluida la fermentación alcohólica el vino se prensó, se eliminaron los sedimentos y se tomaron alícuotas para los respectivos análisis físicos y químicos de calidad. En la Tabla 4.3 se muestran las características del mosto de partida y en la Tabla 4.4 las de los vinos obtenidos con cada levadura nativa, en lo que respecta a pH, acidez volátil y acidez total titulable no se observaron diferencias atribuibles a la cepa. El grado alcohólico fue ligeramente superior en la cepa SR19, que se vio reflejado en una eficiencia de 98.6 % y un requerimiento de 17.8 g de azúcares para producir un grado alcohólico. Contrastando con una eficiencia de 93.5 % y requerimientos de 18 g/°Alc para la levadura N05.

Estos resultados contrastan con lo reportado para la cepa N05, que previamente había mostrado ser más eficiente que la cepa SR19 (Miranda-Castilleja *et al.*, 2015). En el experimento reportado con anterioridad, se trabajó en mostos estériles de uvas provenientes de Querétaro y en esta ocasión se realizó una fermentación tradicional, con uvas provenientes de Tarragona, España. En consecuencia, el mosto empleado para el presente estudio resulta más complejo en composición (con alta concentración de azúcares, compuestos fenólicos, relativamente baja concentración de nitrógeno, etc.) e incluye la presencia de microbiota nativa (Kontoudakis *et al.*, 2011).

Tabla 4.3 Composición del mosto empleado para las microvinificaciones.

	pH	GAP	A. Málico	Glu/fru	YAN	ATT	AR
MOSTO	3.57	13.8	1.27	231.5	90	5.7	247.4

GAP – Grado alcohólico potencial (% v/v)

YAN – Nitrógeno asimilable (g/L) (amoniaco: +NH₄ más alfa amínico: +NH₂)

ATT – Acidez total titulable (g/L ácido tartárico)

AR - Azúcares reductores (g/L)

Tabla 4.4 Composición obtenida por la FA del mosto ‘Cabernet Sauvignon’ inoculando cepas *S. cerevisiae* nativas queretanas.

	pH	Alcohol (%)	AV**	A. Málico	Glu/Fru	YAN	ATT	AR
SR19	3.5±0.1 nd	13.8±0.06 a	0.3±0.01 nd	1.2±0.05 a	0.07±0.04 b	50.1±1.36 b	6.9±0.25 nd	1.6±0.23 b
N05	3.4±0.1 nd	13.6±0.1 b	0.3±0.01 nd	1.05±0.14 b	0.98±0.11 a	60.3±1.66 a	6.7±0.35 nd	2.5±0.25 a

* Valores reportados en las unidades previamente definidas, como la media de tres repeticiones ± desviación estándar. Letras diferentes indican significancia estadística por la prueba de medias de Tukey (JMP 11.1) y nd indica diferencia estadística no detectada.

**AV – Acidez volátil (g/L de ácido acético)

En cuanto a los otros compuestos, la cantidad de ácido málico permaneció intacta en la fermentación inoculada con la cepa SR19, mientras que en la fermentación con la cepa N05 se consumieron alrededor de 0.2 g/L de este ácido. Es de notarse que el consumo de este ácido no se vio reflejado en el pH, ni en la ATT, aunque en esta última variable la levadura N05 (con menos málico) fue ligeramente inferior a la cepa SR19, no obstante, la variabilidad de los datos no permite una clara separación de medias. La cantidad de nitrógeno asimilable también fue distinta, mostrando una mayor cantidad en la fermentación conducida por la cepa N05. Tanto la cepa N05 como SR19 mostraron requerimientos de nitrógeno similares (Figura 4.6 y Figura A1), por lo que la mayor presencia de compuestos nitrogenados en una y otra fermentación pudiera relacionarse a la presencia de otros microorganismos, ya sea que consumieran más nitrógeno en la fermentación con la cepa SR19, o bien que algunos de los microorganismos presentes en la fermentación con N05 fueran autolíticos, capaces de liberar compuestos nitrogenados en el medio (Pérez-Bibins *et al.*, 2015).

En general, muchas de las diferencias observadas entre las levaduras pudieran atribuirse a la presencia de microorganismos nativos, que como ya se mencionó, no habían estado presentes en los experimentos previos. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren una mayor capacidad de establecimiento y dominancia por parte de la cepa SR19 comparada con N05. Esto también se refleja en el arranque de la FA, que fue más lento con la cepa N05, esta diferencia inicial puede ejercer efectos importantes, pues el mosto al inicio es muy rico en nutrientes y diversidad de microorganismos que, si se les da oportunidad, pueden consumir compuestos nitrogenados, ácidos orgánicos (como el málico) y producir poco o nada de alcohol (Albergaria & Arneborg, 2016). Para confirmar esta capacidad dominante de SR19 sobre N05, lo ideal es escalar los experimentos a nivel de bodega y, mediante técnicas moleculares, generar un marcador específico para la cepa nativa inoculada, que nos permita determinar el porcentaje de implantación de cada cepa y nuevamente asociarlo con el arranque y la eficiencia fermentativa. Adicionalmente, es necesario hacer evaluaciones similares durante varias temporadas (vendimias), y determinar si existe algún factor climático que pudiera favorecer a una u otra cepa.

Un control adicional que se tuvo para observar si alguna cepa nativa era capaz de realizar el proceso espontáneo de manera comparable con las cepas inoculadas, consistió en dar seguimiento (densidad y temperatura) a un recipiente de 1 L de mosto igualmente tratado, pero sin la inoculación de ninguna levadura. En este caso se observó un arranque de fermentación hacia el quinto día, cuando los tratamientos inoculados iban a la mitad de la FA, también en esta fermentación adicional se percibieron aromas mohosos y avinagrados que denotaban el desarrollo de microorganismos indeseables. La disminución de la densidad fue mucho más lenta (5 g/L promedio, comparada con 10 g/L promedio en las inoculadas), con lo que se consideró que en la microbiota nativa natural no se encontraba ninguna cepa que pudiera haber realizado la fermentación observada en los tratamientos inoculados.

4.8.2 Fermentación maloláctica

Como se describe en la sección de metodología, el vino proveniente de tres FA de la misma levadura se mezcló para obtener un vino por cada levadura para los ensayos de FML. Las características de estas mezclas se observan en la Tabla 4.5. Los datos son similares pero no corresponden al promedio de las tres fermentaciones como se presentan en la Tabla 4.4.

Tabla 4.5 Composición de la mezclas de tres FA de las cepas N05 y SR19 (respectivamente).

FA	pH	Alcohol (%)	A. Acético	A. cítrico	A. Málico	Glu-fru	YAN	ATT	AR
Mz SR19	3.45	13.9	0.3	0.677	1.27	0.08	50	7	1.8
Mz N05	3.38	13.5	0.3	0.721	1	1.04	60	6.8	2.5

*Valores reportados en las unidades previamente descritas.

Las cinéticas de consumo de ácido málico observadas durante la FML se representan en la Figura 4.16. En dicha figura y en lo subsecuente la combinación de cepas se señala con la letra correspondiente a cada levadura (S - SR19 o N - N05) y una para cada BAL (C – CH11, U – FU39 y V- VC32).

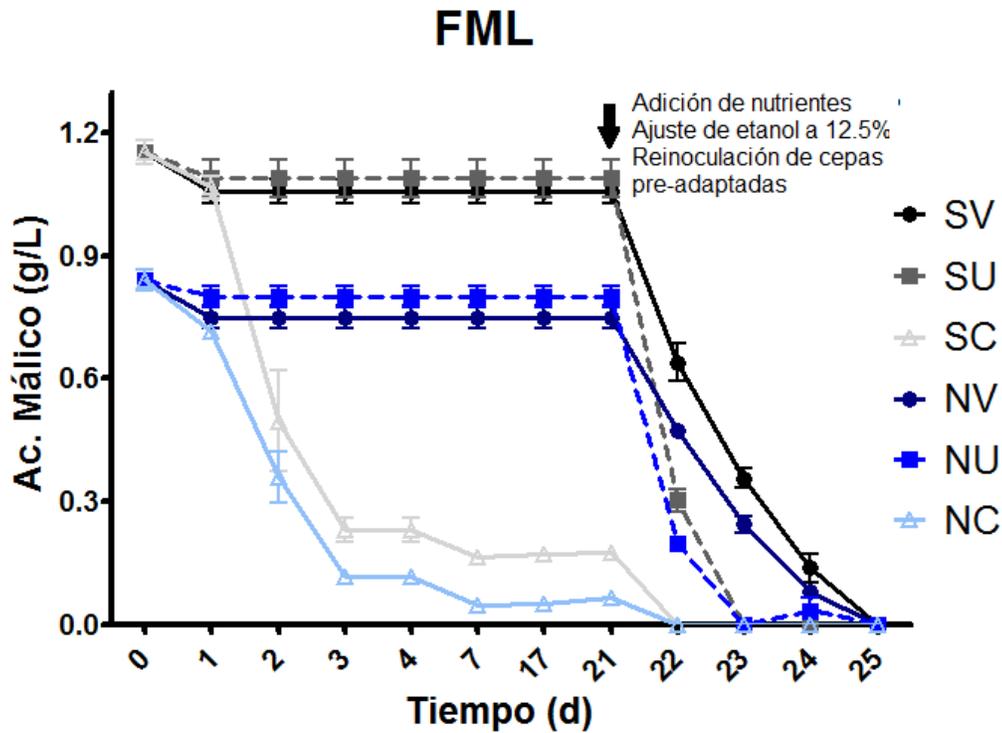


Figura 4.16. Evolución de la FML realizada por las cepas nativas FU39 (*L. plantarum*), VC32 (*O. oeni*) y la comercial CH11 (*O. oeni*) a partir de los vinos obtenidos por las levaduras N05 y SR19. Indicadas en combinación como la primer letra referente a la levadura (S o N) y la segunda a la cepa de BAL (U, V o C, respectivamente)

Respecto a la cinéticas de FML, la cepa comercial CH11 fue la única capaz de consumir ácido málico con los vinos tal cual fueron obtenidos tras la FA, con grados alcohólicos superiores a 13.5 %. Las cepas de BAL nativas, más sensibles a altos niveles de alcohol en el vino, requirieron un ajuste de éste para asemejarlo al grado alcohólico habitual de los producidos en Querétaro. Para ello, el vino se diluyó con agua destilada estéril, para alcanzar 12.5 % de grado alcohólico, se añadieron nutrientes (Actimax OENI®, Agrovín) a razón de 10mg/L y se reinoculó el medio con 5 % de inóculo preadaptado en medio W/M, tal como se describe en la sección 3.2.

La incapacidad de los microorganismos nativos de realizar la FML en los vinos tras la FA puede deberse a varios factores, el principal inhibidor de las FML a nivel industrial es el grado alcohólico que produce alteraciones estructurales en la membrana plasmática llegando a dañar de manera irreversible la célula (Chu-ky *et al.*, 2005).

Aquellos microorganismos que han sido expuestos de manera recurrente a altas graduaciones alcohólicas en los vinos llegan a adaptarse y ser capaces de sobreponerse a estas condiciones y realizar el proceso fermentativo (Bordas *et al.*, 2013). Probablemente debido a que la graduación de los vinos en la región de Querétaro no suele ser elevada, los microorganismos seleccionados no se encontraban adaptados a estas condiciones. Al diluir el grado alcohólico se generó un ambiente al cual pudieron adaptarse y realizar efectivamente el proceso fermentativo.

Cabe mencionar que al diluir el vino también disminuyó la concentración de otros compuestos que pudieron haber afectado a las BAL nativas, tales como compuestos fenólicos o toxinas, con lo que queda por determinar qué factor afecta más a las cepas nativas (Reguant *et al.*, 2000; Comitini *et al.*, 2005). Por otro lado también se disminuyeron aún más los nutrientes presentes en el vino, por lo que se decidió agregar las llamadas cortezas de levadura (Activmax Oeni®) que aportan algunos aminoácidos, minerales, a la vez que absorbe algunos ácidos grasos, posibles inhibidores de las BAL. Se decidió realizar tal tratamiento para garantizar que se realizara la FML y poder hacer la respectiva comparación entre cepas, pero tratando de imitar las prácticas que se llevan a cabo en bodega.

Una vez ajustado el medio se presentó de manera normal la FML con las cepas nativas. En la Figura 4.16 se observa que la cepa *L. plantarum* consumió más rápidamente el ácido málico (SU 0.03 g/h; NU 0.024 g/h) que la nativa *O. oeni* (SV 0.012 g/h; NV 0.01 g/h). Si consideramos únicamente el periodo en que en efecto ocurrió la FML con las cepas nativas, la velocidad de FU39 (*L. plantarum*) supera tanto a *O. oeni*, como a la de la cepa comercial (0.016 g/h SC; 0.011 g/h NC) una vez que ha logrado superar la etapa inicial de adaptación al medio, lo que resulta muy interesante. Resultados similares han sido reportados recientemente por Brizuela *et al.* (2016), quienes evaluaron cepas de *O. oeni* y *L. plantarum* para realizar la FML en vinos de la región de Patagonia, sus cepas fueron capaces de tolerar concentraciones de etanol superiores a 14 % y la cepa de *L. plantarum* fue, no solo más eficiente, sino que además no requirió aclimatación, mostrando superioridad respecto a *O. oeni*. Esto destaca una

vez más las diferencias en comportamiento que pueden encontrarse entre cepas de una misma especie.

Las características de los vinos obtenidos justo al finalizar la FA y una vez concluida la FML muestran diferencias, tal como se observa en la Tabla 4.6. Como era de esperarse, se incrementó ligeramente el pH en la FML por el consumo de ácido málico. Por su parte la ATT no mostró diferencias entre ambas etapas, ésta aunque se relaciona con el pH no necesariamente tiene el mismo comportamiento, ya que dependiendo de los ácidos presentes se puede modificar de manera distinta el pH y la ATT. El ácido acético en la FML se incrementó con ambas cepas, aunque permanece en rangos adecuados, este incremento también es normal ya que las bacterias lácticas producen ácido acético. En el caso concreto de la cepa *L. plantarum*, este ácido no se origina por fermentación de las hexosas, sino por otras vías metabólicas como la del citrato (Capozzi *et al.*, 2012).

Tabla 4.6 Composición promedio de los vinos obtenidos tras la FA y la FML respectivamente, independientemente de las cepas empleadas.

	pH	A. acético	A. cítrico	YAN	ATT
FA	3.44 ± 0.02 b	0.31 ± 0.007 b	0.75 ± 0.015 a	130 ± 1.5 a	6.8 ± 0.12 nd
FML	3.58 ± 0.01 a	0.38 ± 0.004 a	0.02 ± 0.009 b	106 ± 0.9 b	6.6 ± 0.07 nd

nd – Diferencia estadística no detectada.

Por su parte, los tratamientos no mostraron diferencias en las variables evaluadas al final de la FML (Tabla 4.7), lo cual es positivo ya que indica que los vinos son comparables con los producidos por cepas comerciales. En general, consumen poco ácido cítrico que podría derivar en una elevada producción de lactato de etilo y ácido acético, lo cual se ve reflejado en las cantidades bajas producidas de este ácido.

Tabla 4.7 Composición final de los vinos obtenidos por los distintos tratamientos en combinación de levadura (N05, SR19) y BAL (VC32, FU39 y CH11).

FML	pH	A. acético	A. cítrico	YAN	ATT
NC	3.56 ± 0.02 nd	0.36 ± 0.03 nd	0.20 ± 0.03 nd	106.33 ± 3.05 nd	6.7 ± 0.30 nd
NV	3.54 ± 0.02 nd	0.38 ± 0.03 nd	0.21 ± 0.02 nd	106.33 ± 4.04 nd	6.4 ± 0.20 nd
NU	3.56 ± 0.01 nd	0.39 ± 0.02 nd	0.19 ± 0.02 nd	105.33 ± 4.16 nd	6.6 ± 0.31 nd
SC	3.60 ± 0.04 nd	0.38 ± 0.01 nd	0.21 ± 0.04 nd	106.33 ± 1.53 nd	6.6 ± 0.46 nd
SV	3.61 ± 0.03 nd	0.38 ± 0.02 nd	0.21 ± 0.02 nd	106.33 ± 4.04 nd	6.6 ± 0.21 nd
SU	3.58 ± 0.02 nd	0.38 ± 0.01 nd	0.20 ± 0.02 nd	106.66 ± 1.53 nd	6.9 ± 0.12 nd

nd – Diferencia estadística no detectada.

4.8.3 Perfil de compuestos volátiles

A la selección de cepas nativas, entre otros beneficios, se le ha conferido el de aportar características sensoriales distintivas respecto a los vinos producidos con cepas comerciales (Lambrechts & Pretorius, 2000; Suarez-Lepe & Morata, 2012). Se realizó un estudio cromatográfico con el fin de obtener un perfil de compuestos volátiles empleando microextracción en fase sólida del espacio libre de cabeza (HS-SPME) analizado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Este análisis se realizó en los vinos tras la FA y una vez ocurridos ambos procesos fermentativos.

Se identificó un total de 54 compuestos, considerando el índice de retención de Kovats (IK), valor de retención relativo a los de una serie homóloga de n-parafinas corridas bajo condiciones cromatográficas específicas y reportado en tablas (Kowalska *et al.*, 2003). Éste nos permitió confrontar la identificación dada a partir de la base de datos del espectro de masas con el orden de elución esperado en función del número de carbonos y su estructura. De los compuestos identificados, todos salvo el carbonato (53 en total), estuvieron presentes al final de ambos procesos fermentativos. La presencia de este compuesto, atípico en los vinos, se explica por la adición de Velcorin® o Dimetil dicarbonato (DMDC), el cual se añadió para esterilizar el vino una

vez ocurrida la FA. Este compuesto se hidroliza en el vino en cuestión de horas, dando lugar a la formación de metanol (~48 %) y algunos derivados carbonatados (Delfini *et al.*, 2002). Uno de estos derivados fue detectado por la técnica cromatográfica utilizada, no obstante debido a que fue un compuesto añadido para eliminar microorganismos y no producto del metabolismo de éstos, en los análisis subsecuentes no fue considerado.

El número elevado de datos obtenidos en esta determinación permite varios análisis estadísticos con los que a su vez podemos proponer múltiples enfoques. Lo primero que se planteó fue un par de análisis multivariados para observar la formación grupos con similitud en la composición de volátiles. En la Figura 4.17 se muestra un análisis de conglomerados jerárquico de dos vías con el método de Ward, éste fue obtenido a partir de la concentración en partes por billón (ppb) de los 53 compuestos volátiles cuantificados. Los tratamientos se muestran en el lado izquierdo del eje de las ordenadas y están codificados para indicar si provienen sólo de la FA con las cepas SR19 (FAS) o N05 (FAN) o si son los obtenidos tras la FML, que dan origen a efectos combinados de cada levadura con las BAL: FU39 (NU y SU), VC32 (NV y SV), o CH11 (NC y SC). Sobre el lado derecho del eje de las ordenadas se observan los grupos de los tratamientos formados por su similitud en perfil de compuestos volátiles y sobre el eje de las abscisas los grupos de compuestos que tuvieron un comportamiento similar en los tratamientos. El mapa de color nos señala los compuestos se encontraron en una mayor (rojo) o menor (azul) proporción.

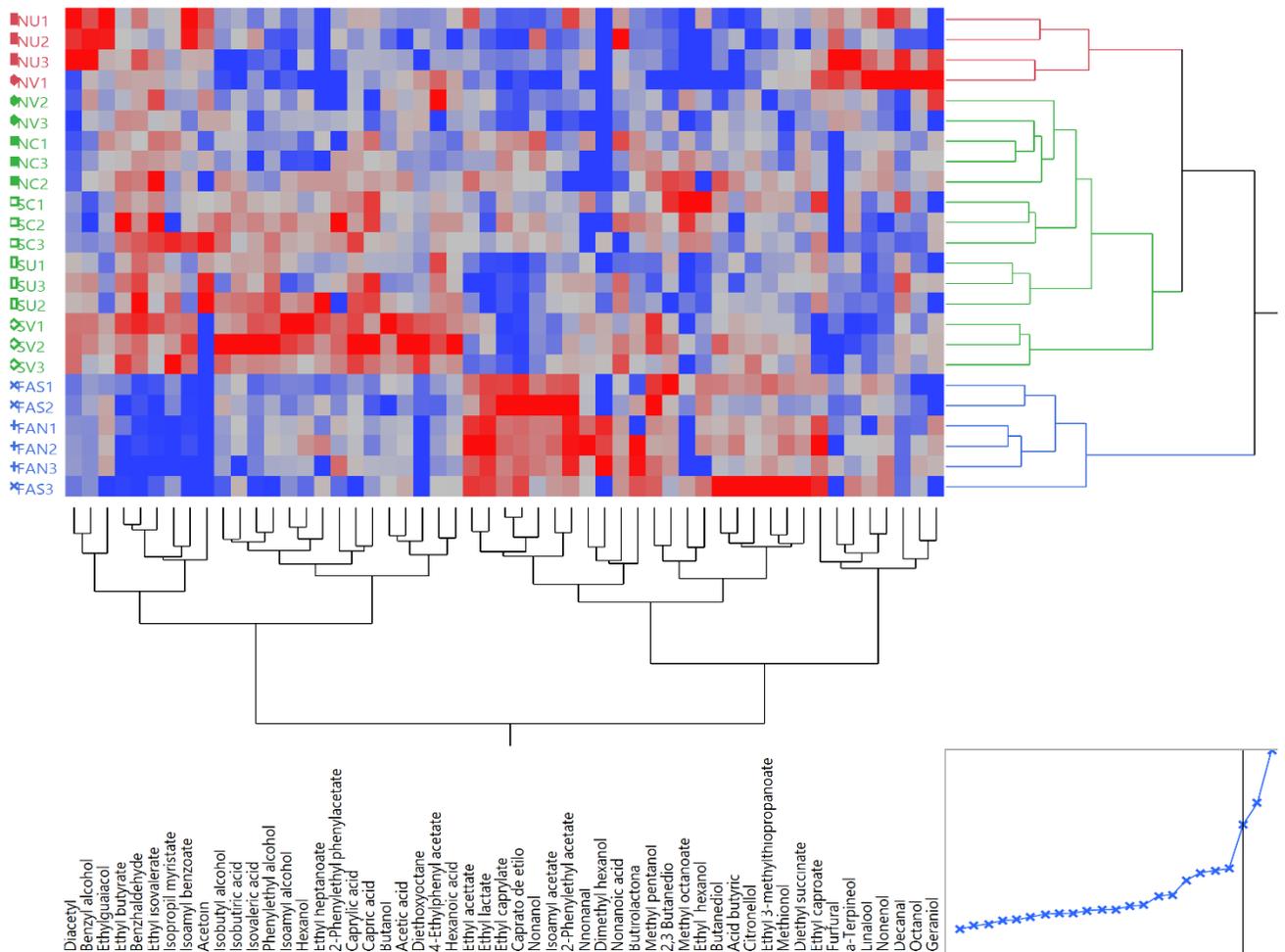


Figura 4.17 Gráfica de dos vías del conglomerado Jerárquico (método de Ward) obtenido a partir de los datos de concentración de 53 compuestos volátiles (ppb). Análisis realizados tras la FA con la levadura N05 y SR19 (FAN y FAS). Tras la FML con las BAL FU39 (NU y SU), VC32 (NV y SV) y CH11 (NC y SC) inoculadas en el vino procedente de cada levadura.

A partir del punto de origen del dendrograma (lado derecho) hay una primera separación de dos grupos, que se asocia a la etapa de fermentación en la que se realizó el análisis (FA y FML). Esta separación era esperada, ya que es ampliamente reportado el hecho de que, tanto en fermentaciones espontáneas como inoculadas existe una modificación positiva en el perfil de volátiles por acción de las BAL en la FML (Cañas *et al.*, 2007; Lerm *et al.*, 2010; Bartowsky & Borneman 2011; Taniassuri *et al.*, 2016; Ugliano & Moio, 2005). Se ha reportado que las BAL que actúan en la FML pueden producir

concentraciones significativas de ésteres tanto de acetato como de etilo, alcoholes superiores, ácidos grasos volátiles y compuestos azufrados (Hernández-Orte *et al.*, 2009; Bartowsky, 2011).

La siguiente separación que se observa en la Figura 4.17 está indicada por distintos colores y forma tres grupos, uno es el ya discutido formado por la acción sólo de las levaduras, los otros dos separa los tratamientos de la FML. El más grande (verde) agrupa 14 de los 18 tratamientos e incluye todos los tratamientos inoculados con cepas de la especie *O. oeni*, tanto nativa como comercial, independientemente de la levadura que condujo la FA. Por su parte los tratamientos inoculados con la cepa FU39 (*L. plantarum*) en el vino producido por la levadura SR19 se agrupan también en este conjunto mayoritario, pero cuando fue inoculada tras la acción de la levadura N05, esta combinación produjo un perfil de compuestos volátiles claramente distintivo del resto (señalados en color rojo). De forma sorprendente y un tanto inexplicable una de las repeticiones del tratamiento con la cepa nativa VC32 (*O. oeni*) actuando en el vino de N05 (NV) compartió una similitud elevada con el de los tratamientos donde actuó FU39 (*L. plantarum*). La separación que incluye a los tres tratamientos la podemos asociar a la particularidad de la especie de BAL distinta. Se dice que *L. plantarum* tiene un mayor número y más diverso tipo de enzimas que *O. oeni*, el cual puede llevar a la producción de una mayor cantidad de compuestos volátiles con impacto aromático en el vino (Lerm *et al.*, 2011; Swiegers *et al.*, 2005). No obstante, es de destacar la acción conjunta de los microorganismos, pues únicamente en combinación con la levadura N05, la cepa *L. plantarum* FU39 generó una composición de volátiles distinguible. Hasta este momento no hay trabajos que comparen el efecto en los perfiles de compuesto volátiles de distintas levaduras sobre distintas especies de BAL. Las interacciones levadura-BAL reportadas hasta ahora se han evaluado variando a nivel de cepas sólo de uno de los dos grupos de microorganismos (Pozo-Bayon *et al.* 2005; Ugliano & Moio, 2005) o combinaciones concretas, recientemente incluyendo el efecto de levaduras no-*Saccharomyces* (Lu *et al.*, 2016; Plessis *et al.*, 2017).

Con respecto a los compuestos que generan tales diferencias en los tratamientos, los conjuntos formados en el dendrograma del eje de las abscisas de la Figura 4.17 no tienen una asociación que pueda explicarse con la información con que

se cuenta ya que los grupos incluyen compuestos de distintos tipos. Lo que sí podemos ver en el mapa de color, son patrones asociados con las diferencias entre tratamientos. De esta forma observamos que el conjunto que agrupa las FA's tiene concentraciones elevadas de etil acetato, lactato, caprilato, y caprato, ésteres que aportan aromas que van de afrutado a solvente, asimismo, se observan abundantes compuestos como metionol y citronelol (colores rojos en la parte inferior derecha), con aromas descritos como a vómito y flores, respectivamente. Por el contrario, las FA's tienen concentraciones relativamente bajas de compuestos como hexanol, alcoholes en general (aromas típicos de destilados) y ácidos isobutílicos e isoamílicos, ácidos cáprico, caprílico y acético (muchos de éstos con aromas rancios y pungentes). De forma contrastante, estos compuestos son abundantes en las FML que formaron el grupo más grande, denotado en color verde (segmento de compuestos localizados a la izquierda color azul abajo y rojo al centro). Por su parte el grupo de las NU's es abundante en diacetilo, alcohol bencílico y etilguayacol que colorean de rojo la esquina superior izquierda del mapa, también son ricos en caproato de etilo, furfural, terpienol, geraniol y alcoholes de C₈ a C₁₀ señalados en color rojo en la esquinas superior derecha. Los descriptores aromáticos de algunos de éstos van de los florales-afrutados, como el alcohol bencílico, terpienol y geraniol, a amaderados-tostados, gama de olores que presentan el furfural y el etilguayacol, finalmente, el diacetilo es el principal compuesto asociado al aroma láctico o mantequilloso del vino donde ha ocurrido una FML.

Para reducir el número de variables y poder analizar las diferencias de los compuestos entre tratamientos, se agruparon de acuerdo a los cinco tipos de compuestos empleados como estándares teniendo de esta manera 21 alcoholes (40 %), 13 ésteres de etilo (25 %), ocho ácidos (15 %), seis ésteres de acetato (11 %) y cinco terpenos (9 %). A grandes rasgos tales proporciones serían las esperadas tras una típica fermentación alcohólica a temperatura ambiente, con la reserva de las múltiples variaciones que dan origen a una composición determinada de compuestos volátiles, entre ellas el cepaje de la vid, el manejo en el campo y en la fermentación (Robinson *et al.*, 2014). En la Tabla 4.8 se muestran el promedio y el análisis estadístico

realizado por tipo de compuesto volátil, agrupados de acuerdo a los estándares utilizados para el estudio cromatográfico.

Tabla 4.8 Promedio de la concentración total de los cinco tipos de compuestos volátiles determinados mediante HS-SPME con GC/MS en las microvinificaciones con las cepas nativas.

Tratamiento	Alcoholes	Esteres de etilo	Esteres de acetato	Ácidos	Terpenos
NU	11002.0±38529.4 cd	1228.3±1682.6 bc	250.8±236.4 bcd	368.9±411.5 cd	11.7±4.7 a
NV	10920.1±40503.3 cd	791.4±994.8 d	196.1±219.4 d	398.0±456.9 bcd	14.5±5.8 a
NC	11073.2±41705.2 cd	1329.7±1786.5 ab	271.0±265.0 bcd	450.4±533.0 bc	13.8±5.2 a
SU	12886.7±47285.3 ab	1031.2±1167.6 c	233.1±156.3 cd	487.5±570.1 ab	10.1±5.2 a
SV	13322.4±55562.1 a	1134.0±1508.1 bc	326.2±248.5 abc	592.3±648.8 a	13.3±6.2 a
SC	12246.5±48534.1 abc	1466.9±1741.1 a	344.4±262.1 ab	494.3±579.8 ab	12.6±6.2 a
FAS	10761.7±39834.1 bcd	1495.3±2589.2 a	313.3±261.8 abc	322.9±344.5 d	12.7±9.0 a
FAN	11737.7±43270.5 d	1344.5±2171.7 ab	381.4±284.3 a	415.5±482.1 bcd	14.5±6.7 a

Valores reportados como la media de tres tratamientos ± desviación estándar. Letras distintas denotan significancia estadística por la prueba de Tukey ($\alpha < 0.01$) entre tratamientos.

El primer grupo que se muestra en la Tabla 4.8 es el de los alcoholes superiores (más de dos carbonos). Con la prueba de Tukey y en conformidad con la eficiencia fermentativa previamente discutida, observamos que los tratamientos con una concentración mayor de alcoholes son los tratamientos que involucran a la levadura SR19 (en orden de abundancia SV, SU, SC y FAS). Si bien muchos de los alcoholes provienen del metabolismo de azúcares, se dice que las levaduras producen más de la mitad como parte del catabolismo de los aminoácidos (mediante la ruta de Ehrlich), por lo que la concentración de alcoholes se ve incrementada cuando se añade una fuente adicional de nitrógeno (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). De formas metabólicamente similares pero en menor nivel las BAL también pueden contribuir de manera significativa a las concentraciones de alcoholes presentes en el vino (Smid & Kleerebezem, 2014). De hecho en este estudio son ligeramente superiores las concentraciones de alcoholes tras la FML, lo cual pudiera estar vinculado a la adición de nutrientes (Actimax OENI®)

constituida de levaduras inactivas que proporcionan entre otros beneficios una fuente de aminoácidos, que pudo fungir como sustrato para la formación de más alcoholes, pero como parte del metabolismo de las BAL.

En niveles muy similares al de los alcoholes, el siguiente tipo de compuestos en la Tabla 4.8 son los ésteres de etilo y en menor proporción los de acetato. En conjunto los esterres son el tipo de compuestos más abundante en las bebidas fermentadas y unos de los más importantes debido a su aporte en carácter afrutado, tienen orígenes bióticos y abióticos. Si se originan por estererasas microbianas, se tienen los provenientes del metabolismo de los alcoholes y acetatos (acetato de etilo, de isoamilo, feniletilo, etc.) o del metabolismo de los ácidos grasos (etil butirato, caprato, carpilato, etc) (Lambrechts & Pretorius, 2000). Debido a la típica secuencia de procesos fermentativos, las levaduras son el principal proveedor de ésteres, pero las BAL tienen un impacto muy relevante ya que son capaces tanto de sintetizar como de hidrolizarlos (Swiegers *et al.*, 2005). En el análisis estadístico, tanto los esterres de etilo como los de acetato tienen una tendencia similar entre los tratamientos, siendo más abundantes antes de la FML. Posterior a ésta, la BAL comercial (CH11) es la que menos modifica su concentración siendo estadísticamente igual la concentración antes y después de su incorporación, cuando CH11 se inocula en el vino de N05 sólo se observa diferencia en los esterres de acetato. En contraste, la combinación N05 y VC32 disminuyó cerca del 50 % de la concentración de ésteres que había en la FA con la misma levadura.

Los ácidos grasos volátiles provienen del catabolismo de los lípidos, muchos de estos compuestos se consideran de impacto negativo en el vino ya que los descriptores aromáticos incluyen “rancio”, “queso”, “sudor” y “avinagrado”. Entre los factores que determinan la producción de estos compuestos está la velocidad fermentativa y un elevado estrés osmótico (azúcar) (Erasmus *et al.*, 2004). En los tratamientos, observamos que las FML derivadas de la levadura SR19 (SV, SU, SC) tienen los valores más altos, que contrasta con el hecho de que la concentración más baja fue la de la FA con esta misma levadura, con lo que podemos adjudicar a la actividad bacteriana el incremento de alrededor de 65 % en concentración de ácidos grasos volátiles tras la FML en los tratamientos SV, SU y SC. Tres de los tratamientos que incluyen a la levadura N05 (NC, NV, FAN) tuvieron valores intermedios y los valores

más bajos fueron los obtenidos con N05 en combinación con *L. plantarum* FU39 (NU) y la ya mencionada FA con SR19.

El último grupo de acuerdo al valor de sus concentraciones es el de los terpenos, su importancia radica justamente en su bajo umbral olfativo. Son de los principales responsables del denominado aroma varietal, se encuentran en la uva típicamente glucosilados (inodoros) y requieren de la acción enzimática microbiana para ser hidrolizados y así encontrarlos en el vino en su forma libre y aromáticamente activa (González-Barreiro *et al.*, 2015). En estos compuestos no se hizo evidente el efecto de ninguno de los tratamientos, la FA producida por N05 y la combinación de esta con la levadura comercial CH11 son los que tienen concentraciones ligeramente más altas.

El interés de estudiar los compuestos volátiles recae en el impacto aromático que éstos producen. Se sabe que la percepción de los aromas es un tema complejo, en donde dejando de lado los factores relacionados al individuo, se tienen efectos de interacción entre los compuestos y la matriz en que éstos se encuentran (Glodner *et al.*, 2011). Aun así, tratando de dilucidar lo complejo que puede resultar el estudio del aroma de un vino, en la actualidad se sabe también que no todas las moléculas presentes en un vino proporcionan olor, e incluso aquellas que lo tienen deben estar en concentraciones suficientemente altas para que sean perceptibles. A partir de esta premisa surge el concepto de valor de actividad olfativa (OAV por sus siglas en inglés), el cual se define como la relación entre la concentración de un compuesto y su umbral de detección. Generalmente se considera que valores de $OAV > 1$ tienen impacto sensorial, en proporción a lo mayor que sea este valor (Ferreira, 2010). De esta forma se determinaron los valores de OAV de los compuestos detectados, empleando umbrales de detección reportados, los compuestos que mostraron valores OAV mayores a 1 se presentan en la Figura 4.18 en un análisis de conglomerados jerárquico de dos vías, análogo al analizado con los valores de concentración.

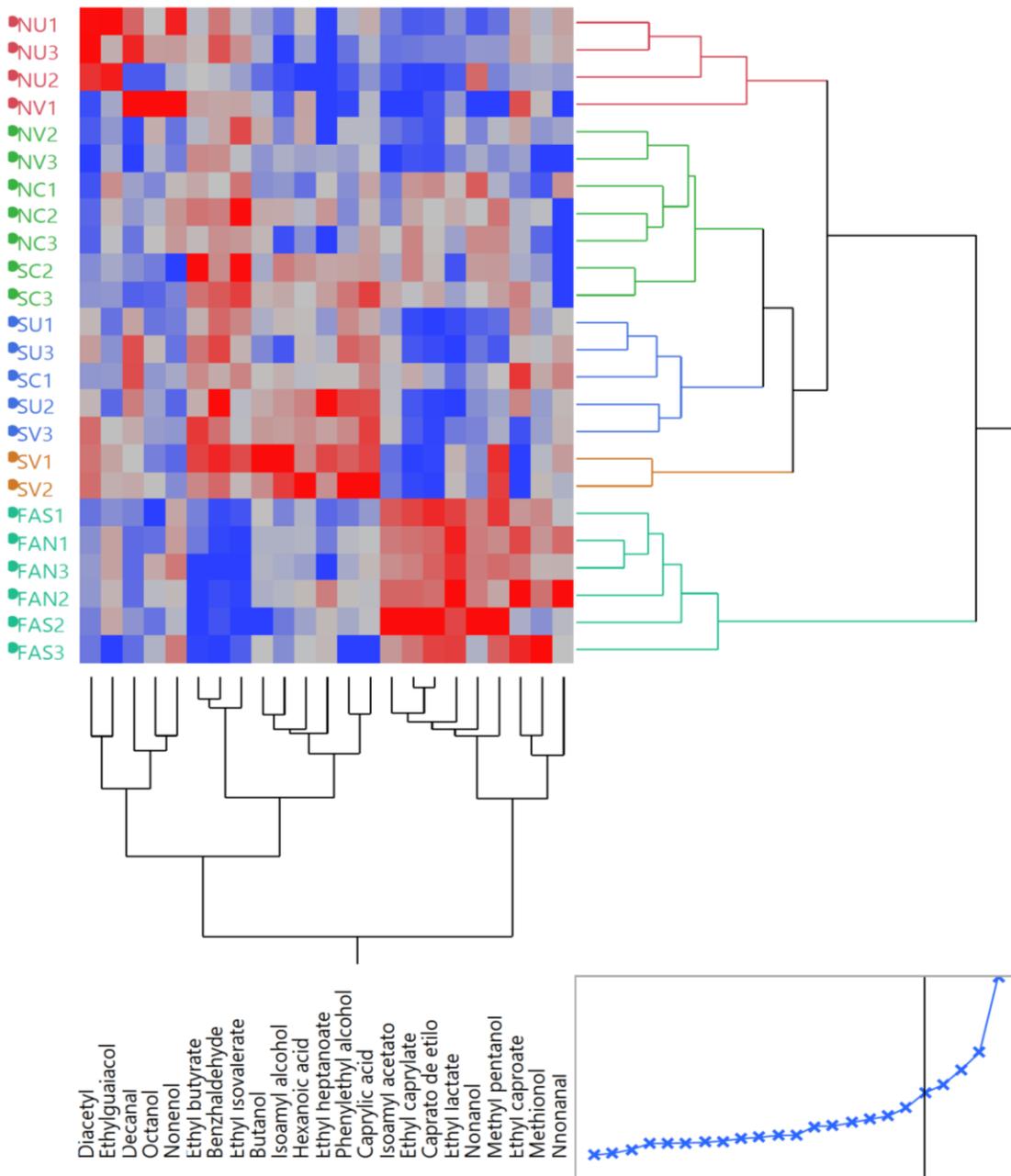


Figura 4.18 Conglomerado Jerárquico (método de Ward) en dos vías obtenido para los 24 tratamientos (repeticiones incluidas) con los valores de actividad olfativa (OAV) superiores a uno, calculados mediante relación de la concentración del compuesto respecto a su umbral de detección.

Se observó un agrupamiento similar al obtenido a partir de los datos de concentración. Considerando que el OAV se trata de una relación aritmética los valores

de cada compuesto fueron modificados todos proporcionalmente, sin embargo al tratarse de un análisis multivariado existía la posibilidad de que al disminuir el número de compuestos empleados para el análisis, la solución óptima del conglomerado fuera distinta. Al ser los conjuntos similares, resulta simplemente más evidente la separación de los tres grupos previamente discutidos, uno formado por las FA's, otro con las FML de la cepa nativa *L. plantarum* FU39, actuando en el medio producido por N05 (y una réplica de NV) y un grupo mayor que incluye el resto de los tratamientos con FML. En este caso indicamos con color otros de los conjuntos formados y cabe notar que pese a que se esperaba que se agruparan los triplicados de los tratamientos, suele haber uno de cada caso que tiene mayor similitud con algún otro conjunto. Tratándose de repeticiones de microorganismos, no sorprende tanto dicha variación, de hecho es una de las razones por las que ha resultado tan complejo asociar compuestos a una cepa o especie determinada. En un proceso de vinificación tradicional como el utilizado, existen innumerables factores, como cambios sutiles de temperatura, niveles de aireación, presencia de ciertos microorganismos, dosis de SO₂ empleada, momento de inoculación, entre otros, que pueden modificar concentraciones de compuestos que se encuentran en tan bajos niveles (ppb) (Saerens *et al.*, 2010).

Considerando que proporcionalmente sólo un pequeño número de compuestos (43 %) mostró un OAV superior a 1, también se hizo una prueba de medias de Tukey que se muestra en la Tabla 4.9. En ésta se ordenaron los compuestos de mayor a menor valor de OAV, se incluyó una columna con los principales descriptores para cada compuesto y se emplearon cinco colores para distinguir el tipo de compuesto del que se trata. En color verde están los ésteres, el más intenso denota los ésteres de etilo y el bajo a los de acetato; en color gris están los alcoholes superiores y en anaranjado los ácidos carboxílicos. Ninguno de los terpenos detectados mediante cromatografía alcanzó valores de OAV superiores a 1. Observamos que la mayoría de los compuestos de la Tabla 4.8 son ésteres de etilo y alcoholes superiores sumando un 86 % del total de los 23 compuestos reportados, del resto, 9 % son ácidos carboxílicos y 5 % son ésteres de acetato. Los compuestos con los mayores valores (OAV>10) son los ésteres de etilo y los alcoholes de 9 y 10 carbonos, con la mayoría de sus descriptores definidos como afrutados.

Tabla 4.9 Valores de actividad aromática (OAV) de los 23 compuestos con OAV>1.

Compuesto	Ethyl caprylate	Nonanal	Decanal	Ethyl caproate	Ethyl isovalerate	Ethyl heptanoate	Ethyl butyrate	Ethylguaiacol
Descriptor	Afrutado	Verde, pungente	Citrico	Afrutado. Piña	Afrutado. Manzana	Afrutado. Banana	Afrutado. Piña	Especiado
NU	2878±126 c	1150±427 ab	918.8±469 nd*	148±37 a	188±50 b	0.22±0.05 nd	48.9±3.5 a	34.13±11.6 a
NV	228±76 c	241±418 b	678.2±586 nd	162±57 a	234±57 a	36.1±20 nd	55.3±10.6 a	12.34±1.6 b
NC	1288±152 c	551±950 ab	530.8±66 nd	106±33 ab	278±52 a	75.8±71 nd	58.9±9.2 a	20.72±4.6 ab
SU	234±31 c	1207±208 a	994±159 nd	174±17 a	214±35 a	134.4±127 nd	5.5±8.1 a	6.70±2.7 b
SV	209±67 c	1189±339 ab	766±66 nd	5.6±9.7 b	228±5 a	169.4±53 nd	74.8±9 a	20.04±2.8 ab
SC	1122.8±310 b	602±1043 ab	698±404 nd	178±57 a	297±42 a	114.4±21 nd	73.9±13 a	11.60±1.5 b
FA-SR19	1919±352 a	957±4 ab	488±52 nd	177±59 a	59±15 b	71.4±43 nd	10.6±11 b	10.53±11.1 b
FA-N05	1581±106 ab	2095±858 a	430±2 nd	220±27 a	44±2 b	67.9±90 nd	9.5±10 b	21.73±1.8 ab

Compuesto	Phenylethyl alcohol	Isoamyl acetate	Ethyl caproate	Methionol	Isoamyl alcohol	Benzaldehyde	Caprylic acid	Nonanol
Descriptor	Floral	Afrutado. Pera	"Tipo-brandy"	Coliflor	Fusel, banana	Almendras	Graso, queso	Floral, citrico
NU	9.80±0.6 cd	2.45±0.6 c	1.54±0.8 d	6.05±0.2 nd	4.05±0.2 b	4.52±0.9 a	2.50±0.7 ab	1.67±0.4 nd
NV	9.94±0.7 cd	1.31±1.3 c	1.14±0.1 d	5.49±1.2 nd	4.42±0.3 b	4.38±0.2 a	2.79±0.2 ab	1.44±0.2 nd
NC	10.02±0.2 cd	4.29±1.8 c	5.59±1.7 c	5.23±0.9 nd	4.63±0.7 b	4.4±0.5 a	3.23±0.2 ab	1.99±0.2 nd
SU	11.91±0.4 ab	6.05±1.3 c	0.83±0.1 d	5.88±0.3 nd	4.98±0.8 b	5.44±0.4 a	3.54±0.3 a	1.42±0.1 nd
SV	12.14±0.7 a	4.1±2.6 c	0.82±0.1 d	6.18±0.5 nd	6.70±0.9 a	5.21±0.4 a	3.97±0.2 a	1.49±0.1 nd
SC	11.22±0.5 abc	6.71±1.9 bc	4.91±1.2 c	6.29±0.8 nd	5.61±0.5 ab	4.68±0.5 a	3.57±0.3 a	1.76±0.2 nd
FA-SR19	9.71±0.6 d	14.76±4.6 a	11.71±1.1 a	9.03±2.6 nd	4.38±0.1 b	1.21±0.1 b	1.60±1.5 b	2.07±0.4 nd
FA-N05	10.53±0.2 bcd	12.53±1.4 ab	9.14±0.3 b	7.69±0.9 nd	4.78±0.1 b	1.14±0.1 b	2.98±0.1 ab	2.08±0.1 nd

Compuesto	Methyl pentanol	Butanol	Ethyl lactate	Octanol	Hexanoic acid	Nonenol	Diacetyl
Descriptor	Fusel	Fusel, banana	Cre moso	Verde, citrico	Animal, rancio	Graso, viejo	Mantequilla
NU	1.04±0.2 bc	0.97±0.3 b	1.02±0.1 bc	1.41±0.6 nd	0.85±0.1 b	0.0±0.0 nd	2.14±0.1 a
NV	1.04±0.5 bc	1.4±0.5 ab	0.24±0.2 bc	2.33±1.5 nd	0.98±0.1 ab	1.6±1.0 nd	0.14±0.1 e
NC	1.8±0.3 abc	1.51±0.5 ab	1.45±0.2 b	1.22±0.2 nd	0.86±0.1 b	1.76±0.2 nd	0.22±0.1 e
SU	0.95±0.3 c	1.34±0.5 ab	0.77±0.1 c	1.21±0.3 nd	1.01±0.1 ab	0.94±0.1 nd	1.01±0.1 c
SV	2.01±0.5 a	2.86±0.9 a	1.36±0.3 b	1.18±0.2 nd	1.14±0.1 a	1.04±0.1 nd	1.56±0.1 b
SC	1.76±0.1 abc	1.51±0.3 ab	1.00±0.1 bc	1.00±0.1 nd	0.99±0.1 ab	1.00±0.3 nd	0.50±0.1 d
FA-SR19	2.31±0.2 a	1.07±0.8 b	2.25±0.2 a	0.98±0.3 nd	0.92±0.1 ab	1.73±0.3 nd	0.35±0.1 de
FA-N05	1.93±0.2 ab	1.29±0.1 ab	2.42±0.1 a	1.35±0.4 nd	0.93±0.1 ab	1.82±0.3 nd	0.52±0.1 d

Valores representados como la media ± desviación estándar de tres repeticiones para cada tratamiento. La letra a un costado indica diferencia estadística significativa con la prueba de media de Tukey ($\alpha < 0.001$).

*nd – Diferencia estadística no detectada.

Un último examen realizado a partir de los OAV's es el que aparece en la Figura 4.19, donde se presenta un análisis de componentes principales (ACP). En el gráfico de la sección derecha se muestran los 23 compuestos empleados para realizar el análisis y en la sección izquierda los tratamientos, denotados en los mismos colores que se obtuvieron con el primer análisis de conglomerados a partir de la concentración en ppb, las FA's se encuentran en color azul en el primer cuadrante. Los productos de las FML obtenidas a partir de la FA con la cepa SR19 están ubicadas en el segundo cuadrante con los símbolos "huecos". Y entre el tercer y cuarto cuadrante con los símbolos "sólidos" las FML's realizadas tras la levadura N05. El modelo explica 57.6 % de la variación de los datos, el cual, si bien no es un porcentaje elevado la representación es consistente y el bajo porcentaje se debe en parte al número elevado de variables explicativas (23 compuestos) que deben correlacionarse.

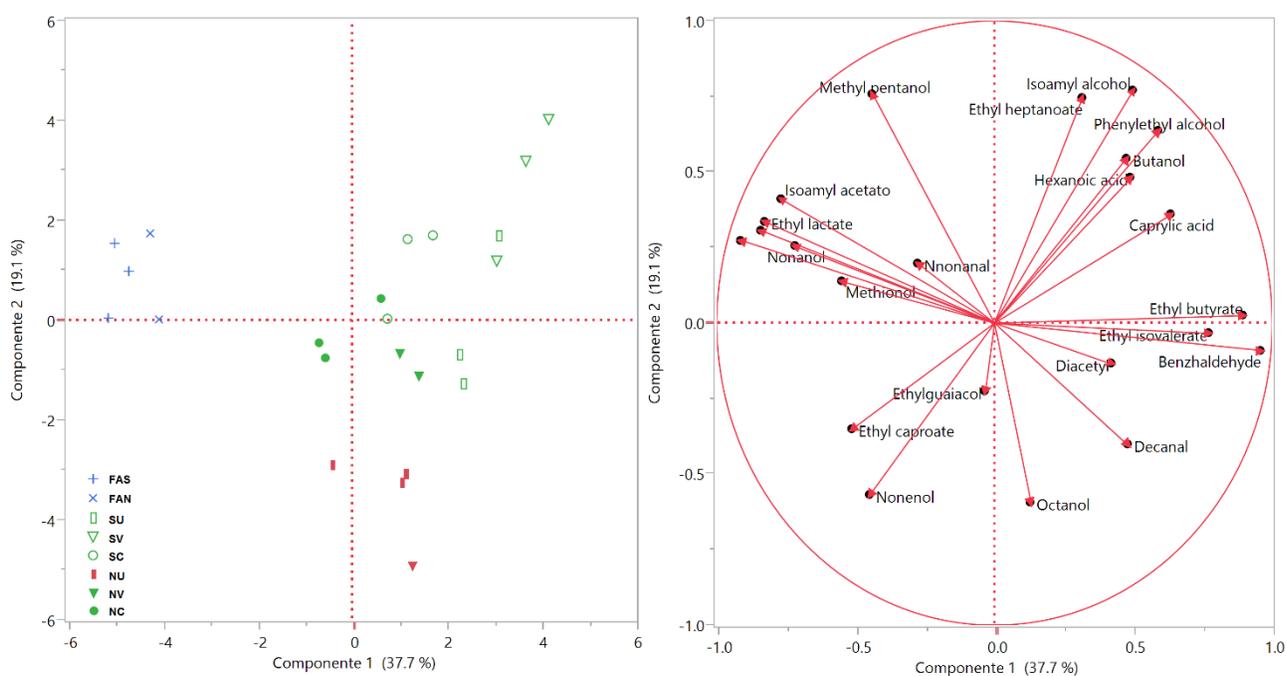


Figura 4.19 Análisis de componentes principales de 23 compuestos cuyos valores de actividad aromática (OAV's) fueron superiores a 1. El gráfico izquierdo muestra la distribución de los tratamientos

Por su localización en los cuadrantes y los vectores formados por los compuestos observamos que las FA's se caracterizan por ser abundantes en los ésteres acetato y varios alcoholes superiores como el metil pentanol, nonenol y nonanal (considerado entre los alcoholes), los cuales tienen descriptores aromáticos de tipo solventes y pungentes. En sentido opuesto, las FML's se ubican hacia la derecha, donde se incrementan ésteres de etilo como el butirato, isovalerato, el diacetilo y el benzaldehído (considerado entre los alcoholes) que evocaría notas más frutales, al menos comparadas con las de las FA's. Las FML's que derivaron de SR19 se ubican hacia donde se incrementan las OAV's de los alcoholes de feniletilo, isoamílico y butanoico, así como los dos ácidos orgánicos, lo que haría suponer que pueden llegar a tener un perfil aromático un tanto desagradable. Finalmente el grupo de FML inoculadas con FU39, tras N05 (NU) se encuentran hacia la parte inferior del gráfico, hacia donde aumentan alcoholes superiores (C8 y C10), el etil guayacol y etil caproato, que tienen descriptores afrutados, cítricos e incluso especiado en el caso del etil guayacol.

Para tratar de elucidar si podían confirmarse a nivel olfativo las suposiciones hechas a partir de los datos cuantitativos, se realizó una evaluación sensorial informativa, semejante a una prueba de tipo triangular. A un total de 10 personas no entrenadas, consumidoras de vino tinto se les dio a oler tres muestras de los vinos obtenidos (dos iguales y una distinta) y se les pidió tratar de diferenciar la muestra que era diferente. Primero buscamos ver si el aroma de las FA's se percibía distinto al de alguna que hubiera pasado por FML. En ese caso los jueces no podían diferenciar correctamente las muestras, excepto cuando se comparaban con los tratamientos NU. Posteriormente, entre las muestras obtenidas tras la FML escogimos las más contrastantes (SV contra NU) y nuevamente pedimos a los jueces determinar la muestra diferente. En esos casos los jueces sí fueron capaces de detectar la muestra distinta (90 % de los casos). Al pedirles que trataran de describir los aromas señalaban que en los tratamientos de NU se percibía el típico aroma de la FML, que recuerda a lácteos, siendo leche y mantequilla algunos de los descriptores. Esta descripción aromática correlaciona con el hecho de que son los tratamientos NU's los que forman conjuntos bien distinguidos en los análisis multivariados y también concuerda con el

hecho de que el diacetilo (principal compuesto con el descriptor “mantequilla”) es estadísticamente superior en estos tratamientos, comparados con el resto. El diacetilo es un compuesto que en cantidades adecuadas armoniza y da una complejidad deseada al vino, pero el exceso otorga un aroma muy dominante y es considerado un defecto (Bartowsky, 2005). La muestra SV por su parte se describió con aroma más pungente y “alcoholosa”, descriptores que se pueden asociar a una mayor concentración de alcoholes superiores presentes.

Con los análisis anteriores denotamos que el vino más distintivo, y por lo tanto el que podría aportar más en sentido de tipicidad, fue el elaborado con la cepa de *Sacchaormyces* N05 y la BAL *L. plantarum* (FU39), siendo el repunte de esta cepa hasta cierto punto inesperado. Es solo en los últimos años que *L. plantarum* ha despertado gran interés como cultivo iniciador para la FML, debido entre otros beneficios, a su buena adaptación a mostos de pH relativamente elevado (>3.5), la elevada tolerancia al etanol de algunas cepas y un conjunto enzimático más complejo que el de *O. oeni*. Por tratarse de una bacteria homofermentativa, supondría una menor producción de ácido acético y acetato de etilo en el vino y por último ha destacado por ser una excelente candidata para un sistema de coinoculación con *S. cerevisiae*, que de ser optimizada, esta estrategia puede disminuir de manera considerable los tiempos totales de vinificación (Berbegal *et al.*, 2016; Iorizzo *et al.*, 2016; Rossouw *et al.*, 2012).

4.9. Expresión genética de *S. cerevisiae* SR19 en dos sistemas de inoculación

4.9.1. Expresión relativa de genes

Debido al comportamiento destacado de la cepa *L. plantarum* FU39 y a la posibilidad de utilizarse en sistemas de coinoculación, decidimos evaluar esta alternativa comparándola con el esquema tradicional de inoculación secuencial, comparando además su desempeño con el de cepas de *O. oeni*, la nativa VC32 y una comercial (Lactoenos 459®). Un aspecto que no ha sido reportado hasta el momento para ensayos de interacción levadura-BAL enológicas, es la modificación que puede ejercer la presencia de la BAL en la expresión genética de la levadura y viceversa.

Como se ha discutido previamente, los efectos de interacción son muy diversos y por lo tanto lo son también los mecanismos moleculares que intervienen. Durante la elaboración de un vino, un interés prioritario es que no se vean perjudicados los microorganismos que efectúan los procesos fermentativos. Por lo tanto, fuera del interés básico de conocer una vía específica de mecanismos de interacción, nuestro interés radicaba en determinar si la expresión de aquellos genes asociados a una mejor adaptación a condiciones de vinificación, eficiencia fermentativa y producción de aromas, se veía modificada por el sistema de inoculación seguido, así como por el tipo de BAL empleada.

En la Figura 4.20 se muestra la tasa de expresión genética relativa de cinco genes (cada gráfica) de la cepa *S. cerevisiae* SR19, asociados a aspectos de interés enológico: adaptación a estrés (HSP12, CTT1 y MSN4), eficiencia fermentativa (ADH1) y producción de compuestos aromáticos (BAT2). Los cuales fueron evaluados en dos esquemas de inoculación: secuencial o conjunta, con tres cepas de BA, una *L. plantarum* (FU39; SF) y dos *O. oeni* (VC32; SV y 450®; SO), considerando como condición control la levadura en cultivo YPD.

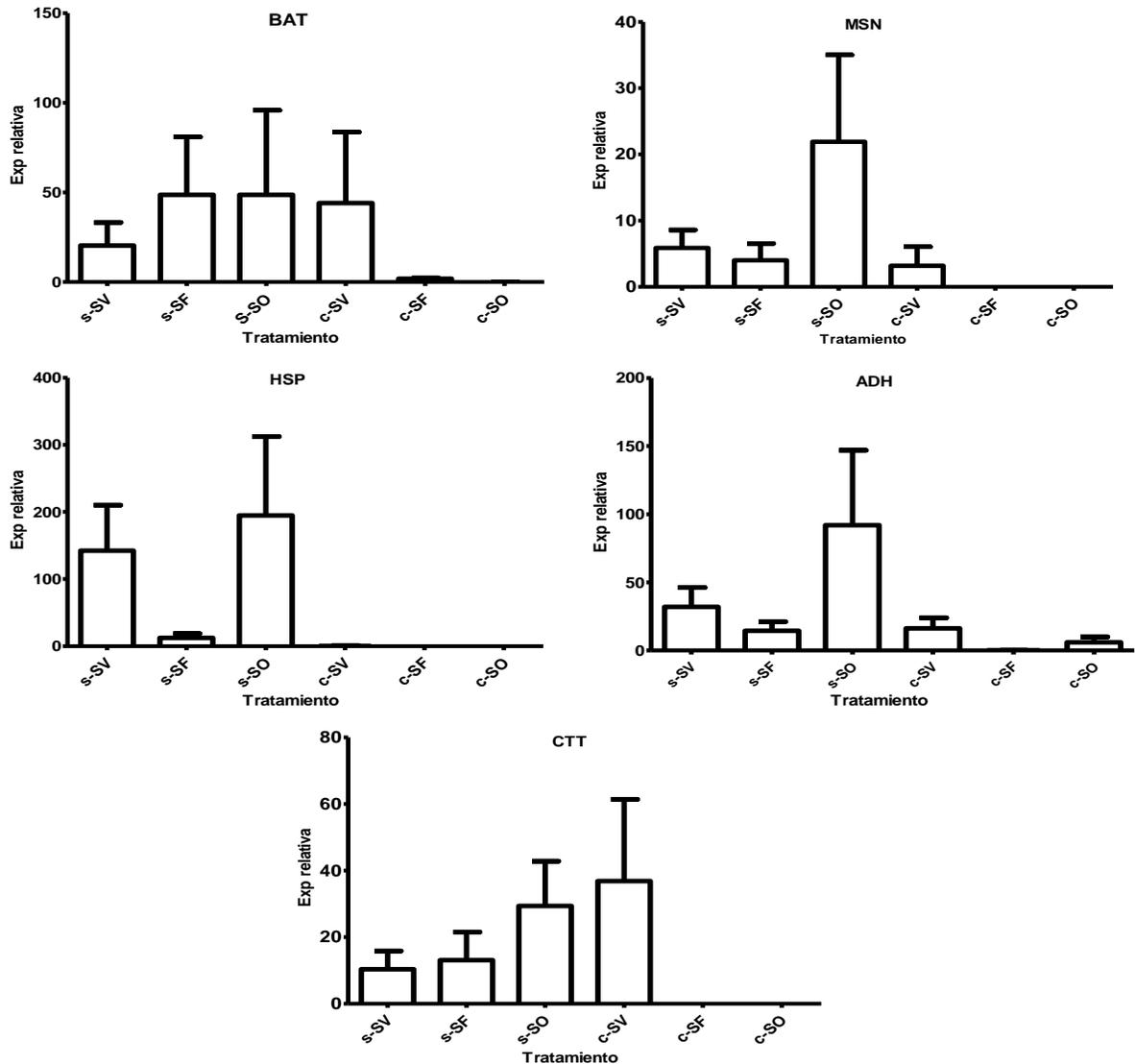


Figura 4.20. Expresión genética relativa de los genes BAT2, MSN4 HSP12, ADH1 y CTT1 (cada gráfica) en *S. cerevisiae* SR19, determinada mediante $R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$. Las condiciones tratamiento (eje x) incluyen inoculación secuencial o coinoculación (s- o c-) con las BAL VC32 (SV), FU29 (SF) o Lactoenos 450® (SO), respectivamente.

En la Figura 4.20 se observa en primer lugar que los genes que tienen niveles de sobreexpresión más altos son HSP12 ADH1 y BAT1, en algunos casos teniendo una sobreexpresión que llega a superar más de 100 veces respecto a la condición control. El gen HSP12 codifica una de las llamadas proteínas de choque térmico, su sobreexpresión frecuentemente se ha asociado con una mejor tolerancia al etanol, eficiencia

fermentativa e incluso percepción de dulzura en el vino (Marchal *et al.*, 2015). Esta proteína actúa a nivel de la membrana, protegiendo su integridad contra la desecación que ocasiona el etanol, es dependiente de la temperatura, el grado alcohólico y la cepa (Ding *et al.*, 2009; Stanley *et al.*, 2010). El gen ADH1, codifica a la alcohol deshidrogenasa, ésta junto con ADH2, son las responsables de la conversión del acetaldehído en etanol y viceversa, siendo etanol el producto de ADH1 y el sustrato de ADH2, una expresión elevada supondría un activo metabolismo de azúcares y resultando en etanol (Deesutha *et al.*, 2016). Por su parte la sobreexpresión de la aminotransferasa BAT1, se vincula al metabolismo de los aminoácidos ramificados como la leucina, isoleucina y valina, mediante la vía de Ehrlich, que termina con la formación de distintos alcoholes superiores (dependiendo del aminoácido original), activos aromáticamente. Esta vía anabólica es utilizada para formar otros compuestos nitrogenados en condiciones limitadas de nitrógeno, como las que suelen ocurrir en una fermentación, principalmente hacia el término de ésta (Styger *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2016)

Por otro lado se observa que en la mayoría de los tratamientos en coinoculación la expresión de los genes estudiados fue muy similar a la del gen regulador, resultando en expresiones relativas muy cercanas a cero, a excepción del tratamiento con la nativa *O. oeni* VC32 (c-SV). Este tratamiento tuvo sobreexpresiones en los genes BAT1 y CTT1, en este último gen de hecho fue el tratamiento con los niveles más altos. Este gen, que codifica a la catalasa citosólica T, está implicado en la defensa primaria inducida por el peróxido de hidrógeno, es decir condiciones hiperoxidantes, también se sobreexpresa en otras condiciones de estrés como el osmótico y el producido por inanición, condiciones encontradas en una fermentación (Vázquez *et al.*, 2017).

En este punto vale recordar que para cuantificar la expresión genética relativa se emplearon dos ecuaciones, la previamente discutida es generalmente utilizada en la técnica $\Delta\Delta C_t$ ($R = 2^{-\Delta\Delta C_t}$). A pesar de ser una de las más utilizadas, esta ecuación se basa en la suposición de que todas las eficiencias de reacción son iguales (o muy cercanas) a 2, situación muy poco común en la práctica y que particularmente no se alcanzó en este ensayo, ya que las eficiencias de amplificación iban de valores de 1.3

a 1.6. Una alternativa, donde se consideran las eficiencias de amplificación reales de cada gen en cada tratamiento es la siguiente $R = \frac{(E_{\text{gen estudiado}})^{\Delta Ct_{\text{gen estudiado}}(\text{control-experimental})}}{(E_{\text{gen referencia}})^{\Delta Ct_{\text{gen referencia}}(\text{control-experimental})}}$ (Kozera & Rapacz, 2013). Al determinar la expresión relativa mediante esta ecuación, se obtuvieron para todos los genes en todas las condiciones valores menores a 2, lo cual indicaría que no hay ni sobreexpresión ni represión de ninguno de los genes estudiados, aspecto por demás inesperado. Por tal hecho, los resultados previamente reportados deben tomarse con reserva.

El experimento fue diseñado para medir la expresión en las condiciones más cercanas a un proceso real, realizando una vinificación en tinto. Este enfoque ha sido muy pocas veces utilizado para estudios de expresión genética, de hecho sólo en el estudio reportado por Bordas *et al.* (2015) emplean vino para medir la expresión genética de *O. oeni*. El manejar esta matriz en el presente estudio tuvo varias complicaciones, entre ellas, elevadas cantidades de posibles inhibidores de la PCR (polifenoles, azúcares, ácidos, etc.) y la extracción de material genético de diversas fuentes no específicas (microorganismos nativos, tejido vegetal) con lo que la cuantificación de ARN y posterior ADN era imprecisa respecto al microorganismo de nuestro interés. Esto a su vez complicó la estandarización de la PCR respecto a la concentración de ADN a utilizar, habiendo que optimizar por medio de ensayos de prueba y error la dilución más óptima para cada muestra e incluso a veces para cada gen. Sin embargo, aún restaron por evaluar algunas estrategias de optimización, entre ellas temperatura de alineamiento, ésta deberá probarse para alcanzar una eficiencia adecuada, para a su vez obtener resultados más confiables y poder llegar a una conclusión efectivamente sustentada experimentalmente.

4.9.2. Comportamiento de poblaciones de levaduras y BAL seleccionadas en inoculación secuencial y coinoculación.

La cinética de las poblaciones de la levadura SR19 y las tres BAL evaluadas, en inoculación secuencial y coinoculación, se muestran en la Figura 4.21. Por parte de la levadura SR19 se observa un comportamiento muy homogéneo al interior de cada tratamiento, incluso en coinoculación independientemente de la BAL empleada, pero

una sutil diferencia al comparar las dos metodologías de inoculación. En la secuencial, donde actuó sola la levadura en el mosto, vemos un crecimiento paulatino a lo largo de los días, hasta alcanzar su máximo de población hacia el día tres, que coincide con la máxima pérdida de peso (Calderirão *et al.*, 2016). Por su parte en coinoculación, se observó un aumento desde los 6 Log UFC/mL inoculados hasta superar los 8 Log UFC/mL en el primer día, seguido de una disminución de aproximadamente un logaritmo en la población de levaduras para el día 3, manteniéndose las poblaciones en aproximadamente 7.5 logaritmos. Las diferencias en las cinéticas de crecimiento de SR19 en cada forma de inoculación, pudieran relacionarse a la presencia de las BAL desde el inicio, que de alguna pudieron haber inducido un crecimiento acelerado en la levadura (Sieuwerds *et al.*, 2018).

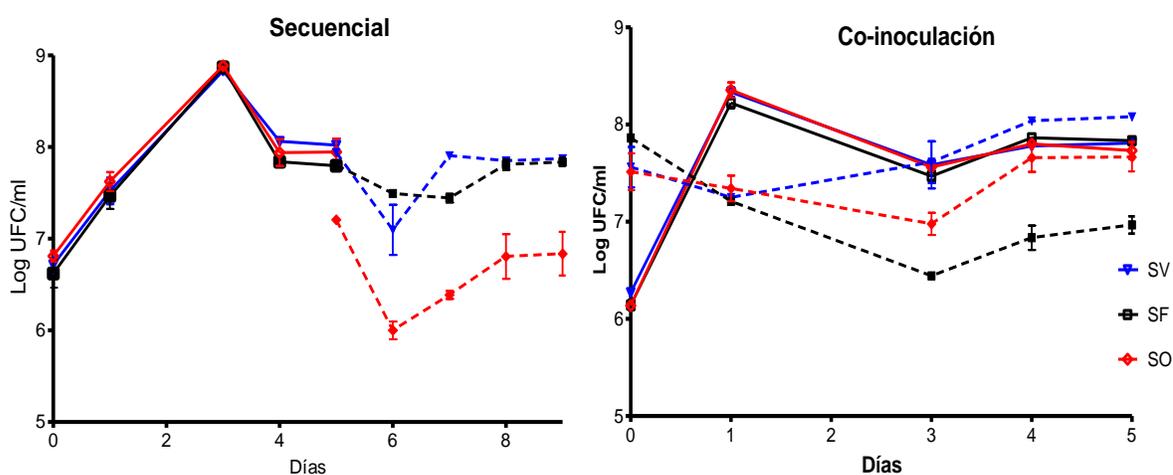


Figura 4.21 Cinética de desarrollo de la levadura SR19 (líneas continuas) y las BAL (líneas discontinuas) FU39 (negro), VC32 (azúl) y Lactoenos 450® (rojo) en microvinificaciones inoculadas de forma secuencial (izquierda) y co-inoculación (derecha). Datos graficados como la media \pm error estándar de tres repeticiones.

El comportamiento de las BAL no fue tan homogéneo como el de la levadura, como era de esperarse, ya que se trata de distintas especies y cepas. En la inoculación secuencial, realizada una vez concluida la FA, vemos tres tipos de comportamientos, asociados a la BAL empleada. Con un una población inicial que resultó un poco más

baja que el resto tuvimos a la BAL comercial 450[®] (SO). Aunque ambas nativas iniciaron con la misma concentración (alrededor de 8 Log UFC/mL), observamos que VC32 (SV) muestra un comportamiento similar a la comercial, siendo ambas de la especie *O. oeni*. Éstas en el primer día posterior a su inoculación disminuyen sus poblaciones en un logaritmo y entre los días 2 y 3 (7 y 8 en el gráfico secuencial) nuevamente aumentan, alcanzando su plató entre los días 3 y 4 (8 y 9 en secuencial). Por su parte FU39 de la especie *L. plantarum* (SF) mantuvo prácticamente la misma población a lo largo del estudio. La tendencia inicial de las BAL a disminuir sus poblaciones es algo que suele observarse en inoculaciones secuenciales, pues como ya se ha mencionado anteriormente el medio vino resulta altamente estresante, debido en gran medida al contenido de alcohol producido por las levaduras, así como de otros metabolitos que pueden inhibir a las BAL. Pasado cierto tiempo, que dependiendo de las cepas pueden ser algunos días (incluso semanas o meses a nivel bodega), una vez que éstas han activado sus mecanismos de adaptación al estrés y sumado al que las levaduras han comenzado a autolizarse y liberar nutrientes, es entonces cuando las BAL pueden aumentar ligeramente sus poblaciones y tienen un metabolismo activo, realizando la FML y liberando metabolitos secundarios que darán complejidad al vino (Barata *et al.*, 2012; Bartowsky *et al.*, 2011).

En las coinoculaciones, las cinéticas de crecimiento de las BAL fueron más homogéneas. En este caso los comportamientos más similares fueron entre *L. plantarum* (SF) y la comercial 450[®] (SO) las cuales disminuyeron su población alrededor de un logaritmo durante los primeros tres días, recuperándolo nuevamente para el día 4 y manteniéndose sin cambios durante el resto del proceso. En los procesos que incluyeron a estas dos BAL, la cinética de la levadura SR19 se observa prácticamente opuesta y ayuda a explicar lo observado, pues al haberse inoculado ambas al mismo tiempo (levadura y BAL) en concentraciones elevadas, estarían compitiendo por los nutrientes del medio. De hecho, lo observado en este trabajo es similar a la cinética de un proceso de fermentación espontáneo, donde las levaduras dominan rápidamente el medio, fermentan y, es hasta después de la acción de las levaduras, que las BAL pueden aumentar poblaciones y realizar los procesos metabólicos deseados, alcanzando para ello entre 7 y máximo 9 Log UFC/mL.

Por su parte la nativa *O. oeni* VC32 (SV), solamente disminuye su población medio logaritmo el primer día y rápidamente aumentan alcanzando su máximo entre el día 3 y 4. Al respecto, en los ensayos de interacción (Sección 4.5.6), observamos que justo VC32 mostraba un desarrollo muy superior en combinación con SR19, corroborándose dicho comportamiento en estos ensayos cuando actúan en co-inoculación. Restaría profundizar en algunos metabolitos concretos que pudieran estar asociados para determinar los modos y mecanismos en que interactúan favorablemente estas dos cepas.

V. CONCLUSIONES

Poblaciones y caracterización enológica de BAL

- Cinco especies de BAL (*O. oeni*, *P. parvulus*, *L. plantarum*, *L. brevis* y *L. hilgardii*) fueron detectadas en las vinícolas estudiadas y con las técnicas empleadas. Su detección mediante la técnica independiente de cultivo resultó poco efectiva en muestras con concentraciones bajas de BAL.
- La detección de algunas especies depende de la metodología utilizada, siendo *L. brevis* detectada solo por cultivo e identificación de aislados, mientras que para *O. oeni* fue mejor por la técnica independiente de cultivo.
- Sólo 14 % de los aislados de BAL fue capaz de desarrollar en presencia de 10 % de etanol, 30 mg/L de SO₂ y bajo pH, siendo las especies deterioradoras las más sensibles y las de *O. oeni* las más tolerantes.
- El medio empleado para determinar la tolerancia a condiciones de vinificación tiene efecto diferente entre especies de BAL. *O. oeni* prefiere medios tipo vino enriquecido, mientras que *L. plantarum* medios sintéticos como MRS modificado.
- Dos cepas de BAL nativas tuvieron un comportamiento destacado en todas las pruebas realizadas: FU39 (*L. plantarum*) y VC32 (*O. oeni*).

Caracterización enológica de levaduras Saccharomyces

- Los análisis multivariados empleados para la caracterización de las levaduras permitieron determinar correlaciones entre tiempos de duplicación e incremento de densidad óptica así como patrones comunes de levaduras destacables.
- La capacidad de floculación en las cepas evaluadas se vio inversamente correlacionada con la capacidad de tolerar condiciones inhibitorias (Nitrogeno/azúcar y etanol).

- De las cepas *Saccharomyces* spp. evaluadas, tres (SR19, SR26 y N5) destacaron. Siendo tolerantes a estrés osmótico, etanol con SO₂ y bajo pH, medianamente floculantes, con efecto *killer*, pero productoras de ácido acético y sulfhídrico.
- Las levaduras evaluadas en general estimulan el desarrollo de las BAL nativas, en contra de lo esperado. Siendo las levaduras más estimulantes SR19, SR25 y N42 y las BAL nativas que más desarrollaban FU39 y VC32.

Eficiencia fermentativa y calidad de los vinos

- Las levaduras seleccionadas producen vinos dentro de los estándares de buena calidad, siendo ligeramente más rápida en su arranque la cepa SR19 que N05.
- Las cepas de BAL nativas tienen un potencial importante para vinos de la región. En vinos con graduación alcohólica superior a 12.5 % requerirían preadaptación.
- Las cepas seleccionadas varían en la velocidad de degradación de málico, siendo FU39 (*L. plantarum*) más rápida que VC32 (*O. oeni*).

Perfil de compuestos volátiles

- Se identificaron 53 compuestos volátiles en los vinos consistentes de alcoholes superiores, ácidos grasos volátiles, ésteres de acetato, ésteres de etilo y terpenos.
- El análisis mediante conglomerados jerárquicos, tanto en términos de concentraciones (ppb) como en valor de actividad olfativa (OAV) permitió distinguir los tratamientos donde solo ocurrió la FA de aquellos donde había ocurrido también la FML así como los tratamientos de la combinación N05 *L. plantarum* FU39 NU del resto de FML's.

Expresión de genes

- Los genes HSP12 (estrés) ADH1 (eficiencia fermentativa) y BAT1 (vía de Erlich), fueron los que mostraron una mayor sobreexpresión respecto a la condición control.

- En los tratamientos en coinoculación se tuvieron niveles de expresión similares a los de la condición control, a excepción del que incluyó a la BAL nativa VC32 en el gen CTT (estrés).
- El estudio de expresión genética en un proceso de vinificación tradicional en tinto requiere una mayor optimización específica para cada gen en cada tipo de muestra, para lograr las eficiencias de amplificación adecuadas.

VI. REFERENCIAS

- Albergaria H. and Arneborg N. 2016. Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100:2035–2046. DOI 10.1007/s00253-015-7255-0
- Álvarez, A. 2010. El mercado del vino en México. Informe, oficina económica y comercial de la Embajada de España en México. Madrid, España. 62 p.
- Andrighetto, C., Psomas, E., Tzanetakis, N., Suzzi, G. and Lombardi, A. 2000. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products. *Lett Appl Microbiol.* 30: 5–9. doi: 10.1046/j.1472-765x.2000.00589.x
- Araque, I., Gil, J., Carreté, R., Bordons A., and Reguant C. 2009. Detection of arc Genes related with the Ethyl Carbamate Precursors in wine lactic acid bacteria. *J Agric Food Chem.* 57 (5): 1841–1847.
- Arnink, K. and Henick-Kling, T. 2005. Influence of *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni* strains on successful malolactic conversion in wine. *Am J Enol Viti* 56: 228-237
- Artés-Hernández, F.; Artes, F. and Tomás-Barberán, F.A. 2003. Quality and enhancement of bioactive phenolics in Cv. Napoleon table grapes exposed to different postharvest gaseous treatments. *J Agric Food Chem.* 51(18): 5290-5295
- Barata A., Malfeito-Ferreira M. and Loureiro V. 2012. The microbial ecology of wine grape berries. *Int J Food Microbiol.* 153(3): 243-259 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.025>
- Berbegal C., Peña N., Russo P., Grieco F., Pardo I., Ferrer S., Spano G. and Capozzi V. 2016. Technological properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from grape must fermentation. *Food Microbiol.* 57:187-94. doi: 10.1016/j.fm.2016.03.002.
- Bartowsky E. 2005. *Oenococcus oeni* and Malolactic fermentation moving into the molecular era. *Aust J Grape Wine R.* 11: 174-187
- Bartowsky E. J. and Borneman A. R. 2011. Genomic variations of *Oenococcus oeni* strains and the potential to impact on malolactic fermentation aroma compounds in wine. *Appl Microbiol Biotechnol* 92:441–447

- Bauer R. and Dicks LMT. 2004. Control of Malolactic Fermentation in Wine. A Review. S. Afr. J. Enol. Vitic 25(2): 74-88.
- Bauer F.F and Pretorius I.S. 2000. Yeast Stress Response and Fermentation Efficiency: How to Survive the Making of Wine - A Review. S Afr J Enol Vitic. 21. Special Issue.
- Belda I., Ruiz J., Esteban-Fernández A., Navascués E., Marquina D., Santos A. and Moreno-Arribas MV. 2017. Microbial contribution to wine aroma and its intended use for wine quality improvement *Molecules* (22): 189. doi:10.3390/molecules22020189
- Bely M, Sablayrolles JM and Barre P. 1990. Description of alcoholic fermentation kinetics: its variability and significance. *Am J Enol Vitic.* 159:25–32.
- Bisson L. F., Waterhouse A. L., Ebeler S. E., Walker M. A. and Lapsley J. T. 2002. The present and future of the international wine industry. *Nature* 418: 696-699.
- Bokhorst-van de Veen H., Abee T., Tempelaars M., Bron PA., Kleerebezem M. and Marco mL (2011). Short- and Long-Term Adaptation to Ethanol Stress and Its Cross-Protective Consequences in *Lactobacillus plantarum*. *App Environ Microbiol* 77:15. 5247–5256. doi:10.1128/AEM.00515-11
- Bordas M., Araque I., Alegret J.O. and El Khoury M. 2013. Isolation, selection, and characterization of highly ethanol-tolerant strains of *Oenococcus oeni* from south Catalonia. *Int Microbiol* 16:113-123. DOI: 10.2436/20.1501.01.186
- Bordas M., Araque I., Bordons A. and Reguant C. 2015. Differential expression of selected *Oenococcus oeni* genes for adaptation in wine-like media and red wine. *Ann Microbiol.* DOI 10.1007/s13213-015-1069-2
- Bravo-Ferrada B.M., Hollmann A., Delfederico L., Valde´s La Hens D., Caballero A. and Semorile L. 2013. Patagonian red wines: selection of *Lactobacillus plantarum* isolates as potential starter cultures for malolactic fermentation. *World J Microbiol Biotechnol.* DOI 10.1007/s11274-013-1337-x
- Callejon R.M., Clavijo A., Ortigueira P., Troncoso A.M., Paneque P. and Morales M.L. 2010. Volatile and sensory profile of organic red wines produced by different selected autochthonous and commercial *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Anal Chim Acta.* 660(1-2):68-75. DOI: 10.1016/j.aca.2009.09.040.
- Campos F.M., Couto J.A. and Hogg T.A., 2003. Influence of phenolic acids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *J App Microbiol.* 94:167-174.

- Capece A., Romaniello R., Pietrafesa R. and Romano P. 2014. Indigenous *Saccharomyces cerevisiae* yeasts as a source of biodiversity for the selection of starters for specific fermentations. *BIO Web of Conferences* 3: 02003. *BIO Web of Conferences*. DOI: 10.1051/bioconf/20140302003
- Cappello MS., Zapparoli G., Logrieco A., Bartowsky EJ. 2017. Linking wine lactic acid bacteria diversity with wine aroma and flavour. *Int J Food Microbiol* 243: 16–27 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.025>
- Capozzi V., Russo P., Beneduce L., Weidmann S., Grieco F., Guzzo J. and Spano G. 2010. Technological properties of *Oenococcus oeni* strains isolated from typical southern Italian wines. *Lett Appl Microbiol* 50:327–334.
- Capozzi V., Russo P., Landero V., Fernández M., Fiocco D., Grieco F. and Spano G. 2012. Biogenic amines degradation by *Lactobacillus plantarum*: toward a potential application in wine. *Front Microbiol* 3:122. 6p doi: 10.3389/fmicb.2012.00122
- Carreto L., Eiriz M.F., Domingues I., Schuller D., Moura G.R. and Santos M. 2011. Expression variability of co-regulated genes differentiates *Saccharomyces cerevisiae* strains. *BMC Genomics* 12:201.
- CE nº 466/2001 2001. Contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios.
- Claro FB., Rijsbrack K. and Soares EV. 2007. Flocculation onset in *Saccharomyces cerevisiae*: effect of ethanol, heat and osmotic stress. *J Appl Microbiol* 102, 693–700.
- Comitini F., Ferreti R., Clementi F., Mannazzu I. and Ciani M. 2005. Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and malolactic bacteria: Preliminary characterization of a yeast proteinaceous compound(s) active against *Oenococcus oeni*. *J Appl Microbiol*. 99:105-111.
- Combina M., Elía A., Mercado L., Catania C., Ganga A. and Martinez C. 2005. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza. *Int. J Food Microbiol* 99: 237-243.
- Consejo Mexicano Vitivinícola (CMV). 2017. Infografía. <http://uvayvino.org.mx/infografia/>. Fecha de consulta: 02 de abril de 2018.
- Cordenete AG., Heinrich A., Pretorius IS. and Swiegers JH. 2009. Isolation of sulfite reductase variants of a commercial wine yeast with significantly reduced

hydrogen sulfide production. *FEMS Yeast Res.* 9(3): 446:459.
doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00489.x>

Cordenete AG., Curtin CD., Varela C. and Pretorius IS. 2012. Flavor-active wine yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* 96:601–618

Cordero-Bueso G., Esteve-Zarzoso B., Gil-Díaz M., García M. Cabellos J.M. and Arroyo T. 2016. Improvement of Malvar wine quality by use of locally-selected *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Fermentation* 2 (7): 13p.
doi:10.3390/fermentation2010007

Corry JEL, Curtis GDW. and Baird RM 2012. Handbook of culture media for food and water microbiology. Capitulo 8. Pp 127-140. Ed. Elsevier

Coton E. and Coton M. 2005. Multiplex PCR for colony direct detection of Gram-positive histamine- and tyramine-producing bacteria. *J Microbiol Meth*, 63, 296-304.

Couchenehy F., Desroche N., Bou M., Tourdot-Maréchal R., Dalau L. and Guzzo J. 2005. A new approach for selection of *Oenococcus oeni* strains in order to produce malolactic starters. *Int J Food Microbiol* 105:463-470.

De la Cruz de Aquino M.A., Martínez-Peniche R.A., Becerril-Román A.E. and Chávaro-Ortíz M.S. 2012. Physical and chemical characterization of red wines produced in Queretaro. *Rev Fitotec Mex.* 35: 61–67.

Deesutha O., Laopaiboonbc P. and Laopaiboon L. (2016). High ethanol production under optimal aeration conditions and yeast composition in a very high gravity fermentation from sweet sorghum juice by *Saccharomyces cerevisiae*. *Ind Crops Prod.* 92: 263-270

Degre, R. 1993. Selection and commercial cultivation of wine yeast and bacteria. En *Wine Microbiology and Biotechnology* (Fleet, G.H.). Harwood Academic Publishers, 421-447.

Delmas F., Pierre, F., Coucheney, F., Divie's C. and Guzzo, J. 2001. Biochemical and physiological studies of the small heat shock protein Lo18 from the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *J Mol Microb Biotech* 3:601– 610.

Ding J, Huang X, Zhang L, Zhao N, Yang D, Zhang K. 2009. Tolerance and stress response to ethanol in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 85(2):253-63. doi: 10.1007/S00253-009-2223-1.

- El financiero 2017a. Crecerá 5 % la producción de vino en Querétaro. <http://www.elfinanciero.com.mx/bajo/crecera-la-produccion-de-vino-en-queretaro>
Fecha de consulta: 02 de abril de 2018.
- El financiero 2017b. Vino mexicano, el más consumido en el país en 2016. <http://www.elfinanciero.com.mx/empresas/vino-mexicano-el-mas-consumido-en-el-pais-en-2016>.
- Erasmus D., Cliff M. and Van Vuuren H. 2004. Impact of yeast strain on the production of acetic acid, glycerol and the sensory attributes of icewine. *Am J Enol Viti* 55, 371 – 378.
- Estevan, M. C. 2013. El mercado del vino en México, estudios de Mercado. España Exportaciones e inversión. Oficina económica y comercial de la embajada de España en México. D.F. México. 60 p
- Fálder A. 2003. Vinos y productos v́nicos. Enciclopedia de los Alimentos. Ed. Marcasa. Madrid, España. Pp: 107-121.
- Fleet, GH 2003. Yeast interactions and wine Flavor. *Int J Food Microbiol* 86: 11-22.
- Fleet, GH. 2008 Wine yeast for the future. *FEMS Yeast Res.* 8: 979–995.
- FOCIR 2005. La vid: Características y variedades. Boletín quincenal de Inteligencia agroindustrial. INFOCIR. México. 10(1):1-5.
- Frey-Klett P., Burlinson P., Deveau A., Barret M., Tarkka M., and Sarniguet A. 2011. Bacterial-Fungal Interactions: Hyphens between Agricultural, Clinical, Environmental, and Food Microbiologists. *Microbiol Mol Biol Rev* 75(4): 583-609 doi:10.1128/MMBR.00020-11
- Fumi, M.D., Krieger-Weber, S., Deléris-Bou, M., Silva, A. and Du Toit, M. 2010. A new generation of malolactic starter cultures for high pH wines. Proc. Intern. *IVIF Congress*. IVIF Congress March 2010 Stuttgart.
- G-Alegría E., López I., Ruiz J.I., Sáenz J., Fernández E., Zarazaga M., Dizi M., Torres C. and Ruiz-Larrea F. 2004. High tolerance of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol. *FEMS Microbiol Lett.* 230:53-61.
- Galet, P. 2000. Dictionnaire encyclopédique des cépages. Ed. Hachette. Montpellier, Francia. 1024 p.

- García-Ruiz A., Bartolomé B., Martínez-Rodríguez A.J., Pueyo E., Martín-Álvarez P.J. and Moreno-Arribas M.V. 2008. Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Braz. J. Microbiol.* 43(1). <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822012000100018>
- Garofalo C., El Khoury M., Lucas P., Bely M., Russo P., Spano G. and Capozzi V. 2015. Autochthonous starter cultures and indigenous grape variety for regional wine production. *J Applied Microbiol.* 118: 1395-408. DOI: 10.1111/jam.12789.
- Goldner MC., di Leo Lira P., van Baren C. and Bandoni A. 2011. Influence of Polyphenol Levels on the Perception of Aroma in *Vitis vinifera* cv. Malbec wine. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 32(1): 21-27
- González-Barreiro C., Rial-Otero R., Cancho-Grande B. and Simal-Gándara J. 2015. Wine Aroma Compounds in Grapes: A Critical Review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 55:2. 202-218. DOI: 10.1080/10408398.2011.650336
- Guilloux-Benatier, M. and Chassagne, D. 2003. Comparison of components released by fermented or active dried yeasts after aging on lees in a model wine. *J Agr Food Chem.* 51: 746-751.
- Halil D., Ömür C., Bekir S., and Tahsin Faruk B. 2014. Large-scale purification of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* using diatomite calcium silicate. *Turkish J Biology.* 38: 1312-1320
- Hernández-Orte P., Cersosimo M., Loscos N., Cacho J., Garcia-Moruno E., Ferreira V. 2009. Aroma development from non-floral grape precursors by wine lactic acid bacteria. *Food Res Int* 42. 773–781. doi:10.1016/j.foodres.2009.02.023
- Iorizzo M., Testa B., Lombardi S.J., García-Ruiz A., Muñoz-González C., Bartolomé B., Moreno Arribas M.V. 2016. Selection and technological potential of *Lactobacillus plantarum* bacteria suitable for wine malolactic fermentation and grape aroma release. *LWT - Food Sci Technol* Doi: 10.1016/j.lwt.2016.06.062.
- Jackson D.I. and Lombard P.B 1993. Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality – A review. *Am J Enol Vitic* 44: 409-403.
- Jobin MP., Garmyn D., Divie's C. and Guzzo, J., 1999. The *Oenococcus oeni* clpX homologue is a heat shock gene preferentially expressed in exponential growth phase. *J Bacteriol* 181, 6634– 6641.
- Kennedy JA. 2008. Grape and wine phenolics: Observation and recent findings. *Cien Inv Agr* 35(2): 107-120. 2008

- Konings WN. 2002. The cell membrane and the struggle for life of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuw* 82:3–27.
- Kontoudakis N., Esteruelas M., Fort F., Canals JM., De Freitas V. and Zamora F. 2011. Influence of the heterogeneity of grape phenolic maturity on wine composition and quality. *Food Chem* 124: 767–774.
- Kowalska T., Héberger K. and Görgényi M. 2003. Temperature dependence of Kováts indices in gas chromatography. Explanation of empirical constants by use of transition-state theory. *Acta Chromatographica* 13: 60-68
- Kunicka-Styczyńska A. and Rajkowska K. 2012. Phenotypic and genotypic diversity of wine yeasts used for acidic musts. 2012. *World J Microbiol Biotechnol.* 28(5):1929-1940. doi:10.1007/s11274-011-0994-x.
- Kurtzman C., Fell J. and Boekhout T. 2011. *The Yeast a taxonomic study.* 5^a Ed. Elsevier. Oxford, Reino Unido. 1076p.
- Lambrechts MG. and Pretorius IS. 2000. Yeast and its Importance to Wine Aroma - A Review. *S. Afr. J. Enol. Vitic. Special Issue* (21): 97-129.
- Landete, J.M., Ferrer, S., Polo, L. and Pardo, I. (2005) Biogenic amines in wines from three Spanish regions. *J Agric Food Chem* 53: 1119–1124.
- Lehtonen P. 1996. Determination of amines and amino acids in wine – a review. *Am J Enol Vitic.* 47:127-133
- Lele U. and Watve M. 2014. Bacterial Growth Rate and Growth Yield: Is There A Relationship? *Proceedings of the Indian National Science Academy* 80(3): 537-546 DOI: 10.16943/ptinsa/2014/v80i3/55129
- Lerm E., Engelbrecht L. and du Toit M. 2010. Malolactic Fermentation: The ABC's of MLF. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 31(2):186-212
- Lerm E., Engelbrecht L. and du Toit M. 2011. Selection and characterization of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* South African wine isolates for use as malolactic fermentation starter cultures. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 32(2): 280-291.
- Liu, S. Q. 2002. A review: malolactic fermentation in wine - beyond deacidification. *J App Microbiol.* 92589-601.

- Liu Y, Rousseaux S., Tourdot-Maréchal R., Sadoudi M, Gougeon R, Schmitt-Kopplin P. and Alexandre H. 2015. Wine microbiome, a dynamic world of microbial interactions. *Crit Rev Food Sci Nutr*. Doi: 10.1080/10408398.2014.983591
- Alba-Lois L. and Segal-Kischinevzky M. 2010. Yeast fermentation and the making of beer and wine. *Nat. Educ.* 3:17.
- Lonvaud-Funel A. 1999. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie van Leeuw* 76: 317-331
- Lonvaud-Funel A. 2001. Biogenic amines in wine: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 1: 9-13. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10643.x>
- Lonvaud-Funel A. 2015. Chapter 15: Lactic acid bacteria and malolactic fermentation in wine *in* *Biotechnology of Lactic acid bacteria: Novel applications*. Mozzi F., Raya R. and Vignolo G. 2nd Ed, John Wiley & Sons, Ltd. London U.K. DOI:10.1002/9781118868386
- Lopes CA and Sagorin MP. 2010. Optimization of killer assays for yeast selection protocols. *Rev Argent Microbiol* 42(4):298-306
- Lu Y., Chua JY., Huang D., Lee PR. and Liu SQ. 2016 Biotransformation of chemical constituents of durian wine with simultaneous alcoholic fermentation by *Torulaspora delbrueckii* and malolactic fermentation by *Oenococcus oeni*. *Journal of App Microbiol Biotechnol*. DOI 10.1007/s00253-016-7720-4
- Labarre C., Guzzo J., Cavin J.F. and Diviés C. 1996. Cloning and Characterization of the genes encoding the malolactic enzyme and the malate permease of *Leuconostoc oenos*. *Appl Envir Microbiol* 62(4):1274-1282
- Marcobal A., Martínez-Álvarez PJ., Polo MC., Muñoz R. and Moreno-Arribas M.V. 2006. Formation of biogenic amines throughout the industrial manufacture of red wine. *J Food Protect* 69: 397–404.
- Marasco R., Rolli E., Fusi M., Michoud G. and Daffonchio D. 2018. Grapevine rootstocks shape underground bacterial microbiome and networking but not potential functionality. *Microbiome*. 6: 3. 10.1186/s40168-017-0391-2.
- Marquina D., Santos A. and Peinado J.M. 2002. Biology of killer yeasts. *Int. Microbiol.* 5: 65-71
- Martínez de Toda, F. 2002. Viticultura de calidad: Factores que afectan al contenido en compuestos fenólicos. *ACE Revista de Enología*. Edición digital. Mayo

- Martínez-Peniche R. 1995. La industria vitivinícola de Querétaro en crisis. NTHE. 13(2): 24-27.
- Mas A., Torija J., Beltrán G., Novo M., Hierro N., Poblet M., Rozés N. y Guillamón J. 2002. Selección de levaduras. Tecnología del vino, Fermentos. Pp 39-44.
- McGovern 2003. Ancient Wine: The search for the origins of viniculture. 1st Ed. Princeton University press. Oxfordshire, U.K. 400p.
- Mendes-Ferreira A., del Olmo M., García-Martínez J., Jiménez-Martí E., Mendes-Faia A., Pérez-Ortín J. E. and Leao C. 2007. Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to different Nitroge concentrations during alcoholic fermentation. Appl Envir Microbiol 73(9):3049-3060
- Millet, V. and Lonvaud-Funel, A. 2000. The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. Lett App Microbiol, 30: 136–141. doi: 10.1046/j.1472-765x.2000.00684.x
- Miller BJ., Franz CMAP, Cho G-S and du Toit M. Curr Microbiol (2011) Expression of the Malolactic Enzyme Gene (*mle*) from *Lactobacillus plantarum* under Winemaking Conditions. Curr Microbiol. 62:1682–1688. DOI 10.1007/s00284-011-9914-4
- Mira de Orduña, R.; Liu, S.-Q. ; Patchet, M.L. and Pilone, G.J. 2001. Growth and 5 arginine metabolisms of the wine lactic acid bacteria *Lactobacillus buchneri* and 6 *Oenococcus oeni* at different pH values and arginine concentrations. Appl Environ Microbiol. 67 :1657-1662
- Miranda-Castilleja D.E, Martínez-Peniche R.Á., Aldrete-Tapia J.A., Soto-Muñoz L., Iturriaga M.H., Pacheco-Aguilar J.R. and Arvizu-Medrano S.M. 2016. Distribution of Native Lactic Acid Bacteria in Wineries of Queretaro, Mexico and Their Resistance to Wine-Like Conditions. Front Microbiol. 7:1769. doi: 10.3389/fmicb.2016.01769
- Mtshali P.S., Divol B., van Rensburg P., du Toit M. 2010. Genetic screening of wine-related enzymes in *Lactobacillus* species isolated from South African wines. J Appl Microbiol 108:1389–1397
- Muñoz V., Beccaria B and Abreo E. 2014. Simultaneous and successive inoculations of yeasts and lactic acid bacteria on the fermentation of an unsulfited Tannat grape must. Braz J Microbiol. 45(1):59-66.
- Morenzoni R., Bou M., Brown N., Costello P., Degré R., Dieterich W., Gertsen-Briand S., Kollar S., Krieger S., Kyne A., Loubser P., Palacios A., Powell C., Scully K.,

- Specht G. and Theodore D. 2005. Malolactic Fermentation in Wine. Boletín informativo. Lallemand Inc. Montreal, Canada. Pp 10-20.
- Nadai C., Campanaro S., Giacomini A and Corich V. 2015. Selection and validation of reference genes for quantitative real-time PCR studies during *Saccharomyces cerevisiae* alcoholic fermentation in presence of sulfite, Int J of Food Microbiol doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.012
- Nehme N., Mathieu F. and Taillandier P. 2010. Impact of the co-culture of *Saccharomyces cerevisiae*–*Oenococcus oeni* malolactic fermentation and partial characterization of a yeast derived inhibitory peptidic fraction. *Food Microbiology* pp. 150-157. DOI:10.1016/J.FM.2009.09.008
- Nehme N., Mathieu F. and Taillandier P. 2008. Quantitative study of interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni* strains. J Ind Microbiol Biotechnol. 35(7):685-93. doi: 10.1007/s10295-008-0328-7.
- Nissen, P., Nielsen, D., and Arneborg, N. 2003. Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non- *Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism. *Yeast*. 20: 331-341
- OIV 2012a. Directrices para la caracterización de levaduras de vino del género *Saccharomyces* aisladas de ambientes vitivinícolas (OIV-OENO 370-2012). Organización internacional de la vid y el vino. París, Francia.
- OIV 2012b. International Standar for labelling of wine. Organización internacional de la vid y el vino. París, Francia.
- OIV 2017. State of Vitiviniculture world market: April 2017. Organización internacional de la vid y el vino. París, Francia.15p. Practices (Code). Annex Maximum acceptable limits. París, France. 4p.
- Ojeda H. 2007. Los compuestos fenólicos de la uva. *Enología* 4(4): 11p
- Ortiz-Barrera E., Miranda-Castilleja D.E., Arvizu-Medrano S.M., Pacheco-Aguilar J.R., Aldrete-Tapia J.A., Hernández-Iturriaga M., and Martínez-Peniche R.A. 2015. Enological potential of native non-*Saccharomyces* yeasts from vineyards established in Queretaro, Mexico. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 21(2): 169–183. doi: 10.5154/r.rchsh.2015.01.001.
- Ortiz de Zárate Martínez, Gonzalo. 2017. Estudio sobre el mercado del vino en México (datos 2013 - 2016) Oficina Económica y Comercial de España en México. Editorial ICEX. Madrid, España. 63 p

- Pérez-Bibins, B., Torrado-Agrasar A., Salgado J.M., Pinheiro de Souza Oliveira R. and Domínguez J.M. 2015. Potential of lees from wine, beer and cider manufacturing as a source of economic nutrients: An overview. *Waste Management* <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2015.03.009>
- Du Plessis H., du Toit M., Nieuwoudt H., van der Rijst M., Kidd M. and Jolly N. 2017. Effect of *Saccharomyces*, Non-*Saccharomyces* Yeasts and Malolactic Fermentation Strategies on Fermentation Kinetics and Flavor of Shiraz Wines. *Fermentation* 3:64 Doi:10.3390/fermentation3040064
- Pozo-Bayón M.A., G-Alegría E., Polo M.C., Tenorio C., Martín-Álvarez P.J., Calvo De La Banda M.T., Ruiz-Larrea F., Moreno-Arribas M.V. 2005. Wine volatile and amino acid composition after malolactic fermentation: effect of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* starter cultures. *J Agric Food Chem.* 53:8729–8735.
- Pozo-Bayón, M. A., Monagas, M., Bartolomé B. and Moreno-Arribas M. V. 2012. Wine Features to safety and consumer health: an integrated perspective. Revisión para el Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC). Madrid, España.
- Pretorius I. 2000. Tailoring wine yeast for the new millenium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16: 675-729
- Querol A., Fernández-Espinar T., Del Olmo M. y Barrio E. 2003. Adaptative Evolution of wine yeast. *Int J Food Microbiol.* 86: 3-10.
- Rainieri S. and Pretorius I.S. 2000. Selection and improvement of wine yeasts. *Ann Microbiol.* 50:15-31.
- Ramos C.L., Duarte W.F., Freire A.L., Dias D.R., Arajúo E.C. and Schwan R.F. 2013. Evaluation of stress tolerance and fermentative behavior of indigenous *Saccharomyces cerevisiae*. *Braz J Micriobiol.* 44(3): 935-944.
- Regodón J. 1997. Obtención y caracterización de cepas de levaduras para la elaboración estandarizada de vinos de calidad. Tesis doctoral. Universidad de Extremadura. Extremadura, España. pp 3-40
- Reguant C. and Bordons A. 2003. Typification of *Oenococcus oeni* strains by multiplex RAPD-PCR and study of population dynamics during malolactic fermentation. *J Appl Microbiol* 95:344-353.
- Reynolds A. G. 2010. Managing wine quality Vol 2. Oenology and wine Quality. Woodhead Publishing Limited. Cambridge, UK. pp: 655–66

- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., Lonvaud, A. 2006. Tratado de Enología. Mundi-Prensa. Madrid, España. 928p
- Robinson A.L., Boss P.K., Solomon P.S., Trengove R.D., Heymann H., and Ebeler S.E. 2014. Origins of Grape and Wine Aroma. Part 1. Chemical Components and Viticultural Impacts. *Am J Enol Vit.* 65:1
- Rossouw D., Du Toit M. and Bauer F. 2012. The impact of co-inoculation with *Oenococcus oeni* on the transcriptome of *Saccharomyces cerevisiae* and on the flavour-active metabolite profiles during fermentation in synthetic must. *Food Microbiol.* 29(1): 121-131 <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.09.006>
- Ruiz P., Izquierdo P. M., Seseña S. and Palop M. LI. 2010. Analysis of lactic acid bacteria populations during spontaneous malolactic fermentation of tempranillo wines at five wineries during two consecutive vintages. *Food Control* 21:70–75
- Saerens SMG., Delvaux FR., Verstrepen KJ. and Thevelein J.M. 2010. Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Biotechnol* 3(2): 165-177. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00106.x>
- Salmon JM. 1989. Effect of sugar transport inactivation in *Saccharomyces cerevisiae* on sluggish and stuck oenological fermentation. *Appl Environ Microbiol.* 55:933–958.
- Santamaría P., Garijo P., Tenorio C., López R. y Gutiérrez A. 2007. Presencia de levaduras autóctonas en bodegas que practican la inoculación reiterada con Levaduras Secas Activas. *In: Memoria del VI Congreso Nacional de Enólogos.* Logroño, España. pp: 1-5.
- Scanes K.T., Hohman S. and Priori B.A. 1998 Glycerol production of yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its relevance to wine: A review. *S Afr J Enol Vitic* 19(1): 17-24.
- Smart RE, Dick JK., Gravett IM and Fisher BM. 1990 .Canopy Management to Improve Grape Yield and Wine Quality - Principles and Practices. *S Afr J Enol Vitic.* 11(1): 22-32. DOI: <http://dx.doi.org/10.21548/11-1-2232>
- Smid E.J. and M. Kleerebezem. 2014. Production of Aroma Compounds in Lactic Fermentations. *Annu Rev Food Sci Technol* 5:313–26. 10.1146/annurev-food-030713-092339
- SIAP 2017. Consulta en línea de ficha agrícola por estado. http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/FichaPorEstado.do. Fecha de consulta: 02 de abril de 2018.

- Sieuwerts S., Bron PA. and Smid EJ. 2018. Mutually stimulating interactions between lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* in sourdough fermentation. *LWT - Food Sci Tech* 90:201-206 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.022>
- Soares E.V. 2010. Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: a review. *J Appl Microbiol.* 110: 1–18. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04897.x
- Solieri L., Genova F., De Paola M. and Giudici P. 2010. Characterization and technological properties of *Oenococcus oeni* strains from wine spontaneous malolactic fermentation: a framework for selection of new starter cultures. *J App Microbiol* 108:285-298.
- Spano G. and Massa S. 2006. Environmental stress response in wine lactic acid bacteria: beyond *Bacillus subtilis*. *Crit Rev Microbiol.* 32(2):77-86. DOI: 10.1080/10408410600709800.
- Stanley D., Bandara A., Fraser S., Chambers P.J. and Stanley G.A. 2010. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol.* 109: 13-24. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04657.x
- Styger G., Prior B. and Bauer F.F. 2011. Wine flavor and aroma. *J Ind Microbiol Biotechnol* 38:1145–1159
- Styger G., Jacobson D., Prior B. A. and Bauer F. F. 2013. Genetic analysis of the metabolic pathways responsible for aroma metabolite production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:4429–4442
- Suárez-Lepe JA. and Morata A. 2012. New trends in yeast selection for winemaking. *Trends Food Sci Technol* 23: 39-50. doi:10.1016/j.tifs.2011.08.005
- Swiegers J., Bartowsky E., Henschke P. and Pretorius I. 2005. Yeast and Bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust J Grape Wine R.* 11: 139-173.
- Tao Y., Li H., Wang H. and Zhang L. 2008. Volatile compounds of young cabernet sauvignon red wine from Changli country (China). *J Food Comp Anal* 21: 689–694
- Taniasuri F., Lee PR. and Liu SQ. 2016. Induction of simultaneous and sequential malolactic fermentation in durian wine. *Int J Food Microbiol* 230: 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.006>
- Todorov ST. and Gombossy De Melo Franco BD. 2010. *Lactobacillus plantarum*: characterization of the species and application in food production. *Food Rev Int.*

26:3, 205-229. <http://dx.doi.org/10.1080/87559129.2010.484113>

- Togores JH. 2006. La calidad del viñedo desde el viñedo. Ed. Mundi-Prensa Libros. Barcelona, España. 390 p.
- Togores JH. 2011. Tratado de Enología. Ed. Mundi-Prensa Libros. Barcelona, España. 1823 p.
- Tonon, T., Bourdineaud, JP. and Lonvaud-Funel, A. 2001. Arginine degradation by *Oenococcus oeni*: energetic and genetical aspects. Lait 81, 139–150.
- Torija M.J., Beltran G., Novo M., Poblet M., Guillamon J.M., Mas A., Rozes N. 2003. Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. Int J Food Microbiol 85: 127–136.
- Uber-García G. 2006. Modificación genética de levaduras vínicas industriales, para mejorar la producción de aromas secundarios. Tesis doctoral. Universitat de Valencia. Servei publicacions. Valencia, España. 233 p.
- Ugliano M. and Moio L. 2005. Changes in the concentration of yeast-derived volatile compounds of red wine during malolactic fermentation with four commercial starter cultures of *Oenococcus oeni*. J Agric Food Chem. 53 : 10134-10139. Doi 10.1021/jf0514672.
- Van Zandycke S. 2005. Malolactic Fermentation in Wine. Boletín informativo. Lallemand Inc. Montreal, Canada. Pp 10-20.
- Vázquez J., González B., Sempere V, Mas A., Torija M.J. and Beltran G. 2017. Melatonin Reduces Oxidative Stress Damage Induced by Hydrogen Peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*. Front Microbiol. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01066>
- Verstrepen K.J., Derdelinckx G., Verachtert H. and Delvaux F.R. 2003. Yeast flocculation: what brewers should know. Appl Microbiol Biotechnol. 61:197–205. 10.1007/s00253-002-1200-8.
- Viana, F., J.V. Gil, S. Genovés, S. Vallés, and P. Manzanares 2008. Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. Food Microbiol. 25: 778-785.
- Vila-Crespo J., Rodríguez-Nogales J., Fernández-Fernández E. and Hernanz-Moral M. 2010. Strategies for the enhancement of malolactic fermentation in the new

climate conditions *In: Current research Technology and Education Topics in Appl Microbiol and Microb Biotechnol.* Ed. Méndez-Vilas. Badajoz: Formatex Research Center. 920-929.

Villamor, R.R., Ross, C.F., 2013. Winematrix compounds affect perception of wine aromas. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 4, 1–20.

Walker G.M. and Stewart G.G. 2016. *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages*. doi:10.3390/beverages2040030.

Waterhouse 2005. *Red wine composition; Natural products in wine.* University of California Davis. California, EE.UU

Westman, J.O., Mapelli, V., Taherzadeh, M.J. and Franzén, C.J. 2014. Flocculation Causes Inhibitor Tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* for Second-Generation Bioethanol Production. *App Environ Microbiol* 80(22): 6908–6918. <http://doi.org/10.1128/AEM.01906-14>

Zapparoli G., Torriani S., Pesente P. and Dellaglio F. 1998. Design and evaluation of malolactic enzyme gene targeted primers for rapid identification and detection of *Oenococcus oeni* in wine. *Lett Appl Microbiol* 27:243-246.

Zapparoli G., Torriani S., Malacrino P., Suzzi G. and Dellaglio F. 2003. Interactions between *Saccharomyces* and *Oenococcus oeni* strains from Amarone wine affect malolactic fermentation and wine composition. *Research note. Vitis* 42(2): 107-108.

Zapparoli G., Tosi E. and Krieger S. 2006. Influence of the pH of Chardonnay must on malolactic fermentation induced by bacteria co-inoculated with yeasts. *Research note. Vitis* 45(4): 197-198

Zhang M., Pan Q., Yan G. and Duan C. 2011. Using head space solid phase micro-extraction for analysis of aromatic compounds during alcoholic fermentation of red wine. *Food Chem* 125:743–749

Zhang Q., Jia K-Z., Xia S-T., Xu Y-H, Liu R-S, Li H-M & Tang Y-J. 2016 Regulating Ehrlich and demethiolation pathways for alcohols production by the expression of ubiquitin-protein ligase gene HUWE1. *Sci Rep* 6: 20828

VII. ANEXOS

Tabla A1. Secuencias de los cebadores utilizados para los ensayos moleculares

Iniciador	Secuencia 5' – 3'	Técnica	Microorganismo	Producto
RF2	CGGCCCTGT	RAPD	Levaduras	-
M13	GAGGGTGGCGTTCT	RAPD	BAL	-
Coc	AGCAGCGTGG	RAPD	<i>O. oeni</i>	-
On1	TAATGTGGTTCTTGAGGAGAAAAT	PCR	<i>O. oeni</i>	-
On2	ATCATCGTCAAACAAGAGGCC TT	PCR		-
OF	GGTAGATTAACCCGCGACG	Multiplex	<i>O. oeni</i>	1588
OR	GGAATCGGTAGCATCCTG	Multiplex		
LBR-F	GGAAGATCAAGAATATCGGTG	Multiplex	<i>Lb. brevis</i>	1361
LBR-R	GCGTCTCTAATTCAGTACG	Multiplex		
LPL-F	GAAGATTTGCCATCGGTG	Multiplex	<i>Lb plantarum</i>	1113
LPL-R	CGTTTGATGGTAGCGTTGC	Multiplex		
LEU-F	GTGGTCATGGGTCTTAGC	Multiplex	<i>L. mesenterioides</i>	886
LEU-R	GGATCAAGACTAGCCAATGG	Multiplex		
WPA-F	GCTGATGAACCCATACCTC	Multiplex	<i>W. Paramesenteroides</i>	641
WPA-R	GACCTGATTCGCTCGTTG	Multiplex		
PDA-F	GTCTAAACTGGTGGTTAAACG	Multiplex	<i>P. damnosus</i>	470
PDA-R	ATCGCACCTGGTTCAATGC	Multiplex		
PPA-F	GCATGAATCACTTTTCGCTC	Multiplex	<i>P. parvulus</i>	331
PPA-R	CAAAGATTGTGACCCAGTTG	Multiplex		
LBU-F	CTATCTTTAACCGCATTGCCG	Multiplex	<i>Lb buchneri</i>	1007
LBU-R	GACACGCTTCTCATGATTGTC	Multiplex		
PAC-F	ATGATGGACAGACTCCCTG	Multiplex	<i>P. acidilactici</i>	776
PAC-R	CGAGCTGCGTAGATATGTC	Multiplex		
LBH-F	TTCCTTGGAATGTGCTTGC	Multiplex	<i>Lb. hilgardii</i>	684
LBH-R	AATGGCAATCGCAATGGACG	Multiplex		
PIN-F	CTATCCTTACAATGTGCATCG	Multiplex	<i>P. inopinatus</i>	567
PIN-R	TGGTGCAGTAAATGTAAG	Multiplex		
LCU-F	CCAGATCCATCAGAAGATACG	Multiplex	<i>Lb. curvatus</i>	480
LCU-R	GCTAACTTACCACTAACGACC	Multiplex		
PPE-F	GGGAACGGTTTTAGTTTTATACG	Multiplex	<i>P. pentosaceus</i>	396
PPE-R	CTAAGAGCGGTGATGATAAG	Multiplex		
UBC6-F	GATACTTGGAATCCTGGCTGGTCTGTC TC	qPCR	<i>S. cerevisiae</i>	272
UBC6-R	AAAGGGTCTTCTGTTTCATCACCTGTAT TTGC	qPCR		
ALG9-F	CACGGATAGTGGCTTTGGTGAACAATT AC	qPCR	<i>S. cerevisiae</i>	162
ALG9-R	TATGATTATCTGGCAGCAGGAAAGAAC TTGGG	qPCR		

CTT1-F	GACTTCGAACAGCCAAGAGC	qPCR	<i>S. cerevisiae</i>	92
CTT1-R	TTACAAGCGTGGCAAACAAC	qPCR		
HSP12-F	TCTTCCAAGGTGTCCACGAC	qPCR	<i>S. cerevisiae</i>	118
HSP12-R	TCGTTCAACTTGGACTTGGC	qPCR		
ADH1-F	CACGGTGTCATCAACGTTTC	qPCR	<i>S. cerevisiae</i>	145
ADH1-R	TGGACTTGACGACTTGGTTG	qPCR		
BAT2-F	AGGTGACACTATAGAATAGACGAATTT GTCTGCCAG	qPCR	<i>S. cerevisiae</i>	163
BAT2-R	GTACGACTCACTATAGGGAAAGAGTAG CCCTTTCCT	qPCR		
MSN4	AACTTCTCCCAAGACAAACCTTC	qPCR	<i>S. cerevisiae</i>	201
MSN4	TTCAATGCTTCTTCTGAAGATACAA	qPCR		

Anexo 2. Formulaciones de medios de cultivo empleados

- Jugo de uva sintético (GJM): 10 g/L glucosa, 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de peptona, 0.2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 g/L, L-ácido málico, 0.1 % tween 80, 25 % jugo de uva, ajustado a un pH de 4.8.
- Vino sintético (SW): Extracto de levadura 4 g/L, glicerol 2 g/L, l,d-ácido málico 6 g/L, en presencia de etanol al 10 % y 300ppm de SO_2 (v/v), a un pH de 3.5.
- YPD-MB: Extracto de levadura 1 g/L, extracto de malta 3 g/L, glucosa 20 g/L, peptona de caseína 2 g/L, agar bacteriológico 20 g/L, 0.003 g/L de azul de metileno y 1 % de NaCl a un pH de 4.6 ajustado con citrato-fosfato.
- Medio Chalk: Extracto de levadura (5 g/L), glucosa 50 g/L, CaCO_3 5 g/L y agar bacteriológico 15 g/L.
- Medio Biggy: Extracto de levadura 1 g/L, glicina 10 g/L, dextrosa 10 g/L, citrato de amonio bismuto 5 g/L, sulfito de sodio 3 g/L y agar bacteriológico 16 g/L.
- H_2S Bacterias: Peptona de caseína 15 g/L, caseína 5 g/L, glucosa 1 g/L, acetato de pb 0.2 g/L, tiosulfato de sodio 0.08 g/L, sulfato de manganeso 0.05 g/L, tween 80 1 mL/L y agar bacteriológico 15 g/L.

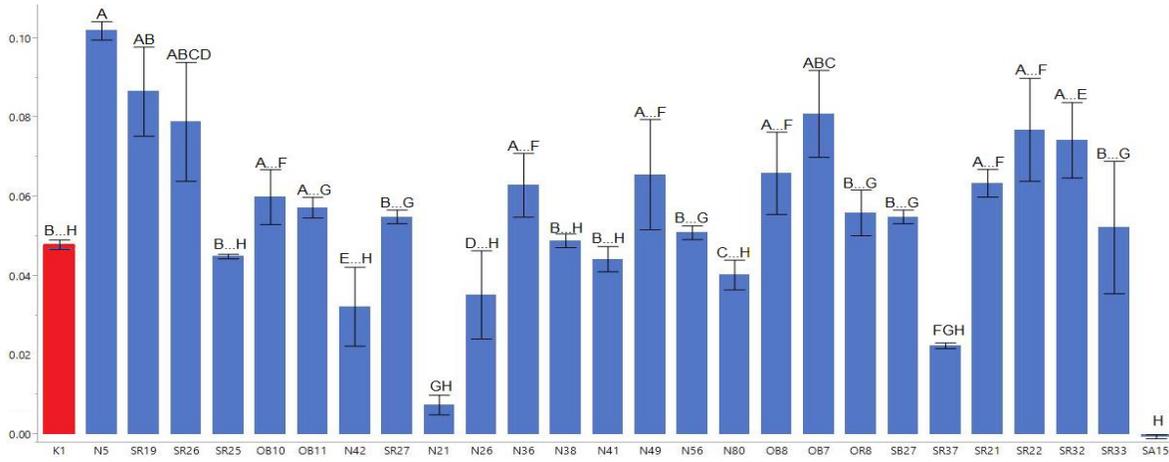


Figura A1. Velocidad de desarrollo en medio cuya única fuente de nitrógeno fueron 66 mg/L se sulfato de amonio. Letras distintas indican diferencia significativa mediante prueba de Tukey (JMP 11).

Tabla A2. Caracterización fenotípica semi-cuantitativa de 27 levaduras *Saccharomyces*

Cepa	Killer**	Acético	Sulfhídrico	Floculación	8 °C
N05	0.293 b	1	2	1	1
N21	0	0	1	0	1
N26	0	0	1	1	0
N36	0	0	1	1	1
N38	0	0	1	2	1
N41	0	0	1	1	1
N42	0	0	1	1	1
N49	0	0	1	1	1
N56	0	0	1	1	0
N80	0	0	1	1	1
OR8	0	0	1	1	0
O38	0	0	1	0	1
OB10	0	0	1	1	0
OB11	0	0	1	1	0
OR7	0	0	1	1	0
SA15	0	0	1	1	0
SB27	0	0	1	2	1
SR19	0.217 b	1	2	2	1
SR21	0	0	1	1	1
SR22	0	0	1	1	0
SR25	0	0	1	1	1
SR26	0.251 ab	1	2	2	1
SR27	0	0	1	2	0
SR32	0	0	1	1	0
SR33	0	0	1	2	1
SR37	0	0	1	0	1
K1	0.201 b	1	0	1	0

* Números mayores a 0 indican la producción de compuesto o desarrollo positivo.

**Números indican el diámetro de los de halos formados al evaluar el fenotipo *killer*, letras distintas indican significancia estadística mediante la prueba de Tukey (JMP11).

Tabla A.3 Prueba de medias para determinar diferencias en interacción levadura-BAL.

A) Levadura			B) Bacteria		
Cepa	Media	Tukey	Cepa	Media	Tukey
SR19	13.99	A	450 [®]	15.97	A
SR25	8.64	A	FU39	12.39	A
N42	8.62	A	VC32	7.89	B
N05	6.87	B	VA91	4.52	C
SB27	5.30	B	CU15	0.27	D
K1	5.84	B			

C) Levadura*BAL					
Lev,BAL	Media	Tukey	Lev,BAL	Media	Tukey
SR19, 450 [®]	28.26	A	SR25, VC32	6.54	BCDEF
SR19, VC32	22.38	AB	SR19, VA91	5.80	BCDEF
N42, 450 [®]	15.95	ABC	SB27, VC32	5.35	BCDEF
N05, 450 [®]	15.00	ABC	N05, VA91	5.26	BCDEF
SR25, 450 [®]	14.71	ABC	N42, VA91	5.10	CDEF
N42, FU39	14.22	ABC	K1, VA91	3.70	DEF
SR25, FU39	14.38	ABC	N05, VC32	3.05	EFG
K1, 450 [®]	13.54	ABC	K1, VC32	2.49	FG
SR19, FU39	12.72	ABC	SR19, CU15	0.76	HI
SB27, FU39	12.64	ABC	SR25, CU15	0.29	I
N05, FU39	10.99	ABCD	N42, CU15	0.29	I
K1, FU39	9.41	ABCDE	SB27, CU15	0.16	IJ
SB27, 450 [®]	8.36	ABCDEF	N05, CU15	0.07	J
N42, VC32	7.54	BCDEF	K1, CU15	0.07	J
SR25, VA91	7.25	BCDEF	SB27, VA91	0	K

Cepas evaluadas. Levaduras nativas: SR19, S25, N42, N05, SB27 y comercial K1. BAL, *L. plantarum*: FU39. *O. oeni*: CU15, VC32, VA91 nativas y comercial 450[®].