



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

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

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

SELECCIÓN DE LEVADURAS NATIVAS ENOLÓGICAS A PARTIR DE DIFERENTES
ÓRGANOS DE VIDES ESTABLECIDAS EN QUERÉTARO

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

Q.A. Yamile Maricela Barragán Castillo

Dirigido por:

Ramón Álvar Martínez Peniche

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Fecha: Diciembre 2018



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Selección de levaduras nativas enológicas a partir de diferentes órganos de vides establecidas en Querétaro

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

Q.A. Yamile Maricela Barragán Castillo

Dirigido por:

Ramón Álar Martínez Peniche

Dr. Ramón Álar Martínez Peniche
Presidente


Firma

Dra. Sofía Arvizu Medrano
Secretario


Firma

Dra. Lourdes Soto Muñoz
Vocal

Lourdes Soto M.
Firma

M. en C. Dalia Elizabeth Miranda Castilleja
Suplente


Firma

M. en C. Jesús Alejandro Aldrete Tapia
Suplente


Firma

Dra. Silvia Amaya Llano
Director de la Facultad

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Fecha: Diciembre 2018

RESUMEN

El Estado de Querétaro se ubica dentro de los principales productores de vino en México. El vino es el producto de la fermentación del jugo de uva llevada a cabo por distintas especies de levaduras que van dejando paso unas a otras de manera secuencial y espontánea; transformando el azúcar en etanol y CO₂. Se sabe que las levaduras están extendidas en la naturaleza y se distribuyen sobre la superficie de la vid. En nuestro país se desconocen las especies de levaduras predominantes en los diferentes órganos de la planta y si éstas presentan cualidades enológicas. El objetivo de este trabajo fue aislar, identificar y evaluar el potencial enológico de levaduras nativas de diferentes órganos de vides establecidas en Querétaro. Se cuantificaron e identificaron las especies de levaduras presentes en hojas (zona alta, media y baja del pámpano) inflorescencias, fruto (amarre, envero y maduro) y yema cerrada de la variedad 'Tempranillo'. Se identificaron mediante RFLP un total de 93 levaduras en los distintos órganos considerados. Las especies predominantes fueron *Aureobasidium pullulans* y diferentes especies de *Cryptococcus* (*C. magnus*, *C. luteolus*, *C. albidus*, *C. carnescens*, *C. flavescens* y *C. rajasthanensis*). Las especies con potencial enológico que se encontraron fueron: *Pichia fermentans* (3.1HM), *Clavispora opuntiae* (5.7HE), *Rhodotorula mucilaginosa* (8HM Y 4.7HM) y *Rhodotorula nothofagi* (2HE). De éstas se seleccionaron 3.1HM, 5.7 HE por su tolerancia a etanol (5 %), Azúcar (25 °Brix), SO₂ (30 mg/L) y su actividad β-glucosidasa o efecto *killer*, además de 8HM por tener únicamente actividad β-glucosidasa y efecto *killer*. Posteriormente, estas cepas se evaluaron en ensayos de microvinificación en mosto de la variedad 'Merlot', utilizando como control la levadura N05 (*Saccharomyces cerevisiae*) y la levadura no-S NB108 (*Hanseniaspora uvarum*) obtenida de un trabajo previo. Todas las fermentaciones fueron completas, obteniendo vinos secos con pH de entre 3.65 y 3.75, acidez total titulable entre 7.39 y 7.62 g/L de ácido tartárico, acidez volátil entre 0.19 y 0.45 g/L de ácido acético, grado alcohólico (%v/v) entre 12.97 y 13.98, y rangos de SO₂ total de 117.33 y 130.13 mg/L. Todos estos resultados se encuentran dentro de los valores normales para vinos tintos. En el análisis sensorial (prueba hedónica y prueba de rangos de Kramer), no hubo diferencias significativas entre los tratamientos en ninguno de los aspectos (visual, olfativo, gustativo y aceptabilidad en general). Se concluye que existen levaduras nativas no-S en el viñedo, con cualidades enológicas para ser utilizadas en la producción de vinos tintos.

Palabras clave: RFLP, órganos de vid, especies de levaduras, selección, vino, sensorial.

SUMMARY

Querétaro State, Mexico is considered one of the main wine producers in the country. Wine is the result of fermentation of the grape juice, carried out by different yeast species which appear in a sequential and spontaneous way; transforming sugar into ethanol and CO₂. It is known that yeasts are widespread in nature and distributed on the surface of the vine. However, the predominant yeast species in the different organs of the vine and their oenological qualities have not been investigated in Mexico. The objective of this work was to isolate, identify and evaluate the enological potential of native yeasts from different organs of vines established in Querétaro. The yeast species present in leaves (upper, middle and lower part of the pompano) inflorescences, fruit (immature, veraison and mature) and closed bud were quantified and identified. A total of 93 yeasts of all organs were identified by RFLP technique. The predominant species were *Aureobasidium pullulans* and different species of *Cryptococcus* (*C. magnus*, *C. luteolus*, *C. albidus*, *C. carnescens*, *C. flavescens* and *C. rajasthanensis*). The species which could have enological potential were: *Pichia fermentans* (3.1HM), *Clavispora opuntiae* (5.7HE), *Rhodotorula mucilaginosa* (8HM and 4.7HM) and *Rhodotorula nothofagi* (2HE). The strains 3.1HM, 5.7 HE were chosen for their tolerance to ethanol (5%), sugar (25 ° Brix), SO₂ (30 mg / L) and their activity β glucosidase or *killer* effect. Moreover, 8HM was chosen for having only β glucosidase activity and *killer* effect, these strains were subsequently evaluated in microvinification tests on musts of the variety 'Merlot', using as control the yeast N05 (*Saccharomyces cerevisiae*) and the yeast non-*Saccharomyces* (no-S) NB108 (*Hanseniaspora uvarum*) obtained from a previous work. All the fermentations were complete, obtaining dry wines with pH between 3.65 and 3.75, titratable total acidity between 7.39 and 7.62 g / L of tartaric acid, volatile acidity between 0.19 and 0.45 g / L of acetic acid, alcoholic strength (% v / v) between 12.97 and 13.98, and total SO₂ ranges of 117.33 and 130.13 mg / L. All these values are within the normal considered for red wines. In the sensory analysis (hedonic test and Kramer's rank test), no significant differences between the treatments in any of the aspects (visual, olfactory, gustatory and acceptability in general) were revealed. We conclude that there are native non-S yeasts in the vineyard, with oenological qualities to be used in the production of red wines

Key words: RFLP, vine organs, yeasts species, selection, wine, sensory analysis.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, a quien dedico este trabajo, gracias por darme el amor más incondicional y puro de todos.

A la Universidad Autónoma de Querétaro que me abrió las puertas para realizar mis estudios de maestría, y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología que me apoyó con una beca de estudio.

A mi esposo, Asahel que con su gran paciencia, apoyo y amor ha logrado que culmine este proyecto de la mejor manera.

Al Dr. Peniche, quien con paciencia y entusiasmo me guio durante todo el proceso a pesar de las adversidades que se presentaron.

A Dalia y Alejandro, que compartieron sus conocimientos e ideas para mejorar la calidad de mi trabajo.

A mis padres Fernando y Marisela, por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad y por motivarme para alcanzar mis metas.

A mis hermanos Yarubi, Isabel y Paris que me inspiran a seguirme superando.

A mis suegros Saúl y Coco por su cariño y apoyo.

A todos mis amigos, quienes compartieron su conocimiento, alegrías y tristezas durante estos dos años de trabajo.

No ha sido sencillo el camino, pero gracias a sus aportes, su amor e inmensa bondad, lo complicado de lograr esta meta se ha notado menos. Les agradezco y hago presente mi gran afecto hacia ustedes.

Índice

I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1. La vid	3
2.1.1. Taxonomía.....	3
2.1.2. Anatomía.....	4
2.1.3. Etapas biológicas de la vid.	10
2.1.4. Ciclo anual.....	10
2.1.5. La vid como reservorio de levaduras	13
2.2. El vino	15
2.2.1. Importancia.....	15
2.2.2. Vinificación en tinto	16
2.2.3 Los componentes del vino y sus aportes.....	19
2.2.4. Análisis sensorial del vino	21
2.3. Levaduras	22
2.3.1. Clasificación de las levaduras enológicas.....	22
2.3.2. Sucesión de levaduras durante la fermentación	23
2.3.3. Criterios de selección de levaduras nativas.....	24
2.3.4. Identificación de levaduras	27
OBJETIVOS	28
Objetivo General.....	28
Objetivos específicos	28
III. METODOLOGÍA	29
3.1. Localización del sitio experimental	29
3.2. Material biológico.....	29
3.2.1. Plantas de vid (<i>Vitis vinifera</i>)	29
3.2.2. Levaduras	29
3.3. Cuantificación y recuperación de levaduras.....	30
3.3.1 Recuento de levaduras.....	30
3.3.2 Almacenamiento de levaduras	30
3.4. Identificación de levaduras.....	31
3.4.1. Extracción de ADN	31
3.4.2. Amplificación PCR.....	31

3.4.3. Digestión con enzimas de restricción.....	32
3.5. Selección de las cepas aisladas	32
3.5.1. Actividad β -glucosidasa.....	32
3.5.2. Efecto <i>killer</i>	33
3.5.3. Tolerancia a azúcar, etanol y anhídrido sulfuroso	33
3.6. Ensayos de microvinificación.....	33
3.6.1. Preparación de las levaduras	33
3.6.2. Preparación de los mostos	34
3.6.3. Cinética de crecimiento	34
3.7. Variables físicas y químicas de los vinos.....	34
3.7.1. Potencial hidrógeno (pH).....	34
3.7.2. Sólidos solubles totales	34
3.7.3. Acidez total titulable	35
3.7.4. Grado alcohólico de los vinos (OIV-MA-AS312-01A: R2016).....	35
3.7.5. Acidez volátil	35
3.7.6. Azúcares reductores	36
3.7.7. SO ₂ libre, total y combinado (OIV-MA-AS323-04B: R2009).....	37
3.8. Análisis sensoriales.....	37
3.9. Diseño de los experimentos y análisis de los datos.....	38
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
4.1. Conteo de levaduras en los diferentes órganos de la vid	40
4.2. Identificación de las especies de levaduras	41
4.2.1. Abundancia relativa de las especies según el órgano de muestreo	47
4.3. Pruebas de selección de potencial enológico.....	48
4.3.1. Actividad β glucosidasa	49
4.3.2. Efecto <i>killer</i>	50
4.3.3. Tolerancia a azúcar, SO ₂ y etanol	52
4.4. Pruebas de microvinificación	54
4.4.1. Pérdida de peso.....	55
4.4.1. Cinética de crecimiento de las levaduras	56
4.5. Análisis físicos y químicos de los vinos	61
4.5.1. Potencial de hidrógeno (pH), acidez total titulable (ATT) y acidez volátil (AV) .	61
4.5.2. Grado alcohólico y azúcares reductores	63

4.5.3. SO ₂ total.....	65
4.6. Análisis sensoriales.....	66
4.6.1. Prueba hedónica no estructurada.....	66
4.6.2. Prueba de rangos de Kramer.....	68
V. CONCLUSIONES.....	69
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	72
ANEXOS.....	82

Índice de figuras

Figura		Página
2.1	Yema latente, conteniendo la yema principal, secundaria y terciaria	5
2.2	Hoja de vid	6
2.3	Partes de la flor	7
2.4	Partes del fruto	9
2.5	Ciclo anual de la vid	13
4.1	Producto de la amplificación de la región ITS1/ITS2 del 5.8 S del ribosoma	44
4.2	Análisis de cepas de levaduras con enzimas de restricción	44
4.3	Abundancia relativa (%) de las especies de levaduras no-S encontradas en los diferentes órganos de la vid considerados	48
4.4	Determinación en placa de la actividad β glucosidasa de distintas cepas de levaduras	50
4.5	Ensayo en placa del carácter killer de algunas cepas de levaduras evaluadas	52
4.6	Velocidad de crecimiento \pm desviación estándar bajo diferentes condiciones de estrés. Letras diferentes representan diferencia entre los tratamiento ($p \leq 0.05$)	54
4.7	Porcentaje de pérdida de peso de la fermentación <i>S.cerevisiae</i> y diferentes fermentaciones mixtas de cepas de levaduras no-S y <i>S. cerevisiae</i>	57
4.8	Cinética de crecimiento de N05 durante la fermentación	58
4.9	Comportamiento poblacional de HS durante la fermentación	59
4.10	Comportamiento poblacional de RS durante la fermentación	60
4.11	Comportamiento poblacional de PS durante la fermentación	61
4.12	Comportamiento poblacional de CS durante la fermentación	62

Índice de Tablas

Tabla		Página
2.1	Taxonomía de la vid	3
3.1	Muestreo del material biológico a los largo de los meses	30
4.1	Medias del contenido de levaduras y desviación estándar en inflorescencias, fruto, hojas y yemas obtenidas en los meses de mayo a octubre	41
4.2	Identificación de especies de levaduras por PCR-RFLP	45
4.3	Identificación de especies de levaduras mediante PCR-RFLP y secuenciación	46
4.4	Actividad β glucosidasa de las cepas evaluadas	51
4.5	Efecto <i>killer</i> de las cepas evaluadas	52
4.6	Códigos de las diferentes vinificaciones	56
4.7	Valores de potencial de hidrógeno (pH), acidez total titulable (ATT) y acidez volátil (AC) de vinos de variedad 'Merlot'	63
4.8	Grado alcohólico (% v/v) y azúcares residuales (g/L) de vinos de la variedad 'Merlot' obtenidos con distintas cepas de levaduras	65
4.9	Valores de SO ₂ total (mg/L) obtenidos de vinos de la variedad 'Merlot' en función de la cepa de levadura utilizada	66
4.10	Resultados de la prueba hedónica de vinos de la variedad 'Merlot' elaborados con distintas cepas de levadura	67
4.11	Resultados de la prueba de preferencia de Kramer de los vinos elaborados con distintas cepas de levaduras	69

I. INTRODUCCIÓN

En México, la superficie dedicada al cultivo de la vid para la producción de vino, es de alrededor de 6,000 ha, siendo las principales entidades productoras Baja California, Zacatecas, Coahuila y Querétaro (SAGARPA, 2018). Querétaro cuenta con 310 ha de viñedos ubicados en los municipios de Ezequiel Montes, San Juan del Río, Tequisquiapan, El Marqués y Colón, destinados en su mayoría a la producción de vinos tintos, con variedades como 'Tempranillo', 'Cabernet Sauvignon', 'Merlot', entre otras (SIAP, 2018).

El vino es el producto de la fermentación total o parcial del jugo de uva (OIV, 2017), llevada a cabo de forma espontánea por distintas especies de levaduras que van sucediéndose a medida que avanza el proceso; y que transforman el azúcar en etanol y anhídrido carbónico (CO₂) (Romancino *et al.*, 2008). Además, la actividad de las levaduras es considerada importante para el perfil aromático final de los vinos, ya que éstas son responsables de la formación y liberación de una gran variedad de metabolitos secundarios como ácidos orgánicos, alcoholes, ésteres, polioles, aldehídos, cetonas y compuestos sulfurados (Jolly *et al.*, 2014).

Durante el transcurso de la fermentación, las especies aerobias y débilmente fermentativas de los géneros *Cryptococcus*, *Debaromyces*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula* y *Zygosaccharomyces* declinan rápidamente, debido a los bajos niveles de oxígeno y al incremento en la concentración de etanol. Las levaduras medianamente fermentativas, tales como *Hanseniaspora uvarum* (*Kloeckera apiculata*), *Candida stellata*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Lachancea thermotolerans* y *Torulaspora delbrueckii* pueden proliferar y sobrevivir bien en el medio fermentativo, pero decaen conforme incrementa el etanol en el medio, dejando a *Saccharomyces* spp. dominar y completar el proceso (Varela y Borneman, 2016).

La fermentación del mosto puede ser promovida a partir de las levaduras presentes en los frutos, utilizando levaduras comerciales o a partir de levaduras nativas seleccionadas. Actualmente se reconoce que las cepas

nativas, al estar mejor adaptadas a los mostos de una región, pueden mejorar el perfil sensorial de los vinos, dándoles características distintivas (Romano *et al.*, 2003). En Querétaro, México, Miranda-Castilleja *et al.* (2015) realizó aislamientos de levaduras *Saccharomyces* nativas del mosto de uva y encontró ocho cepas con potencial enológico; a su vez, Ortiz-Barrera *et al.* (2015) aisló y caracterizó levaduras enológicas no-*Saccharomyces*, habiendo detectado ocho cepas pertenecientes al género *Hanseniaspora* con potencial enológico.

A pesar de estos antecedentes, poco se ha investigado en nuestro país sobre las especies de levaduras que se encuentran presentes en los distintos órganos de las vides durante el desarrollo fenológico de la planta. Normalmente, las levaduras nativas enológicas a seleccionar se obtienen a partir de uvas muestreadas en los viñedos o de sus mostos, aunque también se sabe que éstas pueden hallarse de manera natural sobre las yemas, las hojas, las flores, y los frutos en las vides, siendo parte esencial del ecosistema (Barata *et al.*, 2012; Pinto *et al.*, 2014; Gilbert *et al.*, 2014). Las poblaciones de las levaduras en un hábitat están determinadas por diversos factores, como las condiciones climáticas y topográficas del viñedo, el cultivar de vid establecido y las prácticas culturales realizadas en el viñedo (Bokulich *et al.*, 2013).

Adicionalmente, las levaduras que se utilizan para inocular los mostos en la industria vinícola mexicana provienen de importación, lo que representa, no sólo una dependencia tecnológica, sino que los vinos no tengan la tipicidad que pueda hacerlos competitivos en el mercado nacional e internacional.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue aislar, identificar y evaluar el potencial enológico de levaduras nativas obtenidas de diferentes órganos de vides establecidas en Querétaro

II. ANTECEDENTES

2.1. La vid

La vid es un arbusto, sarmentoso y trepador, con hojas alternas en la parte superior (Keller, 2015).

2.1.1. Taxonomía

Se sitúa a la vid en el reino vegetal de las Cormofitas (plantas con raíz, tallo y hoja, autótrofas con clorofila y reproducción sexual además de la vegetativa); Tipo Fanerógamas o Espermatofitas (plantas con flores y semillas); subtipo *Angiospermae* (plantas con semillas encerradas en ovarios); Clase *Dicotiledóneae* (con dos hojas embrionarias en la base de la plántula); Orden Ramnales (plantas leñosas con un solo ciclo, de estambres situados delante de los pétalos); Familia *Vitaceae* (flores con corola de pétalos soldados superiormente y de prefloración valvar, con cáliz poco desarrollado, gineceo generalmente bicarpelar y bilocular, con fruto en baya) y Género *Vitis* (flores exclusivamente dioicas en las especies silvestres, y hermafroditas o unisexuales en las cultivadas (Tabla 2.1) (Hidalgo e Hidalgo, 2011).

Tabla 2.1. Taxonomía de la vid

Reino	<i>Plantae</i>
Agrupación	<i>Cormofitas</i>
Tipo	<i>Fanerógamas</i>
Subtipo	<i>Angiospermas</i>
Clase	<i>Dicotiledóneas</i>
Subclase	<i>Dialipetalas</i>
Orden	<i>Ramnales</i>
Familia	<i>Vitáceas</i>
Género	<i>Vitis</i>
Especie	Varias

La familia *Vitaceae* posee 15 géneros botánicos, entre ellos *Vitis*. Este incluye dos subgéneros que algunos autores consideran como géneros independientes: *Euvitis*, o de la vid verdadera y *Muscadinia*; a su vez, *Euvitis* se encuentra dividido en 11 series, estando *Vitis vinifera* ubicado en la décimo primera (Galet, 1983).

2.1.2. Anatomía

La vid contiene órganos vegetativos y órganos reproductivos o estructuras fructíferas. Los órganos vegetativos incluyen la raíz, el tronco, los brotes, las hojas y los zarcillos; mientras los órganos reproductivos incluyen los racimos con flores o frutos (Keller, 2015).

a) Raíz

El sistema radical provee de soporte físico y es el responsable de tomar el agua y nutrientes necesarios para el crecimiento de la planta, es un órgano de almacenamiento para carbohidratos y otros nutrientes, los cuales realizan el crecimiento inicial de brotes y raíces durante la primavera y son fuente de fitohormonas, principalmente citocininas y ácido abscísico (Keller, 2015).

En la propagación vegetativa de la vid las raíces se originan de las estacas leñosas. La mayoría de éstas, también llamadas raíces adventicias, crecen cerca de los nudos, pero también pueden crecer en los entrenudos (Keller, 2015).

b) Yemas

Las yemas son brotes comprimidos; es decir, que todavía no se alargan; de color verde durante el verano, se vuelven cafés durante la maduración del brote. De hecho, la aparición de las primeras hojas pequeñas es la señal de la formación de la yema y su cambio de color café está asociado con la entrada de las yemas a la latencia. Las yemas de la vid se encuentran siempre axialmente, por lo tanto, surgen axialmente, entre el pámpano y la hoja y directamente encima del punto de inserción del peciolo. Hay tres tipos de yemas: yemas anticipadas, yemas latentes y yemas dormidas (Keller, 2015).

Cada nudo en el sarmiento puede desarrollar cuatro yemas; éste incluye la yema lateral o pronta, posicionada en la zona dorsal del sarmiento, y la yema latente posicionada ventralmente. La yema latente posee típicamente tres yemas en diferentes estados de desarrollo, referidas como yema primaria, secundaria y

terciaria (Figura 2.1). La yema primaria en la axila de la bráctea producida por la yema lateral, las yemas secundarias y terciarias se originan en las axilas de las brácteas producidas por la yema primaria. La yema primaria es la más desarrollada en la yema latente. Usualmente posee muchas hojas, inflorescencias y yemas laterales antes de volverse yema dormida al final de la estación. Las yemas secundarias ocasionalmente son fértiles (contienen racimos), sin embargo las yemas terciarias son típicamente infértiles (Jackson, 2008).

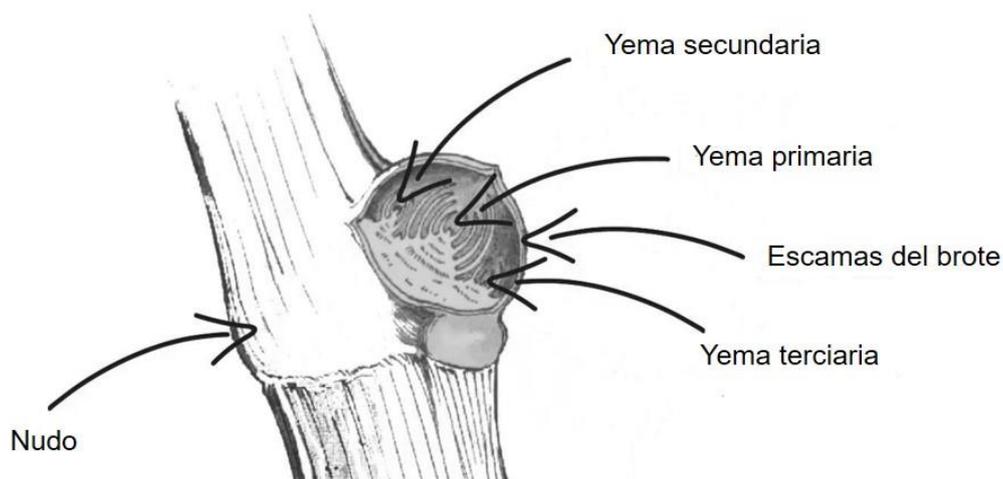


Figura 2.1. Yema latente conteniendo la yema principal, secundaria y terciaria

c) Hojas

Las hojas de la vid son simples y consisten de una lámina y un peciolo. El peciolo es el tallo de la hoja que conecta la lámina con el brote y contiene múltiples haces vasculares. Dependiendo de la especie y el cultivar, el peciolo puede ser de 2 a 12 cm de largo y crece hacia la luz para posicionar a la hoja para una óptima interceptación de la energía solar. En la zona donde el peciolo se une a la hoja, se forma la división de las cinco venas principales de la lámina o limbo, formándose una abscisión en cada extremo del peciolo hacia el final del crecimiento y conduce a la caída de las hojas (Keller, 2015).

La función básica de la lámina es capturar la luz del sol para producir energía (en forma de ATP) y utilizar el dióxido de carbono (CO₂) para la producción de carbohidratos que sustenten el crecimiento y metabolismo de la

vid. Diferentes especies y cultivares de vid difieren en la forma; el estudio de la morfología de la hoja es la base principal de la ampelografía. La forma foliar predominante de género *Vitis* es palmada, en la que los cinco haces vasculares sirven a los cinco lóbulos de la hoja, que en su mayoría están parcialmente separados unos de otros por vacíos más o menos profundos (Keller, 2015). En la Figura 2.3 se ilustra una hoja típica de vid



Figura 2.2. Hojas de vid

d) Zarcillos

Los zarcillos y los racimos de la vid, son considerados homólogos con base en sus similitudes anatómicas, morfológicas y fisiológicas. Estudios en la expresión genética sugieren que los zarcillos son órganos reproductivos modificados. La presencia de giberelinas da como resultado la aparición de zarcillos e impide el desarrollo de la inflorescencia. Por otro lado, las citocininas impiden el desarrollo de zarcillos, pero promueven la formación de inflorescencias (Jackson, 2008; Keller, 2015).

Al igual que las hojas, los zarcillos crecen de manera intercalada. Las puntas del zarcillo buscan objetos del entorno para anclarse y enrollarse durante el crecimiento para fijar al brote en el cual se encuentran insertados, posteriormente todo el zarcillo lignifica y endurece para evitar desenrollamientos (Keller, 2015).

e) Inflorescencias

Las flores de la vid se agrupan como inflorescencias en racimo y su conformación se realiza dentro de las yemas fértiles en el año anterior (Hidalgo, 2003). El racimo está compuesto por el pedúnculo (tallo) que lleva las flores o las bayas. Cada flor o baya está unido al pedúnculo mediante un pedicelo que se ensancha en el receptáculo que lleva la flor o la baya (Keller, 2015). Existen vides silvestres que presentan flores unisexuales, pero la gran mayoría de los cultivares de *V. vinífera* contienen flores hermafroditas. La flor está formada principalmente por las siguientes partes: un pedicelo, conducto provisto de sistemas vasculares por donde viaja la savia y que es necesario para el desarrollo y la madurez de las partes de la flor; un cáliz, una corola de pétalos también llamada caliptra, cinco estambres compuestos por filamentos y anteras dobles que contienen los granos de polen y caedizos después de la fecundación y, finalmente, por un pistilo en forma de botella, cuya cavidad ovárica contiene cuatro óvulos. El cuello del pistilo se llama estilo, terminando en un ensanchamiento o boca llamado estigma, el cual segrega un líquido azucarado espeso (Hidalgo, 2011). En la Figura 2.3 se muestra una inflorescencia de la vid y las diferentes partes que la conforman.

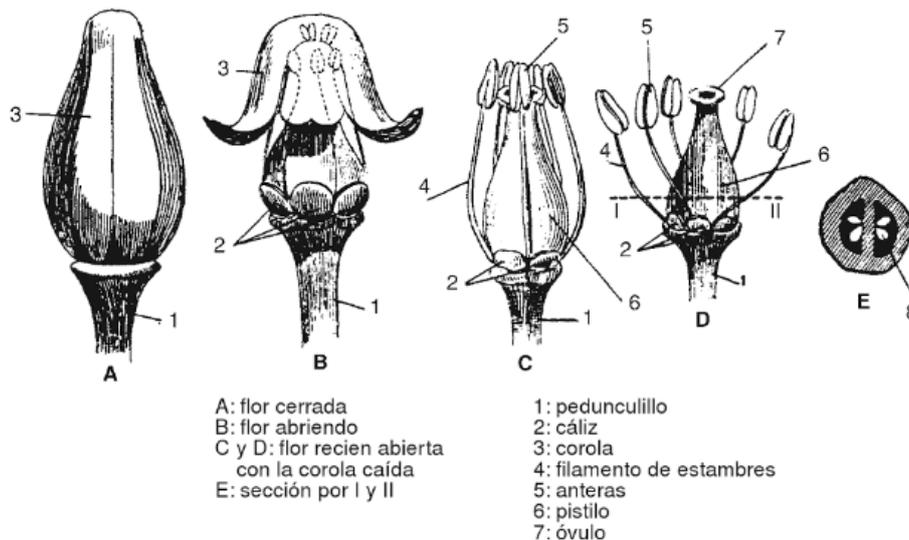


Figura 2.3. Partes de la flor

f) Bayas

El grano de uva procede de la fecundación del pistilo de la flor, mediante el depósito de los granos de polen sobre el estigma, que emiten los correspondientes tubos polínicos y que fecundan los óvulos situados en su interior, provocando la formación de hormonas vegetales (auxinas y giberelinas) que estimulan el crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales de la flor, transformándose la pared del ovario hasta convertirse en la pared del fruto (Hidalgo, 2011).

Los granos de uva se encuentran insertados en el racimo por medio del cabillo o pedicelo, que se ensancha en la zona llamada receptáculo; hacia el interior del fruto continúa un haz de tejidos conductores, cuya fracción que penetra se llama pincel, el cual queda adherido al pedicelo cuando se separa del grano de uva (Hidalgo, 2011).

En la estructura de la uva pueden distinguirse dos partes claramente diferenciadas: las semillas y el pericarpo (Figura 2.5). Las primeras se desarrollan a partir de los óvulos tras su fecundación, mientras que el pericarpo es el resultado del crecimiento y diferenciación de la pared del ovario. En el pericarpo pueden distinguirse tres tipos de tejidos: el endocarpo más interno y con una textura más gelatinosa, el mesocarpo intermedio que ocupa el mayor volumen de la baya y el exocarpo más externo, que contiene la epidermis recubierta por una cutícula cerosa y algunas capas celulares subepidérmicas. Comúnmente, el exocarpo se conoce como hollejo y el mesocarpo junto con el endocarpo forman lo que se denomina la pulpa de la baya (Carbonell y Martínez, 2013).

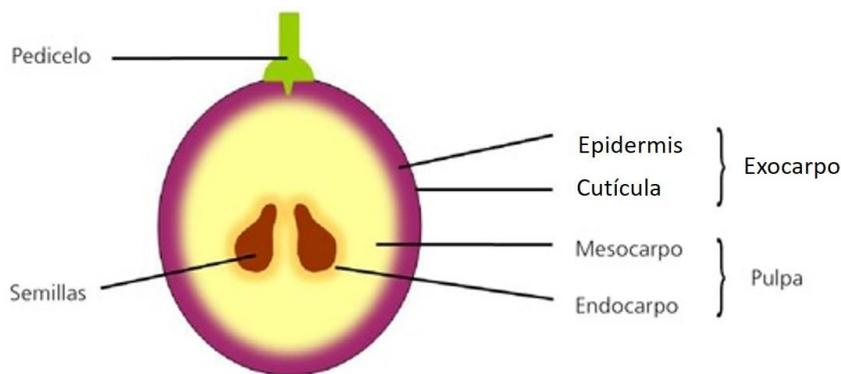


Figura 2.4. Partes del fruto

El exocarpo constituye entre 5 y 18 % del peso fresco de la uva madura. Tiene como objetivo proteger al fruto de la pérdida de agua, y formar la primera barrera contra la invasión de patógenos. Constituye de seis a diez capas de células, sin un límite claro hacia su interior en la zona de transición con la pulpa (Hidalgo, 2011; Keller 2015).

La zona más externa del exocarpo se llama cutícula, siendo una capa de espesor variables según la variedad, desde 1.5 hasta 4.0 micras en vides europeas y de hasta 10.0 micras en vides americanas. La cutícula está recubierta de una capa cerosa llamada pruina, la cual le confiere al racimo un aspecto de color mate y ayuda a que las levaduras se adhieran a la baya; está compuesta en sus dos terceras partes por ácido oleanólico, éste es un factor de crecimiento de las levaduras, razón por la cual se depositan durante la maduración de la uva en esta capa (Hidalgo, 2011).

Después de la cutícula se encuentra la zona conocida como epidermis, que contiene dos capas de células y posteriormente sigue la zona de la hipodermis, con seis a ocho capas de células. En la epidermis se ubica la mayor parte de los polifenoles (antocianos, flavonas y taninos) y las sustancias aromáticas. Antes del envero, la epidermis se comporta como un órgano autónomo clorofilado, con función fotosintética, similar al de las hojas. En el envero pierde la clorofila y aparecen los pigmentos propios de las variedades (Hidalgo, 2011).

Las semillas constituyen los elementos de la vid encargados de perpetuar la especie por vía sexual, desarrollándose desde la fecundación hasta

la fase del envero, momentos en el cual la semilla alcanza su madurez fisiológica. El número máximo de semillas que puede contener un grano de uva es de cuatro.

Las semillas contienen dos compuestos de interés: el aceite compuesto por ácido oleico (13 a 28%) y ácido linoleico (70 a 75%) y los taninos (Hidalgo, 2011).

La pulpa es la parte de mayor volumen del grano de uva, representando de 75 a 85 % de éste. Está formada por una parte externa llamada mesocarpo y una parte interna llamada endocarpio.

La pulpa aporta el agua que constituye entre 80 y 90 % del volumen del vino y componentes mayoritarios como son los azúcares (glucosa y fructosa) y los ácidos orgánicos, fundamentalmente los ácidos málico y tartárico (Carbonell y Martínez, 2013).

2.1.3. Etapas biológicas de la vid.

Desde la plantación de la vid, se distinguen cuatro periodos, correspondiendo el primero al de crecimiento y formación, en el que la planta se desarrolla para adquirir su forma de conducción adulta, sin tener prácticamente producción, y que sensiblemente tiene una duración de tres años. El segundo periodo corresponde al desarrollo de la planta, en que ésta llega a la forma adulta, con producciones crecientes en cantidad y calidad, con duración de siete a diez años. Después sigue el periodo reproductivo, en que se estabiliza la producción, con una duración de alrededor de veinte a treinta años, según los cuidados que se le den. Finalmente, se sitúa el periodo de envejecimiento o senescencia, en el que disminuyen las producciones, aun cuando la calidad sigue un incremento atenuado (Hidalgo e Hidalgo, 2011).

2.1.4. Ciclo anual

a) Lloro

Ocurre al alcanzarse la temperatura adecuada para que el sistema radical inicie su actividad, se observa la presencia de exudado en las heridas producidas por la poda (Lissarrague y Baeza, 2008).

b) Brotación

Las yemas se hinchan, aparece la borra y una coloración verde de la punta, momento denominado desborre.

c) Desarrollo y crecimiento de los pámpanos y las hojas

En un principio, el crecimiento de los pámpanos jóvenes se realiza con las reservas de la planta; más tarde las hojas adultas formadas en la base de los pámpanos exportan nutrientes elaborados por ellas hacia las hojas jóvenes e inflorescencias, para que después del paro del crecimiento, las hojas más jóvenes provean a los racimos y hojas viejas que ocupan la base (Hidalgo, 2003).

La vida de una hoja situada en los racimos pasa por las siguientes etapas (Hidalgo, 2003).

- Fase joven, de dos meses de duración, donde el limbo alcanza el tamaño y grosor definitivo.
- Fase adulta, de otros dos meses de duración, siendo al principio muy activas para luego disminuir. Las hojas cercanas a los racimos pierden mucha actividad en el momento del envero.
- Fase de pre-envejecimiento, de cinco semanas de duración, donde tiene lugar el envero.
- Fase de envejecimiento, de cinco semanas de duración, generalmente posteriores a la vendimia, donde se produce una actividad reducida, terminando con la caída de las hojas.

d) Floración, fecundación y cuajado.

La formación de las inflorescencias se realiza en las yemas latentes del año anterior hacia los meses de junio-julio. Las inflorescencias se manifiestan algunos días después de iniciarse la brotación de las yemas, mostrando una masa de color verde. En una misma cepa no todas las inflorescencias abren simultáneamente, en general, la floración dura de tres a cinco días (Galet, 1983).

Durante la floración, la corola se desprende, los sacos polínicos de los estambres se abren y el polen envuelve a las inflorescencias. Posteriormente ocurre la deposición de gránulos de polen sobre la superficie rugosa del estigma, y gracias al líquido azucarado estigmático que éste segrega, germinan y bajan por el cuello hasta la cavidad ovárica, llegan a los óvulos, realizando su fecundación. Entonces, los óvulos fecundados crecen hasta transformarse en las semillas, y estimulan el desarrollo de las partes del ovario que llega a constituir el grano de uva o baya. A la transformación del ovario en fruto se denomina cuajado o amarre (Hidalgo y Hidalgo, 2011).

e) Desarrollo y maduración de las uvas

El periodo de maduración dura entre 40 y 50 días, la baya incrementa su tamaño y cambia su composición, especialmente en cuanto a azúcares y ácidos orgánicos se refiere (Peynaud, 1986). El desarrollo de las bayas pasa por dos fases: el periodo herbáceo cuya duración es hasta el envero, y el periodo de maduración que va desde el envero hasta la madurez. El envero es la etapa en la cual la baya pierde progresivamente la clorofila y de manera simultánea aparecen los pigmentos que darán la coloración característica de la variedad (Hidalgo e Hidalgo, 2011).

f) Agostamiento del pámpano

Después del cese del crecimiento, la estructura anatómica del pámpano se modifica, apareciendo un color amarillo-marrón que avanza desde la base hasta la extremidad del brote (Hidalgo e Hidalgo, 2011).

g) Caída de la hoja y reposo invernal.

Cuando comienza a decrecer la temperatura, se produce la caída de las hojas. Las hojas amarillean o se tiñen de varios colores, se desecan y caen finalmente, entrando la vid en reposo invernal; etapa en que la vid no presenta actividad vegetativa aparente, debido a la presencia de ácido absícico (Hidalgo e Hidalgo, 2011).

En la Figura 2.5 se representan las etapas del ciclo anual de la vid y su duración a los largo de los meses.

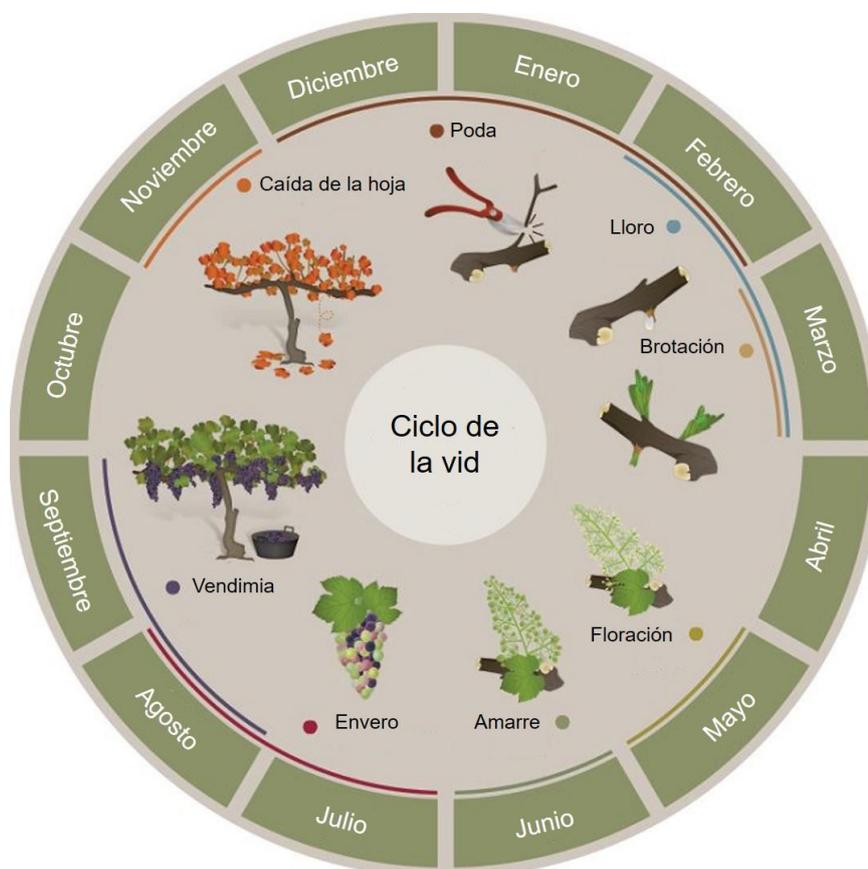


Figura 2.5. Ciclo anual de la vid

2.1.5. La vid como reservorio de levaduras

Las comunidades microbianas en el viñedo, dependen de diversos factores, como lo son la región, el clima, la variedad, entre otros (Bokulich *et al.*, 2013). También se ha observado que existen cepas de levaduras que poseen perfiles metabólicos distintivos, como la producción de enzimas hidrolíticas que dependen del origen geográfico donde se encuentren (Bokulich *et al.*, 2016).

Las diferentes especies de levaduras y bacterias recolectadas de los viñedos y fermentaciones espontáneas tienen un impacto en la composición química del vino. Este impacto también contribuye a la distinción regional sensorial que actualmente juega un papel importante en la diferenciación y

competitividad a nivel mundial. Por lo tanto, los aspectos microbiológicos de la producción del vino están influenciadas por el viñedo, y no únicamente por la bodega y los procesos fermentativos (Belda *et al.*, 2017).

Las levaduras se encuentran en los viñedos distribuidas irregularmente sobre los sarmientos, hojas, racimos y en la superficie de los granos de uva; localizándose sobre todo en los estomas y lugares donde existen microfisuras, que pueden exudar hacia el exterior sustancias azucaradas y sobre la pruina que cubre el resto del hollejo (Bernardi, 2013).

El número de levaduras encontradas en las bayas es limitado, resultando de 2 a 6 Log UFC g⁻¹. Además, la concentración de levaduras depende del estado sanitario de los racimos, de las condiciones climáticas del cultivo y del viñedo y de los tratamientos fitosanitarios aplicados al mismo. En frutos inmaduros se encuentran pocas levaduras (10 a 10³ UFC g⁻¹), pero incrementan sus poblaciones de 10⁴ a 10⁶ UFC g⁻¹, conforme la uva madura y hasta la cosecha (Barata *et al.*, 2012). La principal levadura de vinificación *Sacharomyces cerevisiae* generalmente se encuentra en las bayas en poblaciones menores de 10 a 100 UFC g⁻¹ (Fleet, 2003). Durante la maduración, los azúcares se lixivian o se difunden desde los tejidos internos de la uva hasta la superficie, estimulando así el crecimiento de las levaduras. Uvas inmaduras albergan un predominio de especies de *Rhodotorula*, *Cryptococcus* y *Candida*. La mayoría de estas especies también están aisladas de uvas maduras; sin embargo, en esta etapa predominan los géneros de levaduras apiculadas, tales como *Hanseniaspora (Kloeckera)* y *Metschnikowia*. Las uvas dañadas tienen mayor incidencia de especies de *Hanseniaspora (Kloeckera)*, *Candida* y *Metschnikowia*, así como *Saccharomyces* y *Zygosaccharomyces* (Jolly *et al.*, 2006).

Li *et al.* (2010) cuantificaron e identificaron las poblaciones de levaduras en tres variedades de bayas de vid (Cabernet Sauvignon, Merlot y Chardonnay) utilizando la técnica de Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP, por sus siglas en inglés). Las poblaciones de levaduras se encontraron entre 2-5 Log UFC/mL, siendo en su mayoría especies no-S. Encontraron 17 especies pertenecientes a ocho géneros diferentes, incluyendo *Hanseniaspora uvarum*, *Cryptococcus flavescens*, *Pichia fermentans*, *Candida zemplinina*, *Cryptococcus carnescens*, *Candida inconspicua*,

Zygosaccharomyces fermentati, *Issatchenkia terrícola*, *Candida quercitrusa*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Candida bombi*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Sporidiobulus pararoseus*, *Cryptococcus magnus*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Issatchenkia orientali* y *Pichia guilliermondii*.

Pinto *et al.* (2014) estudiaron el microbioma de las hojas de vid utilizando secuenciación masiva en paralelo de ADNr, encontrando que entre las poblaciones eucariotas, los microorganismos más abundantes pertenecían al linaje de hongos *Ascomycota*, siendo la levadura dimórfica *Aureobasidium* la más dominante, lo cual corresponde con otro estudio reportado previamente (Grube *et al.*, 2011).

Mendes *et al.* (2017) identificaron levaduras de las bayas, hojas y suelo de la vid en tres viñedos diferentes utilizando la secuenciación del dominio D1/D2 y el ITS1/ITS2. Encontraron que los géneros con mayor número de aislados fueron *Hanseniaspora* y *Pichia*. Lograron aislar la especie *S. cerevisiae* en las bayas, hojas y suelo, pero únicamente del viñedo que tenía mayor antigüedad.

2.2. El vino

2.2.1. Importancia

En 2017, la producción mundial del vino alcanzó 250 millones de hectolitros (hL), con una disminución de 23 millones de hL con respecto a 2016, siendo la más baja desde el año 2001. Italia ocupa el primer lugar como productor mundial con 42.5 millones de hL, seguido por Francia con 36.7 y España con 32.1. En América los principales productores son EE.UU. con 23.3, Argentina con 11.8, Chile con 9.5 y Brasil con 3.4 millones de hL. El consumo de vino a nivel mundial en 2017 fue de 243 millones de hL (OIV, 2018).

Hasta 2017, la superficie total a nivel mundial del cultivo de la vid fue de 7.6 millones de ha, en donde cinco países representan 50 % de los viñedos en el mundo. Siendo éstos: España, China, Francia, Italia, Turquía y Estados Unidos. Otros países productores importantes son Argentina, Chile, Portugal, Rumania, entre otros (OIV, 2018).

Según la SAGARPA (2017), México reportó una producción nacional de 351,310 toneladas de uva para distintos usos, con una superficie plantada de 31,419 ha. La principal entidad federativa productora es Sonora, con un volumen

de 266,107 toneladas, primordialmente con uvas de mesa; Zacatecas 43 931 toneladas, tanto de uva de mesa como de vino, seguida de Baja California con 17,891 toneladas. La vid también es cultivada en Chihuahua, Coahuila, Durango, Guanajuato, Querétaro y San Luis Potosí.

En México, la superficie dedicada al cultivo de la vid para la producción de vino es alrededor de 6,474 ha, con una producción total de 64,628 ton. Los principales estados productores son Baja California, Zacatecas, Sonora, Aguascalientes, Coahuila y Querétaro (SIAP, 2018).

En el Estado de Querétaro, situado en la zona centro del país, se distinguen al menos dos regiones vitícolas importantes, una de ellas correspondiente a San Juan del Río; y la otra región situada dentro de los municipios de Tequisquiapan y Ezequiel Montes (De la Cruz- de Aquino *et al.*, 2012). La superficie establecida con viñedos es de 310 ha, dedicada en su mayoría a la producción de vinos tintos (SIAP, 2016).

2.2.2. Vinificación en tinto

El proceso de vinificación es el conjunto de operaciones necesarias para transformar la uva y sus mostos en vino (Peynaud 1986). A continuación se menciona el procedimiento para su obtención.

a) Estrujado

Consiste en romper la piel del grano de uva con la finalidad de liberar la el jugo, sin romper la semilla, ya que ésta posee aceites y taninos que son indeseables para el vino. Como consecuencia del estrujado, obtenemos un jugo más homogéneo, la fermentación es más rápida, las levaduras se multiplican más rápidamente, se facilita la maceración del mosto con la partes sólidas, provocando la disolución de polifenoles en vinos tintos (Hidalgo, 2011); sin embargo también el mosto puede volverse susceptible a la oxidación y contaminación por otros microorganismos (Jackson, 2008).

b) Despalillado

La principal ventaja de esta operación es la reducción del volumen ocupado por el estrujado en un 30 %, debido a la separación de los granos de

uvas del raquis. Además, el despalillado disminuye la astringencia del vino (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

c) Prensado

Operación que consiste en aplastar las uvas cosechadas o el orujo para separar la parte líquida de la sólida. Dependiendo del tipo de vinificación, se realiza antes, durante o después de la fermentación alcohólica (OIV, 2015).

d) Sulfitado.

Es la adición de anhídrido sulfuroso (SO_2) al mosto. Este compuesto es utilizado debido a sus propiedades antisépticas y antioxidantes, dado que se combina fácilmente con el oxígeno. También inhibe a las enzimas tirosinasa y lacasa; adicionalmente su unión con etanal u otros compuestos similares, lo que protege los aromas del vino (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

La adición de SO_2 al vino se expresa siempre en forma anhidra, en mg/L o en g/hL, independientemente de la forma empleada: dióxido de azufre o solución líquida, bisulfito de potasio (KHSO_3) o metabisulfito de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$) (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Según el reglamento de la Unión Europea n°606/2009, los límites legales de contenido total de anhídrido sulfuroso son: 150 mg/L para vinos tintos, 200 mg/L para vinos blancos y rosados, 185 mg/L para vinos espumosos (Hidalgo, 2011).

e) Inoculación de levaduras

Consiste en agregar a la cuba levaduras que han sido elegidas bajo ciertos criterios y que se encuentran en plena actividad, con el fin de que éstas se multipliquen en el mosto y lo fermenten. Para esto, se prepara un cultivo inicial de levaduras denominado pie de cuba. Las levaduras pueden provenir del viñedo o ser de origen comercial como la levadura seca activa (Navarre, 1994).

f) Encubado

El mosto estrujado y normalmente despalillado se trasiega a recipientes que pueden ser de madera, acero inoxidable o cemento. Aquí se comienza la fermentación y se dice que el mosto es encubado (Gil *et al.*, 2009)

g) Maceración

En esta etapa ocurre la liberación de compuestos de las semillas, epicarpio y pulpa al medio líquido después del estrujado. Una maceración corta (menor a 24 horas) produce vinos rosados, mientras que una maceración de dos a tres días es utilizada para vinos tintos. Se ha observado que la maceración mejora la fermentación del jugo y la viabilidad de las levaduras, debido a que libera compuestos nitrogenados y lipídicos al jugo (Jackson, 2008).

h) Fermentación

Durante la fermentación, el orujo se eleva hacia la superficie debido a la liberación de CO₂ provocado por las levaduras, formando lo que se conoce como “sombbrero”; este suceso limita el contacto del orujo con el mosto, retardando la extracción de aromas y color. Para contrarrestar esto, se puede realizar: un remontado que consiste en extraer el mosto de la parte inferior y regar con él la parte superior donde se encuentra el sombrero; o un bazuqueo, donde se sumerge periódicamente el sombrero en el mosto de fermentación; este procedimiento también ayuda a enfriar ligeramente el mosto del tanque. Los vinos tintos generalmente deben ser fermentados a temperaturas de entre 25 y 28°C (Jackson, 2008).

i) Descube

Cuando el enólogo decide terminar la maceración (en función del vino que desee producirse), la cuba es escurrida, y se obtiene por una parte el vino flor o de gota, el cual es ubicado en otro recipiente para completar las fermentaciones, y por el otro lado se recupera el orujo al cual se le realiza hasta dos prensados, obteniendo el vino de prensa (Navarre, 1994).

El vino de prensa carece de cuerpo y color y está dominado por sensaciones astringentes y aromas vegetales. Este vino de calidad inferior puede o no mezclarse con el vino flor. La decisión de mezclarlos no sólo depende

de la calidad del vino flor y del vino prensa, sino también del tipo de vino deseado (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

j) Fermentación maloláctica

Es un proceso posterior a la fermentación alcohólica, en el que se produce la transformación del ácido málico en ácido láctico y gas carbónico, mejorando el sabor del vino, debido a que pierde acidez verde y gana suavidad. Con esta fermentación se produce una desacidificación natural del vino (García, 2008). Es llevada a cabo por bacterias lácticas, siendo la más utilizada *Oenococcus oeni*. Se propicia una disminución de la acidez total de los vinos, ayuda en la evolución organoléptica y confiere estabilidad microbiana al vino (Jackson, 2008).

2.2.3 Los componentes del vino y sus aportes

2.2.3.1. Ácidos orgánicos

Son los que dan el sabor ácido en los vinos. En el vino encontramos principalmente seis ácidos orgánicos, de los cuales tres de ellos proceden de la uva (Gil *et al.*, 2009):

- Tartárico: es el ácido específico de la uva, representa la mitad de los ácidos totales del vino.
- Málico: es el responsable del sabor herbáceo. Es más abundante en las uvas verdes y en el vino aparece en menor proporción que en la uva, pues su presencia está condicionada por la fermentación maloláctica.
- Cítrico: es poco abundante en la uva, su presencia aporta frescura. Su concentración varía entre 0 y 50 mg/L.

Debido a la fermentación y a la acción de bacterias, surgen los otros tres ácidos mayoritarios (Gil *et al.*, 2009):

- Láctico: aporta un sabor agrio y suave. Los niveles en que se encuentran son de 0.2 a 1.2 g/L
- Succínico: se forma debido a la acción de las levaduras y acompaña siempre a la fermentación del azúcar. Es el de mayor sabor, con un gusto

entre lo salado y lo amargo. La producción de ácido succínico depende de la cepa de levadura utilizada, su concentración varía de 0.5 hasta 1.5 g/L.

- Acético: los cinco ácidos mencionados anteriormente representan la acidez fija del vino. El ácido acético representa la acidez volátil debido a que se puede encontrar en el destilado. Su sabor es punzante. Si la acidez volátil presente en todos los vinos, es muy elevada, el vino tendrá una picadura (avinagrará). Se considera que un vino se ha estropeado (“picado”) cuando posee más de 1.4 g/L de ácido acético. La concentración normal en vinos debe ser <400 mg/L (Meunier y Rosier, 2003).

2.2.3.2. Azúcares y alcoholes

Estas sustancias aportan, además del sabor dulce, la sensación de densidad, suavidad y carácter graso (Gil *et al.*, 2009).

Las uvas contienen varios azúcares como la glucosa, fructosa, sacarosa y pentosas entre 15 y 25 % en total. En promedio, las levaduras necesitan alrededor de 17 g de azúcar para producir un grado de alcohol. Durante la fermentación tampoco desaparecen todos los azúcares, quedando una pequeña parte sin fermentar, denominados azúcares residuales (García, 2008).

El alcohol etílico es la sustancia más importante, presenta un sabor dulce para los vinos secos, aunque su exceso produce ardor y amargor. Es la segunda sustancia más abundante en el vino (después del agua) con porcentajes de entre 8 y 14 % (García, 2008).

El glicerol tiene un papel edulcorante similar al de la glucosa e influye en la sensación final de persistencia. Su presencia contribuye a transmitir a los vinos a dar cuerpo, resistencia y redondez (Gil *et al.*, 2009).

2.2.3.3. Compuestos fenólicos

Los taninos son polifenoles que provienen de la parte sólida de la vendimia (hollejo, semillas y escobajo). Éstos son aportados al momento de entrar en contacto con el mosto (maceración) y en crianza, durante el contacto

con la madera. Son cuerpos sólidos de sabor áspero y astringentes, además de fundamentales en el tacto del vino al pasar por la boca (Hills, 2004).

En general, las uvas más maduras aportan taninos más suaves, cuando un vino se presenta áspero se puede intuir que necesita evolucionar en la botella, dado que con el paso del tiempo los taninos se irán suavizando.

También se encuentran los antocianos, que son los responsables del color de los vinos tintos y las flavonas, que aparecen en pequeñas cantidades y se les atribuye el color a los vinos blancos (pigmentos amarillos). Tanto los taninos como los antocianos tienden a precipitarse con el paso del tiempo, produciendo un cambio en el color de los vinos (Gil *et al.*, 2009).

2.2.3.4. Ácidos inorgánicos

Dan el sabor salado en los vinos y dentro de este grupo se encuentran todas las sales de los ácidos minerales y de algunos ácidos orgánicos: fosfatos, sulfatos, cloruros, sulfitos, tartratos, lactatos, entre otros.

Éstos confieren frescura al vino, como es el caso del bitartrato potásico (salado y ácido al mismo tiempo) (García, 2008).

2.2.4. Análisis sensorial del vino

El análisis sensorial, también conocido como cata de vino, consiste en la apreciación del vino por medio de nuestros sentidos; principalmente de la vista, olfato y gusto. El análisis sensorial es un método imprescindible para describir o determinar la calidad o tipicidad de un vino elaborado. La cata o degustación puede realizarse mediante una escala hedónica para determinar la aceptabilidad general o puede hacerse una cata rigurosa en donde se trata de identificar todas las posibles sensaciones (Hidalgo, 2011).

El aspecto visual es la impresión previa del vino. Para apreciar de forma correcta el color del vino, se llena una tercera parte de la copa y se inclina con un ángulo de 45 ° sobre una superficie blanca. En vinos jóvenes al inclinar la copa, observamos un ribete que presenta un tono más claro que el resto del vino,

mientras que en los vinos viejos se observa un degradado de color, evidenciando su evolución (Hidalgo, 2011).

A través del olfato es que se puede percibir el aroma y *bouquet* del vino. Posterior al aspecto visual, se realiza una agitación en círculo rápida del vino, exponiéndolo al contacto con el aire y favoreciendo la liberación de sustancia aromáticas. Posteriormente se lleva la copa a unos centímetros de la nariz (dos o tres veces) (Hidalgo, 2011).

En la fase gustativa se descubre los sabores, dulce, ácido, amargo, salado, la cantidad de alcohol presente, la astringencia y el resabio, es decir, los segundos que queda en la boca la sensación del vino después de ingerirlo o escupirlo (Gil *et al.*, 2009).

2.3. Levaduras

2.3.1. Clasificación de las levaduras enológicas

Las especies de levaduras encontradas en diferentes nichos asociados con el crecimiento de la vid (viñedos) y la producción del vino (mosto y vino) pueden dividirse en dos grupos: las *Saccharomyces* y las no-S (Jolly *et al.*, 2006).

a) Levaduras *Saccharomyces*

Dentro de este género podemos encontrar a: *S. bayanus*, *S. cerevisiae*, *S. oviformis*, y *S. paradoxus* (Hidalgo, 2003).

Las levaduras *Saccharomyces* poseen una alta eficiencia en la conversión de azúcares y toleran una alta concentración de etanol y SO₂, siendo éste el género fermentativo por excelencia (Miranda *et al.*, 2017). Estas levaduras tienen un papel igualmente importante en la formación de metabolitos secundarios. Las levaduras *Saccharomyces* suelen encontrarse presentes en reducidas cantidades en el epicarpio de la uva y en gran número en el equipo de vinificación y en el mosto fermentado (Jolly *et al.*, 2006).

b) Levaduras *no-Saccharomyces*

Las levaduras no-S que se encuentran en el mosto de uva y durante la fermentación se pueden dividir en tres grupos: (1) levaduras que son en gran parte aeróbicas, por ejemplo, *Pichia* spp., *Debaryomyces* spp., *Rhodotorula* spp., *Candida* spp. y *Cryptococcus* spp; (2) levaduras apiculadas con baja actividad fermentativa, por ejemplo, *Hanseniaspora uvarum* (*Kloeckera apiculata*), *Hanseniaspora guilliermondii* (*Kloeckera apis*), *Hanseniaspora occidentalis* (*Kloeckera javanica*); y (3) levaduras con metabolismo fermentativo, por ejemplo, *Kluyveromyces marxianus* (*Candida kefir*), *Torulaspota delbrueckii* (*Candida colliculosa*), *Metschnikowia pulcherrima* (*Candida pulcherrima*) y *Zygosaccharomyces bailii* (Jolly *et al.*, 2014).

Se ha comprobado como algunas especies no-S producen y secretan una mayor cantidad de enzimas en comparación con *S.cerevisiae*: carbohidrolasas (celulasas, hemicelulasas, amilasas, pectinasas), glicosidasas (β -D apiosidasa, α -L-rhamnosidasa, β -D-glucosidasas, β -D-xilosidasa), proteasas lipasas, descarboxilasas, sulfito reductasas, β -glucanasas o esterases. Estas enzimas se liberan al medio periplásmico y al medio fermentativo, donde pueden interaccionar con compuestos de la uva para mejorar la clarificación, filtración y estabilidad de los vinos, estabilizar el color, o liberar compuestos aromáticos activos, contribuyendo de esta manera al aroma fermentativo del vino resultante (Ocón, 2014). Por ejemplo, la producción de glicerol está asociado a *C. stellata*, mientras que *P. anomalla*, *K. apiculata* y *C. pulcherrima* son conocidas por producir ésteres.

2.3.2. Sucesión de levaduras durante la fermentación

La fermentación espontánea del mosto es un proceso complejo que se lleva a cabo mediante la acción secuencial de diferentes géneros y especies de levaduras encontradas en la uva, mosto y vino. Inicialmente, las especies de *Hanseniaspora*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Candida*, *Metschnikowia* y *Cryptococcus* son encontradas en bajas concentraciones en el mosto fresco (Fleet, 2003). De éstas, *Hanseniaspora* (*Kloeckera*) y *Candida* son las más frecuentes, tanto en la fermentación espontánea como en la inoculada (Heard y Fleet, 1986).

Posteriormente la mayoría de las levaduras no-S desaparece durante los primeros días de la fermentación tumultuosa, lo cual puede deberse a su bajo crecimiento e inhibición por la combinación de los efectos del SO₂, bajo pH, alta concentración de etanol y deficiencia de oxígeno (Jolly *et al.*, 2014). Su sensibilidad al etanol limita su crecimiento a los primeros dos a tres días de fermentación, donde la concentración de etanol es superior a 5 % (v / v). Bajo estas condiciones, las cepas de *S. cerevisiae* y especies relacionadas, las cuales son más tolerantes al etanol y más competitivas para el crecimiento en medios con alta concentración de azúcar (Querol *et al.*, 1990), se convierten en las levaduras dominantes y completan el proceso fermentativo (Fleet, 1993).

2.3.3. Criterios de selección de levaduras nativas.

La selección de la cepa adecuada para cada tipo de fermentación es una estrategia muy importante para garantizar tanto una fermentación correcta, como para mejorar las características del vino final, ya que las levaduras pueden producir compuestos que den un toque de distinción al producto obtenido (Torija, 2002).

Algunas de las características deseables en la selección de levaduras para la producción de vinos de calidad son las siguientes:

a) Tolerancia al azúcar

Los carbohidratos son los nutrientes más importantes, ya que son metabolizados por las levaduras para la formación de biomasa, etanol, entre otros que desarrollarán las características sensoriales. Por lo tanto, la tolerancia a la alta concentración de azúcar, es uno de los principales criterios de selección de levaduras, especialmente para aquellos designados por su uso en la elaboración de bebidas licorosas tales como los vinos de 'Sauterna' (Miranda *et al.*, 2017).

b) Tolerancia a etanol

La acumulación de etanol en el ambiente microbiano representa una forma de estrés químico en los organismos que viven allí y varios estudios han

demostrado que la membrana plasmática es el órgano de la célula afectado en tales situaciones (Beaven *et al.*, 1982; Ingram y Buttke, 1984).

El etanol afecta la fluidez de la membrana citoplasmática (Alexandre *et al.*, 1994). Aunque también causa la desnaturalización de las proteínas, afectando varios sistemas de transporte, tales como los procesos de absorción de glucosa y permeasa de aminoácidos (Arroyo-López *et al.*, 2010). La tolerancia a etanol de las levaduras ha sido correlacionada con la capacidad de las células de modificar su capacidad lipídica e interrumpir la acción del etanol (Pina *et al.*, 2004).

c) Tolerancia a SO₂

La microbiota de una fermentación puede ser controlada por el uso de dióxido de azufre (SO₂), que resulta tóxico para la mayoría de las levaduras no-S, mientras que las cepas *Saccharomyces* suelen ser más resistentes a ella (Fleet, 1992; Romano y Suzzi, 1993). La susceptibilidad al sulfito varía ampliamente según el microorganismo del que se trate, se ha encontrado que *K. apiculata* es susceptible a menos de 5 mg/L de SO₂ libre, pero *C. guilliermondii* y *Zygosaccharomyces* spp. resisten diez veces más esa concentración (Romano y Suzzi, 1993). Es deseable que las levaduras sean resistentes a concentraciones superiores a las utilizadas, para que así puedan iniciar la fermentación con mayor rapidez en mostos sulfitados.

d) Efecto killer

La producción de toxinas por algunas levaduras para disminuir el crecimiento de otras levaduras es un fenómeno relativamente común. Estas toxinas de naturaleza proteica se unen a receptores de la pared celular específicos de microorganismos susceptibles, causando canales transmembrana catiónicos que provocan la fuga de iones y, como consecuencia, la muerte de la célula (Magliani, *et al.*, 1997; Marquina *et al.*, 2002).

El fenómeno *killer* en *S. cerevisiae* fue descubierto por Bevan y Makower (1963), quienes clasificaron las cepas de levaduras en tres fenotipos diferentes denominados “*killer*”, “*sensible*” y “*neutro*”. Las cepas “*killer*” son capaces de matar cepas de levaduras “*sensibles*”, mientras que levaduras de fenotipo

“neutro” se muestran indiferentes tanto a la acción de las levaduras *killer* como a la síntesis de la toxina (Somers y Bevan, 1969).

Cuando las levaduras del cultivo iniciador cuentan con el carácter *killer* pueden controlar el crecimiento de levaduras contaminantes durante el inicio de la fermentación. El fenotipo neutro también resulta de interés, pues el tener tolerancia a la toxina, les permite prevalecer en el medio (Somers y Bevan).

e) Actividad β -glucosidasa

Los compuestos terpénicos influyen en el aroma varietal del vino. Estos compuestos se encuentran en forma de glucósidos, que son moléculas compuestas por un glúcido (normalmente un monosacárido) y una aglicona, que en este caso sería el compuesto terpénico en cuestión. Estos compuestos no son volátiles debido a que se disuelven rápidamente en solución acuosa. Sin embargo, al romper el enlace glucosídico que une al azúcar con el terpeno, éste último se volatiliza generando la naturaleza aromática del vino. La capacidad para producir la enzima β glucosidasa y liberar la aglicona volátil es característico de algunas cepas de *Saccharomyces* (Hernández *et al.*, 2003) y ha sido detectada también en levaduras (nS), tales como *Brettanomyces*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniospora (Kloeckera)*, *Hansenula*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces* (Mendes *et al.*, 2001).

f) Producción de glicerol

El glicerol es un componente importante del vino formado como subproducto durante el proceso de fermentación; se encuentra generalmente en cantidades que van de 6 a 14 g/L (Jolly *et al.*, 2014).

El glicerol es sintetizado en el citosol de las levaduras a partir de la fosfodihidroxiacetona, por reducción y desfosforilación de la misma (Wang *et al.*, 2001). La producción de glicerol por algunas levaduras es un aporte adicional a la calidad del vino, transmitiendo viscosidad y un sabor ligeramente dulce (Jackson, 2008).

g) Tolerancia a la presión

Los métodos tradicionales de obtención de vinos espumosos son el método de ‘*Champenoise*’ y el método de ‘*Charmat*’. Ambos métodos incluyen la

primera y segunda fermentación. El método de 'Champenoise' consisten en una segunda fermentación en la botella que ocurre después de la adición del licor de tiraje (sacarosa 20-25 g/L, levaduras, vino y bentonita). Esta segunda fermentación trae como consecuencia la liberación de dióxido de carbono, que aumenta la presión interna en la botella alrededor de 3 a 7 atm (Carrascosa *et al.*, 2011). Por lo tanto, la levadura utilizada para esta segunda fermentación debe tener la capacidad de tolerar la presión que se genera al interior de la botella.

2.3.4. Identificación de levaduras

Avances en la Biología molecular han permitido el desarrollo de nuevas técnicas para la detección, identificación y clasificación de los microorganismos, tales como secuenciación de nueva generación (NGS por sus siglas en inglés), electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE), PCR cuantitativa (qPCR), polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP), entre otras.

El genotipo representado en secuencias de ácidos nucleicos es más estable que el fenotipo, ya que no cambia por la influencia del medio ambiente durante su crecimiento. Sin embargo, las moléculas de ADN están sujetas a mutaciones y rearrreglos en las secuencias que resultan en diferencias (polimorfismos) entre especies estrechamente relacionadas, y aún en cepas de la misma especie. Las levaduras pueden ser caracterizadas con base en diferencias en las secuencias de ADN y ARN (Fernández-Espinar *et al.*, 2006).

Las cuatro técnicas más utilizadas actualmente para identificar levaduras son: a) secuenciación de las regiones ribosomales, siendo la región D1/D2 del gen 26S la más utilizada; b) PCR-RFLP de las regiones ribosomales, principalmente las regiones ITS-5.8S; c) electroforesis en gel con gradiente de desnaturización (PCR-DGGE) que emplea iniciadores universales, y d) la PCR en tiempo real (Segura, 2010).

La técnica de RFLP de las regiones ITS-5.8S se desarrolló como una alternativa de identificación de levaduras de manera rápida para su utilización en la industria. Esta técnica ha sido utilizada por diferentes autores para identificar levaduras aisladas de diferentes fuentes como mostos de vinos (Clemente-Jímenez *et al.*, 2004; Renouf *et al.*, 2006), cidra (Coton, 2006), entre otras.

OBJETIVOS

Objetivo General

Aislar, identificar y evaluar el potencial enológico de levaduras nativas presentes en diferentes órganos de vides establecidas en Querétaro.

Objetivos específicos

- Aislar e identificar diferentes levaduras presentes en diferentes órganos y estados fenológicos de vid.
- Seleccionar las cepas de levaduras aisladas con base a características enológicas deseables.
- Evaluar la calidad de los vinos producidos con las levaduras seleccionadas.

III. METODOLOGÍA

3.1. Localización del sitio experimental

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Fermentaciones y Fisiología de Frutas y Hortalizas de la Universidad Autónoma de Querétaro. El material vegetativo se recolectó de un viñedo establecido en “Los Cues”, municipio de Huimilpan en el estado de Querétaro.

3.2. Material biológico

3.2.1. Plantas de vid (*Vitis vinifera*)

Se utilizaron plantas *Vitis vinifera* cv. ‘Tempranillo’ de seis años de edad injertadas sobre el portainjerto clonal SO4. Las muestras se recolectaron según se muestra en la Tabla 3.1 se muestran los órganos y los meses en que se muestrearon.

Tabla 3.1. Muestreo del material biológico a lo largo de los meses.

órgano	Mes de muestreo					
	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre
Inflorescencias	■					
Fruto en amarre		■				
Fruto en envero			■			
Fruto maduro				■		
Hoja apical		■				
Hoja media		■	■	■	■	■
Hoja basal		■	■	■	■	
Yemas						■

Las muestras se tomaron de manera aleatoria, se colocaron en bolsas de papel y se transportaron al laboratorio.

3.2.2. Levaduras

Se utilizó la cepa comercial *S. cerevisiae* (V-1116) K-1(Lallemand, Ontario, Canadá) y la cepa *S. cerevisiae* (N05) que fue seleccionada a partir de

una fermentación espontánea de mosto de uva de Querétaro. Además, se contó con la cepa de referencia sensible al fenotipo *killer* AH22 (ATCC38626). Como cepas de referencia control de no-S, se utilizaron las cepas *Hanseniaspora uvarum* (NB27 y NB108) seleccionadas a partir de fermentaciones espontáneas de mosto de uva.

3.3. Cuantificación y recuperación de levaduras

Para las hojas y yemas se pesaron 5 g y para las inflorescencias se pesaron 2 g. Se colocaron en el interior de una bolsa de plástico conteniendo 50 mL de diluyente de peptona a 0.1 %. Posteriormente, las muestras se colocaron en un homogenizador Stomacher®, el cual se programó a velocidad alta durante 60 s. Por otra parte, se pesaron 50 bayas de frutos en diferente estado fisiológico, y se colocaron en una bolsa de plástico con 30 mL de diluyente de peptona a 0.1 %, se frotaron vigorosamente durante 3 min, procurando no romperlos. Todas las muestras se colocaron en tubos Falcon y se centrifugaron 4000 rpm durante 10 min para obtener una pastilla de microorganismos. El sobrenadante se decantó hasta dejar un volumen de 1 mL. Este ensayo se hizo por triplicado.

3.3.1 Recuento de levaduras

Posteriormente se realizaron tres diluciones seriadas 1:10, tomando 100 µL de la suspensión de 1 mL mencionada anteriormente y colocándola en tubos que contuvieran 900 µL de diluyente de peptona a 0.1 %. De cada dilución se tomaron 100 µL y se sembraron en medio NYDA mediante extensión en superficie (glucosa 20 g/L; extracto de levadura 10 g/L; caldo nutritivo 20 g/L; agar 20 g/L) suplementado con rosa de bengala (100 mg/L) y cloranfenicol (100 mg/L). Las placas se incubaron a 28 °C por 48 horas.

A partir de los cultivos en medio NYDA se aislaron las morfologías que a simple vista fueran diferentes para cada muestra.

3.3.2 Almacenamiento de levaduras

Las levaduras aisladas se almacenaron en congelación a -20 °C en medio NYDB con 50% de glicerol, hasta su uso.

3.4. Identificación de levaduras

3.4.1. Extracción de ADN

Para cada levadura, se tomó una asada y se resuspendió en un tubo Eppendorf conteniendo 300 μL de TNES (Tris-HCl 200 mM pH 8.5, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS 0.5%), se añadieron tres balines metálicos y se homogenizaron en un disruptor durante 10 min. Se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min. Posteriormente se recuperó el sobrenadante y se resuspendió en una solución de acetato de sodio 3M (ph = 5.2), se agitó suavemente y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min. Pasado este tiempo, se centrifugó nuevamente a 13000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se vació por decantación en 400 μL de isopropanol, se agitó suavemente y dejó reposar durante 5 min a temperatura ambiente. Nuevamente se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min y se eliminó el sobrenadante. Se agregó a la pastilla 200 μL de etanol a 70 % y se agitó durante 5 min en el disruptor. Se centrifugó a 13000 rpm por 10 min y eliminó el sobrenadante. Se permitió que se evaporara el etanol, colocándolo abierto boca abajo, encima de un paño de papel sobre la campana de flujo laminar durante tres horas. Una vez seco, se resuspendió la pastilla en 50 μL de agua miliQ (Crespo-Sempere *et al.*, 2013).

3.4.2. Amplificación PCR

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), 2 μL de ADN a una concentración de 50 ng/ μL de cada levadura se resuspendió en 48 μL de reacción que contenía: 10 μM de iniciadores ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC3'), 2mM de desoxinucleótidos, solución amortiguadora 10X, 2 U DNA polimerasa y agua grado PCR. La PCR se llevó a cabo en un termociclador Veriti™ Thermal Cycler bajo las siguientes condiciones: 95 $^{\circ}\text{C}$ por 2 min; 35 ciclos a 94 $^{\circ}\text{C}$ por 15 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ por 30 s y 72 $^{\circ}\text{C}$ por 30 s y 72 $^{\circ}\text{C}$ por 5 min. Posteriormente, 2 μL de producto de PCR se mezcló con 1 μL de colorante Gelred 10 X y se cargaron en gel de agarosa a 1.3 % y solución amortiguadora TAE 1 X. El gel se corrió a 100 V durante 30 min y se visualizó en luz ultravioleta en un transiluminador.

3.4.3. Digestión con enzimas de restricción

Para cada producto de PCR se distribuyó tres veces 10 μ L (0.1-0.5 μ g de ADN) en tres tubos de PCR. Se agregaron 18 μ L de agua libre de nucleasas y 2 μ L de solución amortiguadora R 10 X. Posteriormente, a un tubo de cada producto de PCR se le agregó 1 μ L de enzima de restricción: HhaI, HaeIII y HinfI. Los tubos se incubaron a 37 °C durante 3 h en un termociclador Veriti™ Thermal Cycler. Cada fragmento de restricción se mezcló con 1 μ L de solución amortiguadora de carga 6X y se cargaron en un gel de agarosa a 3 % con solución amortiguadora TAE 1 X. El gel se corrió a 120 V durante 1 h. Después de la electroforesis, los geles se sumergieron en una solución de bromuro de etidio, se visualizaron en luz ultravioleta y se fotografiaron. El tamaño de los fragmentos de restricción se estimó por comparación con un marcador de peso molecular de 100 pb (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999).

Posteriormente, se agruparon todas aquellas levaduras que tuvieran tanto el mismo tamaño de producto de PCR, así como los mismos patrones de bandeo con las tres enzimas de restricción. El tamaño de dichos fragmentos se comparó con una base de datos conocida (yeast-id.org). Una vez identificadas las levaduras, se seleccionó una cepa representativa del grupo y se envió a secuenciar la región 5.8S-ITS, para así constatar los resultados con la base de datos del GenBank, utilizando la Herramienta Básica de Búsqueda de Alineación Local (BLAST, por sus siglas en inglés).

3.5. Selección de las cepas aisladas

3.5.1. Actividad β -glucosidasa

La determinación de la actividad enzimática β -glucosidasa se llevó a cabo en placas de agar esculina (esculina 1 g/L, cloruro férrico 0.3 g/L, peptona de caseína 1 g/L, extracto de levadura 25 g/L, glicerol 8 mL/L, agar 20 g/L). Se ajustó el pH a 6.0 con HCl. 3 M. Se inocularon cuatro cepas por placa e incubaron a 25 °C durante tres días. Las cepas fueron consideradas positivas si se observó un precipitado de color marrón oscuro alrededor de las colonias (Pérez *et al.*, 2011).

3.5.2. Efecto *killer*

Se preparó un inóculo de la cepa *killer* sensible AH22 (ATCC38626) a una concentración de 1×10^7 UFC/mL en 50 mL de NYDB. Posteriormente, ésta se adicionó en medio NYDA estéril modificado [8 g/L caldo nutritivo, 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L dextrosa, 20 g/L agar, azul de metileno (0.02 %), NaCl (1 %), pH 4.6-4.8 con solución amortiguadora de fosfato-citrato 0.5M]. Se inoculó una gota de 50 μ L de la cepa de levadura a evaluar sobre el medio y se incubaron durante 72 h a 25 °C (Lopes y Sangorrin, 2010). Se consideró como fenotipo *killer*, cuando alrededor de la cepa se observó un halo de inhibición delimitado por un borde azul.

3.5.3. Tolerancia a azúcar, etanol y anhídrido sulfuroso

Se observó la cinética de crecimiento de las levaduras utilizando un analizador turbidimétrico Varioskan. Para ello, se preparó una solución de NYDB ajustado a pH 3.5 con HCl. Posteriormente, se agregó azúcar hasta obtener 25 °Brix y se esterilizó. Para las otras dos pruebas (etanol y anhídrido sulfuroso), se esterilizó primeramente el medio NYDB ajustado a pH de 3.5 y, se adicionó etanol hasta una concentración final del 5 %, y por otra parte, 30 mg/L de SO₂ total. Se inocularon 200 μ L de cada solución en distintos pozos individuales de placas y, sobre éstas, se inocularon las diferentes cepas de levaduras a una concentración de 1×10^5 UFC. Las placas se incubaron a 25 °C durante 48 h y el equipo midió la densidad óptica DO a 600 nm cada 30 min. (Miranda *et al.*, 2017).

Obtenidas las cinéticas de cada cepa, los datos de la fase logarítmica se ajustaron a un modelo lineal. Posteriormente, se determinó el valor de la pendiente, la cual es una medida de la velocidad máxima de desarrollo y fue variables de respuesta para comparar entre cepas (Miranda *et al.*, 2017).

3.6. Ensayos de microvinificación

3.6.1. Preparación de las levaduras

Se estriaron las cepas congeladas en placas con medio NYDA y a partir de ese cultivo en placa, se tomó una asada que se colocó en medio líquido NYDB, el cual se incubó durante 24 h a 28 °C. Pasado este tiempo, se tomaron 100 μ L de cada cultivo y se resuspendieron de forma individual en 10 mL de

medio NYDB. Se incubaron nuevamente 24 h a 48 °C. Posteriormente se estimó la cuenta viable por extensión en superficie sobre agar NYDB (28 °C/48 h).

3.6.2. Preparación de los mostos

Se utilizaron frutos de la variedad 'Merlot', se enjuagaron, y almacenaron en congelación hasta su uso. Los racimos se despallaron y los frutos se estrujaron para obtener el mosto. Alrededor de 0.8 L de mosto se encubó en matraces de 1 L. El mosto se esterilizó mediante termovinificación (60 °C durante 20 min). Después de esto, el mosto se filtró, desechando el orujo y pasó a nuevos matraces de 1 L estériles. Los mostos se inocularon con las cepas nS aisladas a una concentración de 1×10^5 UFC/mL. Pasadas 24 h, todos los mostos se inocularon con la cepa *S. cerevisiae* N05 a una concentración de 1×10^6 UFC/mL.

La fermentación se llevó a cabo a 25 °C, en condiciones de semianaerobiosis. Se midió el peso de los matraces todos los días. Se dio por terminada la fermentación cuando el peso de los matraces se volvió constante.

3.6.3. Cinética de crecimiento

Durante la fermentación se realizó la cuantificación de las levaduras por vaciado en placa en medio NYDA con cloranfenicol a 100 mg/L para las levaduras *Saccharomyces* y medio lisina para las nS. Las cajas se incubaron a 28 °C por 48 h.

3.7. Variables físicas y químicas de los vinos

3.7.1. Potencial hidrógeno (pH)

Se evaluó con un potenciómetro a una temperatura de 25 °C.

3.7.2. Sólidos solubles totales

Se evaluaron por refractometría a una temperatura de 20 °C.

3.7.3. Acidez total titulable

Se realizó por titulación con una solución de NaOH 0.1M previamente valorado con una solución patrón de ftalato ácido de potasio Se tomaron alícuotas de 5 mL de vino y se diluyeron con agua destilada hasta 50 mL. Para eliminar el CO₂, las soluciones se agitaron durante 10 min con ayuda de un magneto. Posteriormente, a cada solución se le midió el pH y se comenzó a titular con la solución de NaOH valorada. La titulación finalizó cuando se alcanzó un pH = 8.2. La acidez se expresó en g/L de ácido tartárico, utilizando la siguiente ecuación:

$$g/L \text{ ác. tartárico} = \frac{(conc. NaOH)(Vgastado)(75)}{alícuota \text{ de vino}}$$

3.7.4. Grado alcohólico de los vinos (OIV-MA-AS312-01A: R2016)

Se determinó mediante destilación directa seguido de análisis de densidad relativa por picnometría. Se midieron 50 mL de vino (libre de CO₂) con ayuda de un matraz aforado y se vertieron en un matraz bola de 125 mL. Se agregaron al matraz 2.5 mL de solución 2 M de Ca(OH)₂ y perlas de ebullición. Se destiló la mezcla hasta alcanzar $\frac{3}{4}$ partes del volumen aproximadamente. El producto recolectado se vació en un matraz volumétrico de 50 mL y al alcanzar los 20 °C se aforó con agua destilada. Se midió la densidad con ayuda de un picnómetro a 20 °C y el grado alcohólico se obtuvo consultando en las tablas de correspondencia de la OIV.

3.7.5. Acidez volátil

Se determinó por el método de García-Tena: en un matraz bola de 25 mL se colocaron 11 mL de la muestra de vino y perlas de ebullición. Se recogieron los primeros 5.1 mL del destilado y enseguida los siguientes 3.2 mL. Ambos destilados se titularon con una solución de NaOH (0.02 N) usando fenolftaleína como indicador hasta el vire a rosa.

El número de mililitros gastados para valorar los 3.2 mL se sustituye en la siguiente ecuación para obtener el valor de acidez volátil real:

$$\text{Acético real (g/L)} = (\text{ml gastados})(0.366)$$

Para determinar la acidez volátil aparente, los mililitros gastados para valorar 5.1 mL se sustituyen en la siguiente ecuación:

$$\text{Acético aparente (g/L)} = (\text{ml gastados})(0.122) + \text{acético real}$$

3.7.6. Azúcares reductores

Primeramente se realizó una valoración del reactivo Fehling-Causse Bonnans (FCB). Para ello, en un matraz Erlenmeyer se colocaron 10 mL del reactivo FCB, 30 mL de agua destilada y tres perlas de ebullición. El matraz se calentó hasta ebullición y se comenzó a agregar desde la bureta una solución patrón de azúcar (1.25 g glucosa anhidra aforada a 250 mL con agua destilada) a una velocidad controlada (dos a tres gotas por segundo). Cuando la coloración azul del reactivo disminuyó de intensidad o alcanzó un tono celeste verdoso, se agregaron dos gotas de azul de metileno a 1 % y se continuó con el agregado de solución patrón más lentamente (una gota por segundo). La primera gota que tornó a amarillo oro, indicó el punto final. Se realizó esta valoración por triplicado.

A 50 mL de vino (libre de CO₂) se le adicionaron 8 mL de solución de acetato de plomo al 25 % y 0.5 g carbón activado y se filtraron con papel filtro Whatman no. 2.

Se llenó la bureta con el vino incoloro y se titularon 10 mL del reactivo FCB del mismo modo en que se procedió para la valoración. La concentración de azúcar se determinó utilizando las siguientes relaciones:

Cálculos:

100 mL azúcar	→	0.5 g dextrosa
mL gastados en la valoración	→	X ₁ (Factor Fehling)
mL gastados en titular el vino	→	X ₁ (Factor Fehling)
100 mL	→	X ₂ *10 = g azúcar/L

3.7.7. SO₂ libre, total y combinado (OIV-MA-AS323-04B: R2009)

Previo al ensayo se preparó una solución de almidón, en donde se mezclaron 0.5 g de almidón en 50 mL de agua en un vaso de precipitados, éste se calentó hasta ebullición agitando continuamente durante 10 min. Posteriormente, se agregaron 20 g de cloruro de sodio, se enfrió y vertió en un matraz aforado de 100 mL.

Para el SO₂ libre, en un matraz Erlenmeyer de 500 mL se agregaron los siguientes reactivos: 50 mL de vino libre de CO₂, 5 mL de solución de almidón, 30 mg de EDTA y 3 mL de H₂SO₄ al 10 %. Inmediatamente, se tituló con una solución de yodo 0.025 M, hasta que persistió un color marrón oscuro. Se consideró a “*n*” como el volumen de la solución de yodo gastados.

Para el SO₂ combinado, a esa misma solución se adicionaron 8 mL de NaOH 4 M, se agitó y dejó reposar durante 5 min. Agitando manualmente se adicionaron 10 mL de H₂SO₄ e inmediatamente se tituló con una solución de yodo 0.025 M. Se consideró *n'* como el volumen de la solución de yodo gastado.

A la misma solución se agregaron 20 mL de NaOH 4 M, se agitó y dejó reposar durante 5 min. Posteriormente, se agregaron 200 mL de agua helada y con constante agitación se agregaron 30 mL de H₂SO₄. Se tituló el SO₂ liberado con solución de yodo 0.025 M. Se consideró *n''* los mL de yodo utilizados

El SO₂ libre expresado en mg/ L está dado por la siguiente ecuación:

$$SO_2 \text{ libre } (mg/L) = 32(n)$$

El SO₂ total expresado en mg/ L está dado por la siguiente fórmula:

$$SO_2 \text{ total } (mg/L) = 32(n + n' + n'')$$

Con la diferencia entre ambos resultados obtenemos el SO₂ combinado.

3.8. Análisis sensoriales

A cada muestra de vino se asignó un código. El análisis sensorial se llevó a cabo en el laboratorio de fermentaciones y fisiología de frutas y hortalizas de la Facultad de Química. Se sirvieron de 25 a 30 mL de cada vino a evaluar en

copas de tipo tulipán y se acomodaron en orden de degustación. Se utilizó una población de 17 panelistas semientrenados.

El análisis consistió de dos pruebas: a) hedónica no estructurada con dos acotaciones, en los extremos “me gusta mucho” y “me disgusta mucho”, evaluando los aspectos visual, olfativo, gustativo y aceptación en general (Anexo 2) y una prueba de Kramer (también llamada de rangos), en donde los panelistas clasificaron las muestras de vino en orden decreciente de preferencia. También se pidió escribir los tipos de aromas que fueran capaces de detectar en las muestras.

3.9. Diseño de los experimentos y análisis de los datos

Se realizó un diseño unifactorial, siendo el factor de estudio las levaduras y las variables de respuesta variaron según el experimento realizado.

Criterios de selección

Variable de respuesta:

- Velocidad máxima de desarrollo

Ensayos de microvinificación:

- Variables de respuesta:
- Densidad
- Grado alcohólico
- Acidez volátil (g/L)
- Azúcares residuales (g/L)
- Acidez total titulable (g/L)
- SO₂ total, libre y combinado (mg/L)

Análisis sensorial

- Variable de respuesta:
- Aceptabilidad del producto

Los datos fueron sometidos a análisis de Varianza de Fisher y prueba de medias de Tukey.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Conteo de levaduras en los diferentes órganos de la vid

Los conteos de levaduras realizados en los distintos órganos se muestran en la Tabla 5.1. Para el fruto en estado de amarre (cuajado) encontramos <1 Log UFC g^{-1} , y para el fruto en envero 3 Log UFC g^{-1} ; se ha reportado que para frutos inmaduros las levaduras se encuentran en cantidades que van de 10 a 10^3 UFC g^{-1} (Fleet, 2003), lo cual coincide sensiblemente con nuestros resultados. Por lo que respecta al bayas maduras, se encontraron conteos de 3.7 Log UFC g^{-1} , valor similar al comúnmente reportado (Barata *et al.*, 2012; Mendes *et al.*, 2017). Cabe señalar que en este trabajo se muestrearon bayas que no presentaron ningún daño físico aparente. Otras investigaciones han reportado que el muestreo de bayas dañadas incrementa la población de levaduras al menos un logaritmo con respecto a las bayas sanas. Esto puede atribuirse a que, en las bayas dañadas, el azúcar proveniente del mesocarpio se encuentra más disponible hacia el medio exterior, y por lo tanto, la población de levaduras aumenta por el consumo de esta sustancia como fuente principal de su metabolismo. Para bayas en estado de posmaduración, incluso con presencia de podredumbre, las poblaciones de levaduras llegan a incrementarse hasta 7 Log UFC g^{-1} (Barata *et al.*, 2008).

Tabla 4.1. Medias del contenido de levaduras y desviación estándar en inflorescencias, fruto, hojas y yemas obtenidas en los meses de mayo a octubre

Mes de muestreo	Inflorescencias	Contenido de Levaduras (UFC g^{-1})						
		Fruto en amarre	Fruto en envero	Fruto maduro	Hoja apical	Hoja media	Hoja basal	Yema
Mayo	2.1 ± 0.44	-	-	-	-	-	-	-
Junio	-	0.80 ± 0.54	-	-	2.7 ± 0.21	2.5 ± 0.19	3.1 ± 0.13	-
Julio	-	-	3.5 ± 0.18	-	-	3.5 ± 0.27	3.7 ± 0.16	-
Agosto	-	-	-	3.7 ± 0.11	-	3.0 ± 0.04	4.0 ± 0.09	-
Septiembre	-	-	-	-	-	3.8 ± 0.19	3.8 ± 0.10	-
Octubre	-	-	-	-	-	5.3 ± 0.13	5.5 ± 0.08	5.0 ± 0.20

Por lo que respecta a las poblaciones de levaduras presentes en las hojas de acuerdo a su posición a lo largo del pámpano, se encontraron ligeramente una mayor población en las hojas basales respecto a las hojas medias y apicales. Esto puede deberse a que las hojas basales son más viejas, teniendo mayor tiempo de exposición en el ambiente del viñedo que el resto de éstas.

Asimismo, se encontró una mayor cantidad de levaduras en las hojas basales y medias en comparación con las inflorescencias y el fruto en sus diferentes etapas, lo cual puede atribuirse a que las hojas son los órganos más abundantes de la planta y, además, tienen una mayor superficie de contacto. Las flores y frutos son órganos que no se encuentran siempre presentes, mientras que las hojas son estructuras que se encuentran de manera más permanente a lo largo del ciclo anual de la planta (Pinto *et al.*, 2014).

Por otra parte, se puede observar una tendencia en el aumento de las poblaciones de levaduras conforme avanzan los meses, llegando en octubre a niveles por encima de 5 Log UFC g⁻¹. Las bajas poblaciones de levaduras encontradas en los primeros meses de muestreo puede deberse a que, durante el desarrollo del fruto, los productores suelen realizar una mayor aplicación de productos agroquímicos, con la finalidad de reducir la incidencia de enfermedades fungosas que produzcan pérdidas en la vendimia, además puede propiciar una merma en las poblaciones de levaduras. Sin embargo, también existen otros factores que pueden provocar fluctuaciones en las poblaciones de levaduras, como lo son las condiciones climáticas y topográficas del viñedo, la variedad de la uva y las prácticas culturales realizadas en el viñedo (Cordero-Bueso *et al.*, 2011; Bokulich *et al.*, 2013).

4.2. Identificación de las especies de levaduras

La técnica de PCR-RFLP que amplifica la región ITS-5.8s descrita por Esteve-Zarzoso *et al.* (1999), ha sido ampliamente utilizada por diferentes equipos de trabajo debido a que es rápida, económica y confiable. Las enzimas que se utilizan para la generación de los fragmentos de restricción son la HhaI (homólogo CfoI), HaeIII y HinfI. El uso de las tres enzimas nos permite

complementar el análisis y realizar una identificación más certera de las levaduras (Segura *et al.*, 2010).

La técnica requiere partir de un ADN de buena calidad. Para verificar su concentración y pureza se utilizó un equipo Nanodrop que nos permitió obtener la concentración de ADN en ng/ μ L y la pureza de las muestras, mediante la relación de absorbancias A260/280 y A260/230. Los ADN puros presentan valores de A260/280 de entre 1.6 y 1.9. Si éste se encuentra contaminado con cantidades significativas de proteínas y lípidos el valor será menor a 1.6, mientras que valores mayores a 1.9 indican una posible contaminación con ARN. A 230 nm se absorben contaminantes, que pudieran quedar residuales a la extracción de ADN. Un ADN se considera puro cuando la relación A260/230 se sitúa entre 1.5 y 2.2 (Williams *et al.*, 2007). Los resultados de la concentración de ADN y pureza de las muestras se encuentran en el Anexo 1.

Para asegurarnos de que se amplificó la región deseada, se realizó una electroforesis en gel de agarosa a 1.2 %, el cual se muestra en la Figura 4.1. Se puede observar que las amplificaciones de la región de interés en las levaduras se encuentran entre 450 y 700 pb, lo cual coincide con la amplificación de varias especies de levaduras no-S (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999; Nisiotou y Nychas, 2007).

Se obtuvo un total de 93 aislados de todos los muestreos y a cada uno se le realizó la extracción de ADN, amplificación en PCR y análisis con enzimas de restricción.

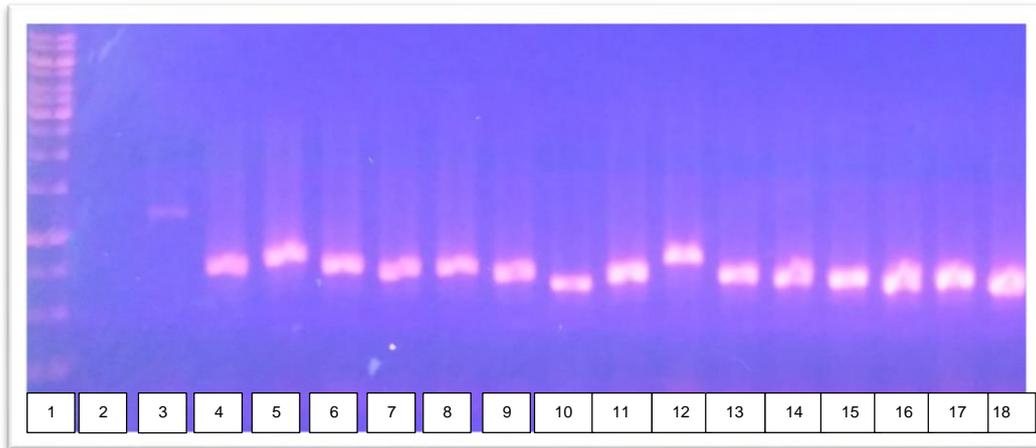


Figura 4.1. Producto de la amplificación de la región ITS1/ITS2 del 5.8S del ribosoma. En los carriles: 1: Marcador de peso molecular (1 kb), 2: Control negativo, 3: Control positivo *S. cerevisiae* (cepa 199), carriles 4-18: Muestras de levaduras de los diferentes órganos de la vid.

En la Figura 4.2 se muestra un ejemplo de cuatro cepas de levaduras y sus patrones de restricción.

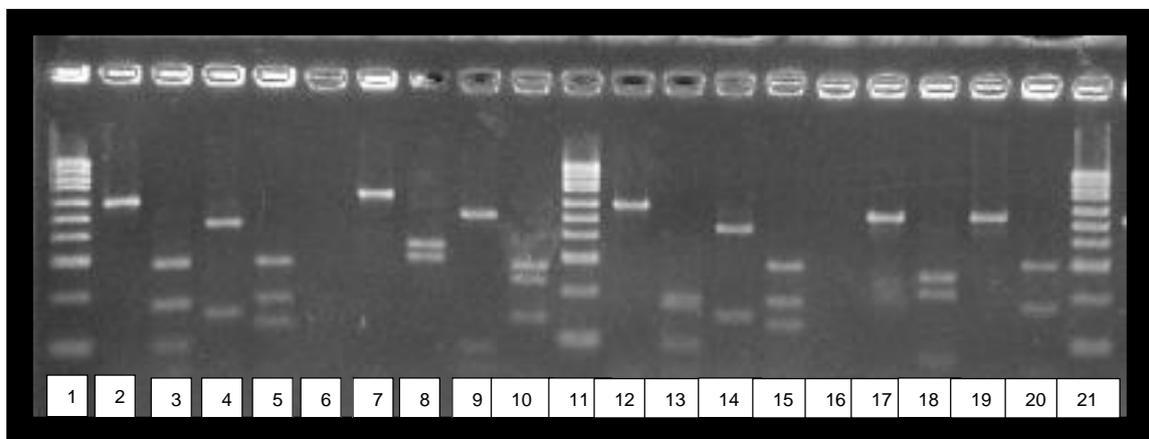


Figura 4.2. Análisis de cepas de levaduras con enzimas de restricción. Carril 1, 11 y 21: Marcador de peso molecular (100 pb). Carril 2, 7, 12 y 17: Producto de PCR de las cepas 3.8HM, 3.1 HE, 3.2HE y 3.3HE respectivamente. Carril 3, 8,13 y 18: Restricción de la enzima HhaI de las cepas 3.8HM, 3.1 HE, 3.2HE y 3.3HE respectivamente. Carril 4, 9, 14, 19: Restricción de la enzima HaeIII de las cepas 3.8HM, 3.1 HE, 3.2HE y 3.3HE respectivamente. Carriles 5, 9, 10 y 20: Restricción de las enzima HinfI de las cepas 3.8HM, 3.1 HE, 3.2HE y 3.3HE respectivamente.

Una vez obtenidos los fragmentos de restricción de los 93 aislados, éstos se agruparon respecto a la similitud de patrones. De este modo, se

obtuvieron 14 patrones de restricción diferentes. Los resultados de la identificación de especies de levaduras se muestran en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Identificación de especies de levaduras por PCR-RFLP.

Número de cepas	Producto de PCR (pb)	HhaI (pb)	HaeIII (Pb)	HinfI (Pb)	Especie de levaduras
33	600	100+180+200	150+450	120+170+280	<i>Aureobasidium pullulans</i>
1	410	180+220	410	190+210	<i>Candida catenulata</i>
15	650	300+350	60+90+500	130+245+275	<i>Cryptococcus magnus</i>
14	490	230+260	490	240+250	<i>Cryptococcus luteolus</i>
7	630	300+330	60+70+500	120+160+350	<i>Cryptococcus albidus</i>
4	630	300+330	60+70+500	280+350	<i>Cryptococcus</i> sp
1	550	260+290	100+375	270+270	<i>Cryptococcus laurentii</i>
1	445	70+90+90+150	80+330	190+250	<i>Pichia fermentans</i>
3	550	100+200+250	50+500	50+250+250	<i>Pichia petersonii</i>
2	625	90+220+300	215+405	70+215+340	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
10	550	200+260	550	180+300	No identificada
1	600	600	80+520	140+220+290	No identificada
1	630	300+350	500	180+320	No identificada
2	600	290+320	110+400	60+110+160+280	No identificada

Mediante la técnica de PCR-RFLP se lograron identificar un total de 10 especies, mientras que cuatro especies no pudieron ser identificadas, debido a que en la base de datos no se encontró ningún patrón de restricción similar.

Para corroborar los resultados obtenidos mediante esta técnica, se secuenció la región 5.8S-ITS de una cepa representativa de cada grupo. Una vez obtenidas las secuencias, se ingresaron al programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del National Center for Biotechnology Information (NCBI), para obtener sus similitudes con las que se encuentran en el GenBank y así poder identificar las cepas a nivel de género y especie. Los resultados obtenidos tanto por PCR-RFLP, como por secuenciación, junto con los valores de cobertura de consulta, valor E e identidad se muestran en la Tabla 4.3. La cobertura de consulta nos indica el porcentaje de alineación de la secuencia ingresada con la base de datos; el valor E, es una medida de la confiabilidad que indica la probabilidad de haya otra alineación con una similitud mayor a la dada, mientras más se acerca a cero este valor, mayor confiabilidad; y el porcentaje

de identidad en la alineación, es el número de bases que coinciden por cada 100 posiciones (Roderick, 2012).

Tabla 4.3. Identificación de las especies de levaduras mediante PCR-RFLP y secuenciación

PCR-RFLP	Secuenciación. GenBank	Cobertura		
		de	e-valor	Identidad
<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	96%	0	99%
<i>Candida catenulata</i>	<i>Clavispora opuntiae</i>	91%	2x10 ⁻¹⁴⁸	96%
<i>Cryptococcus magnus</i>	<i>Cryptococcus magnus</i>	98%	0	100%
<i>Cryptococcus luteolus</i>	<i>Cryptococcus luteolus</i>	99%	0	100%
<i>Cryptococcus albidus</i>	<i>Cryptococcus albidus</i>	100%	0	100%
<i>Cryptococcus</i> sp	<i>Cryptococcus</i> sp	100%	0	99%
<i>Cryptococcus laurentii</i>	<i>Cryptococcus carnescens</i>	100%	0	100%
<i>Pichia fermentans</i>	<i>Pichia fermentans</i>	99%	0	99%
<i>Pichia petersonii</i>	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	100%	0	100%
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	100%	0	100%
No identificada	<i>Cryptococcus flavescens</i>	100%	0	100%
No identificada	<i>Cryptococcus</i> sp	99%	0	99%
No identificada	<i>Cryptococcus</i> sp	100%	0	100%
No identificada	<i>Rhodotorula nothofagi</i>	100%	0	99%

Podemos observar que mediante la técnica de RFLP se identificaron nueve especies de levaduras, cuatro no pudieron ser identificadas y otra se logró identificar sólo a nivel de género. Por secuenciación, se identificaron todas las levaduras, 11 a nivel de especie y una a nivel de género. Por lo tanto, el mayor número de especies identificadas fue por secuenciación, lo cual probablemente se debe a que la base de datos del GenBank es mucho más robusta que el RFLP. Sin embargo, presenta la desventaja de ser más cara y que la identificación demora mucho más tiempo si se envía a secuenciar.

Si hacemos una comparación de ambas técnicas en cuanto a la identificación de especies, encontramos que, tanto en RFLP como en la secuenciación, la identificación de las especies *Aureobasidium pullulans*, *Cryptococcus magnus*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus luteolus*,

Cryptococcus sp, *Pichia fermentans* y *Rhodotorula mucilaginosa* fue la misma, mientras que fue diferente en tres especies: Para RFLP encontramos *Candida intermedia*, *Cryptococcus laurentii* y *Pichia petersonii* y por secuenciación encontramos *Clavispora opuntiae*, *Cryptococcus carnescens* y *Cryptococcus rajasthanensis* respectivamente. Finalmente, aquellas especies que no pudieron ser identificadas por RFLP y sí por secuenciación correspondieron a *Cryptococcus flavescens*, *Rhodotorula nothofagia* y *Cryptococcus* sp. La técnica más confiable de identificación resulta la secuenciación, ya que proporciona todos los pares de bases existentes en la secuencia y hay mayor precisión al momento de buscar la homología en la base de datos (Li *et al.*, 2010).

Resulta interesante señalar que todas las especies identificadas correspondieron a levaduras no-S. La ausencia de especies del género *Saccharomyces* puede atribuirse a diferentes factores. Uno de ellos es que el viñedo donde se realizó el muestreo se encuentra aislado y no cuenta con una bodega enológica, que es el lugar en donde se ha encontrado una mayor dominancia de levaduras de la especie *S. cerevisiae* (Pérez-Martín *et al.*, 2014; Ocón *et al.*, 2010). Se sabe que éstas pueden ser difundidas al viñedo por insectos, por el viento, por el vertido del orujo de uva macerada y por sitios de escorrentía (Valero *et al.*, 2005). Mendes *et al.* (2017) encontraron especies de *S. cerevisiae* en hojas, bayas y suelo, argumentando que la antigüedad del viñedo y la alta actividad en la bodega son factores que pueden influir en la aparición de esta especie en los viñedos. Otro factor al cual atribuimos la ausencia de este género de levaduras, es que la planta de la vid no cuenta con las condiciones óptimas a las cuales desarrollan estas levaduras como es una alta concentración de azúcares. Pinto *et al.* (2014) detectaron la presencia de levaduras *Saccharomyces* a niveles inferiores a 1 %, utilizando medios de cultivo enriquecidos para la recuperación de las levaduras. Otras investigaciones han recuperado levaduras *S. cerevisiae* en uva, cuando ésta se encuentra en estado de posmaduración o podredumbre (Barata *et al.*, 2012).

4.2.1. Abundancia relativa de las especies según el órgano de muestreo

En la Figura 4.3 se muestran los porcentajes de abundancia de las diferentes especies de levaduras encontradas por órgano durante el periodo de mayo a octubre de 2017.

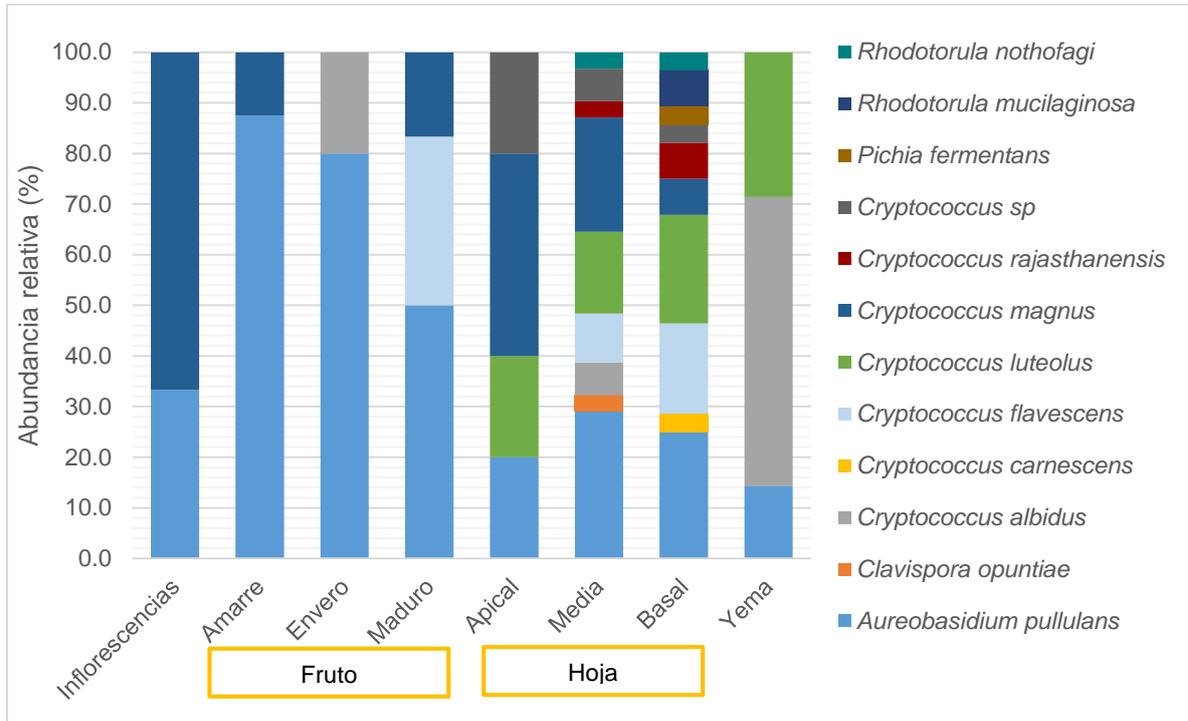


Figura 4.3. Abundancia relativa (%) de las especies de levaduras no-S encontradas en los diferentes órganos de la vid considerados

A. pullulans fue predominante en todos los órganos, encontrando en inflorescencias un porcentaje de 33 %, en fruto en amarre, envero y maduro en 88 %, 80 % y 50 % respectivamente, en las hojas basales, medias y apicales en 25 %, 29 % y 20 % respectivamente, y finalmente en yema en 14 %. Se puede observar que los porcentajes más altos se encontraron en las bayas o frutos. Grube *et al.* (2011) aislaron *A. pullulans* de brotes, hojas y bayas de la vid, encontrando una abundancia de 26 %, 41 % y 18 % respectivamente, dichos autores señalan que ésta es una especie muy abundante en el viñedo. Por su parte, Garijo *et al.* (2011) encontraron una dominancia de *A. pullulans* en el aire del viñedo durante dos años consecutivos de muestreo. *A. pullulans* es conocida como agente de biocontrol contra diversas enfermedades fungosas en diferentes huéspedes (Varela y Borneman, 2016).

Por otro lado, el género *Cryptococcus*, con diferentes especies, se encontró en todos los órganos muestreados. Las especies encontradas en las bayas coinciden parcialmente con lo reportado por Li *et al.* (2010), quienes encontraron en bayas de uvas *Cryptococcus flavescens*, *C. carnescens* y *C. magnus*. Éste género ha sido utilizado como agente de biocontrol contra diferentes enfermedades fungosas (Rong *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018)

Tanto *Aureobasidium* como *Cryptococcus* fueron los principales géneros de levaduras predominantes en el viñedo, pero al ser altamente oxidativas no sobreviven a las condiciones anaerobias del mosto, y mueren rápidamente (Varela y Borneman, 2016). Por lo tanto, consideramos que no presentan un potencial enológico para ser utilizadas en vinificación.

Es importante notar que se encontró una cepa de *Pichia fermentans* en hojas basales. El uso de este género ya se ha reportado en vinificación; en efecto, Benito *et al.* (2015) encontraron que la coinoculación de *S. cerevisiae* con *Pichia Kluyveri* en mosto de uva 'Riesling', produce como resultado una mayor intensidad en los aromas, con notas afrutadas, especialmente a durazno; Ma *et al.* (2017), por su parte, evaluaron la producción de aromas de *P. fermentans* coinoculada con *S.cerevisiae*, encontrando un incremento en la producción acetatos, etil ésteres, ácidos grasos, entre otros. Por lo tanto, ésta fue la cepa que se seleccionó para los posteriores ensayos de vinificación.

Por otro lado, se encontró una cepa de la especie *Clavispora opuntiae* en la hoja intermedia (Figura 5.3). Aunque no se ha reportado nada sobre esta especie y su uso en enología, se ha encontrado *Clavispora lusitaniae* en diferentes bebidas fermentadas como el mezcal y el sotol (Escalante-Minakata *et al.*, 2008; De la Garza-Toledo *et al.*, 2008), por lo que también se decidió evaluarla en vinificación.

Finalmente se encontraron dos cepas de la especie *Rhodotorula mucilaginosa* y dos cepas más de *Rhodotorula nothofagi* en hojas basales. Ya se ha reportado que *R. mucilaginosa* tiene actividad enzimática β glucosidasa, lo que implica la liberación de compuestos volátiles asociados a aromas florales durante la fermentación (Hu *et al.*, 2015). En cuanto a *R. nothofagi*, aunque aparentemente no existe información sobre su uso en fermentaciones, se decidió seleccionarla junto con la primera, ya que pertenecen al mismo género.

4.3. Pruebas de selección de potencial enológico

4.3.1. Actividad β glucosidasa

En las bayas existen terpenos responsables de la producción de aromas distintivos en el vino. Sin embargo, éstos se encuentran químicamente unidos a monosacáridos por medio de enlaces β , formando lo que se conoce como glucósidos no odorantes. La actividad enzimática β glucosidasa es una característica deseable en vinificación, debido a que ésta permite la ruptura del enlace que une al terpeno con el monosacárido, liberando el compuesto volátil (Pérez *et al.*, 2011).

Strauss *et al.* (2001) sugirieron que los análogos de β glucósidos más confiables, eran los derivados de arbutina o esculina. Estos compuestos se incluyen en medios sólidos y si las cepas presentan actividad β glucosidasa, la β glucósido esculina se divide en esculetina (6,7-hidroxycumarina) y glucosa, y luego la esculetina libre reacciona con los iones férricos presentes en el medio, dando como resultado un precipitado de color marrón. En la Figura 4.4 se muestra una placa obtenida para este ensayo, donde puede apreciarse la coloración marrón que indica dicha actividad enzimática en tres de las cuatro cepas evaluadas.

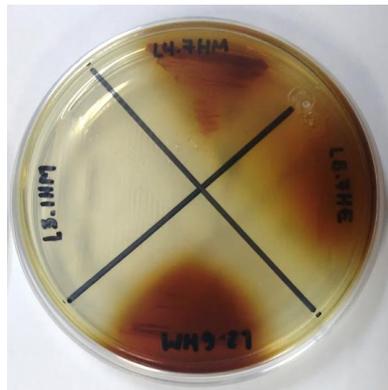


Figura 4.4. Determinación en placa de la actividad β glucosidasa de distintas cepas de levaduras.

En la Tabla 4.4 se muestran los resultados de la actividad enzimática β glucosidasa de las cepas de levaduras evaluadas. Se incluyeron dos controles

positivos de levaduras no-S identificadas como *Hanseniaspora uvarum* (Ortíz-Barrera *et al.*, 2015).

Tabla 4.4. Actividad β Glucosidasa de las cepas evaluadas

Cepa	Especie	β-Glucosidasa
8HM	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	+
4.7HM	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	+
2HE	<i>Rhodotorula nothofagi</i>	+
3.1HM	<i>Pichia fermentans</i>	-
5.7HE	<i>Clavispora opuntiae</i>	+
Control NB108	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	+
Control NB27	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	+

*(+) positiva a la prueba; (-) negativa a la prueba

Todas las cepas evaluadas fueron positivas a esta actividad enzimática a excepción de *P. fermentans* (3.1HM). La actividad de las cepas nativas de *R. mucilaginosa* (8HM y 4.7HM) coinciden con lo reportado por Hu *et al.* (2015), pero no coinciden para 3.1HM con lo reportado por Ma *et al.* (2017) quienes encontraron que la cepa que ellos evaluaron presentaba actividad β glucosidasa.

4.3.2. Efecto *killer*

El efecto *killer* es una característica que presentan algunas levaduras de secretar toxinas glicopeptídicas que son letales para cepas de levaduras susceptibles (Marquina *et al.*, 2002). Las toxinas *killer* difieren entre especies y cepas, en su modo de acción, desde cambiar la permeabilidad de la membrana en células sensibles, hasta inhibir la replicación del ADN o detener la división celular en la fase G₁. Todas las toxinas *killer* generalmente son estables a pH de 4 a 5 y 20 a 25 °C; sin embargo, cada toxina tiene un pH y temperatura óptimos a los que manifiesta su carácter *killer* de manera más efectiva (Miranda *et al.*, 2017). La selección de levaduras con carácter *killer* es importante porque permite que éstas prevalezcan en el medio fermentativo y aseguren la fermentación

(Zargoc *et al.*, 2001). En la Figura 4.5 se muestra el halo de inhibición alrededor de la colonia de las cepas 3.1HM y 4.7HM, lo que la hace poseer efecto *killer*.



Figura 4.5. Ensayo en placa del carácter *killer* de algunas cepas levaduras evaluadas. Se observa un halo de inhibición alrededor de las cepas evaluadas

En la Tabla 4.5 se muestran los resultados del efecto *killer*, de las cepas de levaduras evaluadas. De igual modo se incluyeron dos controles negativos de levaduras *H. uvarum* no-S.

Tabla 4.5. Efecto *killer* de las cepas evaluadas

Cepa	Especie	Killer
8HM	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	+
4.7HM	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	+
2HE	<i>Rhodotorula nothofagi</i>	+
3.1HM	<i>Pichia fermentans</i>	+
5.7HE	<i>Clavispora opuntiae</i>	-
Control NB108	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	-
Control NB27	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	-

*(+) positiva a la prueba; (-) negativa a la prueba

Podemos observar que la cepa de *P. fermentans* (3.1HM) presenta efecto *killer*. Santos y Marquina (2011) reportaron que *Pichia membranifaciens*

presenta efecto *killer* y su toxina tiene un efecto antimicrobiano contra levaduras y hongos filamentosos. Hernández *et al.* (2008) reportan que las especies *Pichia anómala* y *Pichia guilliermondii* presentan efecto *killer*.

Las cepas 8 HM, 4.7HM, 2HE correspondientes al género *Rhodotorula* también presentaron efecto *killer*, mientras que 5.7HE y los controles de NB27 y NB108 no la presentaron. Por lo tanto, el carácter *killer* no está necesariamente asociado a una especie o género.

4.3.3. Tolerancia a azúcar, SO₂ y etanol

Para el ensayo de tolerancias a azúcar (25 °Brix), etanol (5 %) y SO₂ total (30 mg/L) se obtuvieron las cinéticas de crecimiento de las cepas levaduras por medio de un equipo Varioskan. Posteriormente, se calcularon las pendientes de la fase exponencial para cada compuesto probado y los resultados, se muestra en la Figura 4.6. Esta pendiente es una estimación de la velocidad máxima de desarrollo de cada levadura; valores elevados indican que la levadura desarrolla a una velocidad importante en el medio en donde se encuentran estas sustancias de estrés, por lo que se considera que es tolerante al compuesto. (Miranda-Castilleja *et al.*, 2017).

En cuanto a los azúcares, éstos son considerados como la primera condición de estrés a las que se somete una levadura al ser inoculada en el mosto, debido a la presión osmótica que generan. Es así como la tolerancia a altas concentraciones de azúcar es uno de los principales criterios para la selección de levaduras. Las células de levaduras han desarrollado mecanismos para ajustar la alta osmolaridad interna y mantener o reestablecer la fuerza dirigida hacia el interior por el agua. La adaptación a este estrés toma algunas horas en las que las células de levaduras cambian la composición de su pared celular para contrarrestar la pérdida de agua por la presión osmótica (Slaninova *et al.*, 2000).

Las cepas de levaduras que mostraron la mayor tolerancia al azúcar (25 °Brix) fueron 5.7HE y los controles NB27 y NB108, sin haber diferencias significativas entre ellas. Siendo superiores a la cepa de 3.1HM, 8HM, 4.7HM y 2HE.

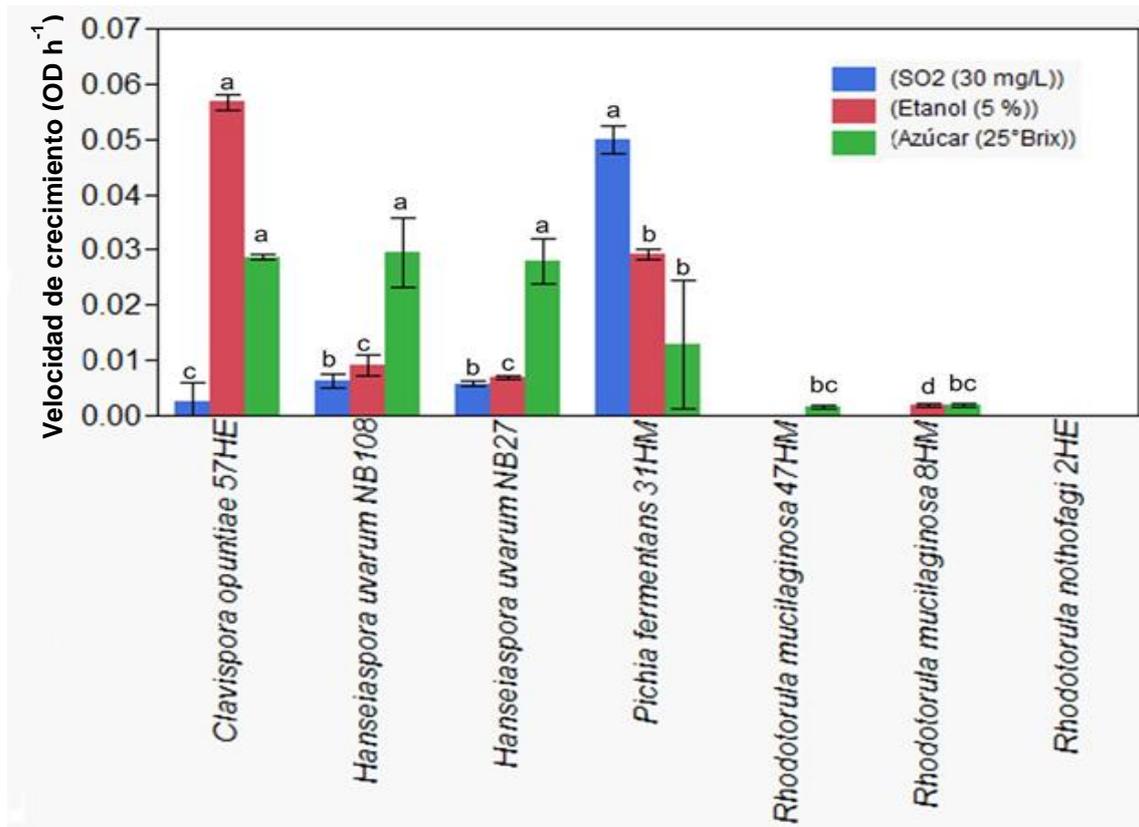


Figura 4.6. Velocidad de crecimiento \pm desviación estándar bajo diferentes condiciones de estrés. Letras diferentes representan diferencia entre los tratamiento ($p \leq 0.05$)

La concentración de SO₂ evaluada corresponde a 30 ppm. En la Figura 5.4 se puede observar que 3.1 HM fue la levadura con mayor crecimiento a esta condición de estrés, siendo estadísticamente diferente a todas las demás, incluyendo los controles, mientras que las tres especies pertenecientes al género *Rhodotorula* no mostraron crecimiento en presencia de este compuesto.

El dióxido de azufre se adiciona al mosto fundamentalmente con la finalidad de inhibir la microbiota silvestre, considerada generalmente como un conjunto de microorganismos deterioradores, siendo principalmente bacterias y algunas especies de levaduras no-S. El uso de este compuesto asegura que la levadura seleccionada predomine sobre las demás. Los mostos se sulfitan a una concentración entre 20 y 50 ppm.

Por lo que respecta al etanol, éste es producido durante la fermentación y reconocido por inhibir el crecimiento de la levadura, por lo que su viabilidad en

presencia de este compuesto constituye un factor importante en la selección de cepas para propósitos de fermentación (Lam *et al.*, 2014).

Para el ensayo de tolerancia a etanol, se utilizó una concentración del 5 % debido a que las levaduras no-S son reconocidas por decaer durante los dos o tres primeros días de la fermentación, debido a su sensibilidad a esas concentraciones de etanol (Ricci *et al.*, 2004). 5.7HE fue la levadura con mayor tolerancia a este compuesto, siendo estadísticamente diferente al resto de las levaduras. Ésta fue seguida por 3.1HM y los controles NB27 y NB108. Finalmente, las diferentes especies de *Rhodotorula* fueron las que menos toleraron el etanol.

De manera general, las levaduras que fueron de una u otra manera tolerantes a las tres condiciones de estrés consideradas en este estudio, fueron: 5.7HE, los controles no-S NB27 y NB108 y 3.1HM. Las cepas 8HM, 4.7HM y 2HE no mostraron tolerancia a ninguna de estas condiciones. Jolly *et al* (2014) reportan que el género *Rhodotorula* son levaduras aeróbicas, que se encuentran en el mosto fresco, y que desaparecen en los primeros estadios de la fermentación debido al efecto combinado del SO₂, bajo pH, alto etanol y deficiencia de oxígeno.

Considerando los resultados de actividad β glucosidasa, efecto *killer* y tolerancia a etanol, SO₂ y azúcar, las cepas que se seleccionaron para los posteriores ensayos de microvinificación, fueron: 1) *C. opuntiae* (5.7 HM), 2) *P. fermentans* (3.1 HM), 3) la cepa *R. mucilaginosa* (8 HM), ya que presenta actividad β glucosidasa y efecto *killer* y 4) la cepa *H. uvarum* NB108, como control.

4.4. Pruebas de microvinificación

Recordemos que para las pruebas de microvinificación se prepararon los mostos, se termovinificaron e inocularon las cepas no-S a evaluar y, pasadas 24 h, dichos mostos fueron inoculados con la levadura N05, correspondiente a *S. cerevisiae*. Como control se estableció la levadura N05 sola, además de una levadura no-S *Hanseniaspora uvarum* en combinación con N05. Cada tratamiento, incluyendo los controles se realizaron por triplicado. De aquí en

adelante, los resultados se expresarán con los códigos que se muestran en la tabla 4.6.

Tabla 4.6. Códigos de las diferentes vinificaciones

Código	Levaduras
N05	Control <i>S. cerevisiae</i>
HS	Control <i>Hanseniaspora uvarum</i> con <i>S. cerevisiae</i>
RS	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> con <i>S. cerevisiae</i>
PS	<i>Pichia fermentans</i> con <i>S. cerevisiae</i>
CS	<i>Clavispora opuntiae</i> con <i>S. cerevisiae</i>

4.4.1. Pérdida de peso

Recordemos que para evaluar el proceso de fermentación, se pesaron diariamente los matraces desde el tiempo cero (inoculación de levaduras no-S), hasta que el peso se volvió constante y no se observó desprendimiento de burbujas, lo que indicó que la fermentación había concluido.

Lamentablemente, a las 72 h de haber inoculado, la fermentación superó el volumen del matraz provocando derrames y por lo tanto, pérdida de peso y volumen. Por lo que, a partir de ese día se empezaron a tomar nuevamente mediciones de los pesos. Para normalizar los datos, se graficó el porcentaje de pérdida de peso a lo largo del tiempo (Figura 4.7)

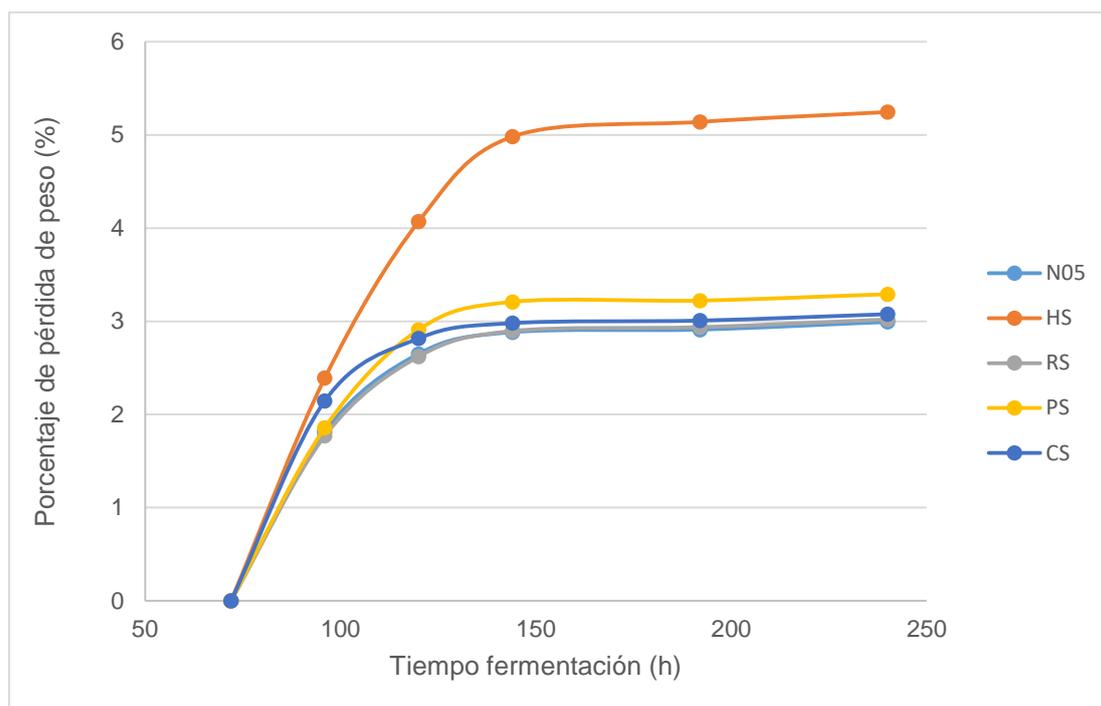


Figura 4.7. Porcentaje de pérdida de peso de la fermentación de *S. cerevisiae* y diferentes fermentaciones mixtas de cepas de levaduras no-S con *S. cerevisiae*

Se observa que HS tuvo el mayor porcentaje de pérdida de peso con respecto a todas las demás fermentaciones. Por lo tanto, *H. uvarum* es una levadura que favorece la fermentación y no afecta a la levadura *S. cerevisiae*.

En cuanto al resto de las fermentaciones, se observa de manera general, un comportamiento homogéneo. De esto se puede concluir que las cepas no-S empleadas no afectan negativamente la fermentación y pueden ser utilizadas en fermentaciones mixtas con *S. cerevisiae*.

4.4.1. Cinética de crecimiento de las levaduras

El medio NYDA nos permitió la cuantificación de las poblaciones de levaduras *Saccharomyces* y no-S, mientras que el medio lisina selectivo se utilizó para cuantificar únicamente levaduras no-S. Sin embargo, al realizar los ensayos en las diferentes vinificaciones, se observó crecimiento en el medio lisina de levaduras *S. cerevisiae*. Esto pudiera deberse a que las levaduras *S.*, aunque no sean capaces de degradar la lisina como fuente de nitrógeno, son capaces de almacenar nitrógeno, utilizándolo durante su desarrollo en el medio. Por lo tanto,

el medio lisina no resultó de utilidad para realizar la cuenta en placa, ya que tuvimos crecimiento tanto de levaduras S como no-S. El medio lisina únicamente es de ayuda para diferenciación de cepas de levaduras, debido a que se realizan tres pases consecutivos para poder diferenciar unas de otras.

Para el control N05 (*S. cerevisiae*), al no haber una inoculación con levadura no-S al tiempo 0, los mostos se dejaron 24 h inactivos y pasado este tiempo, se inocularon con dicha levadura a una concentración de 1×10^6 UFC/mL. En la Figura 4.8 se muestra la cinética de crecimiento de la levadura cepa control N05, donde se puede observar que, a pesar de haber inoculado en el mosto una concentración de 6 Log UFC/mL, al ingresar al mosto la población disminuyó a 4.5 Log UFC/mL. Se observa que el máximo poblacional fue de 9 Log UFC/mL alcanzado a las 96 h Después disminuye su población a 6.5 Log UFC/mL. Miranda-Castilleja *et al.* (2013) en fermentación con Cabernet Sauvignon obtuvo un crecimiento máximo de 8.4 Log de UFC/mL, mientras que para fermentación con la variedad Merlot obtuvo un crecimiento de 8.1 Log UFC/mL, lo cual se acerca mucho a los resultados obtenidos.

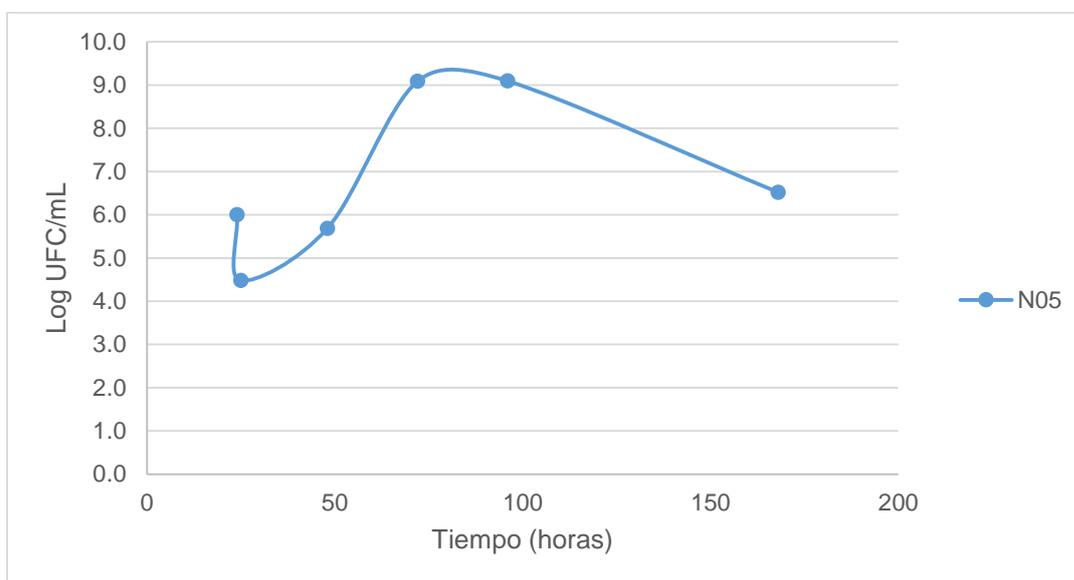


Figura 4.8. Cinética de crecimiento de N05 (*S. cerevisiae*) durante la fermentación

En cuanto al control HS, no se pudo obtener la cinética de crecimiento individualmente para cada levadura (*H. uvarum* y *S.cerevisiae*), ya que como se

mencionó anteriormente, *S. cerevisiae* también creció en el medio lisina, contando únicamente con las placas en medio NYDA. Sin embargo, ambas morfologías son indistinguibles en este medio, por lo que en la Figura 4.9 se muestra la cinética de crecimiento de ambas levaduras. Se puede observar que no hubo una disminución en la población de las levaduras al momento de ingresar al mosto. Pero a las 72 y 96 h se muestra una concentración máxima de 9 log UFC/mL, la cual posteriormente decrece. Este comportamiento coincide con el control N05, sin embargo, con las técnicas empleadas no podemos determinar si este crecimiento se debe *S. cerevisiae* o *H. uvarum*.

A pesar de que no se pudo detectar el comportamiento de *H. uvarum* durante la vinificación, se tomó la placa sembrada a las 72 h, y se seleccionaron al azar seis colonias, las cuales se estriaron en medio lisina durante tres pases consecutivos. Se observó que tres cepas crecieron después de los pases, indicando que a ese tiempo, todavía había presencia de levaduras *H. uvarum*. A pesar de que no se pudo cuantificar, se sabe que pasadas 72 h de la vinificación, todavía había presencia de esta levadura en el medio fermentativo.

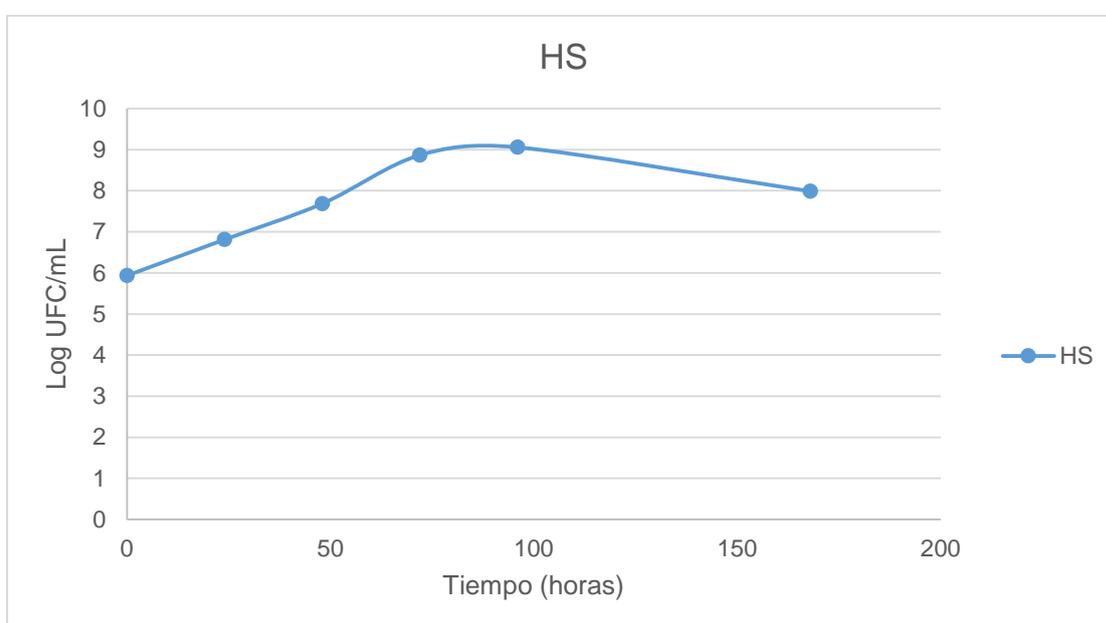


Figura 4.9. Comportamiento poblacional de HS (*Hanseniaspora uvarum* y *S. cerevisiae*) durante la fermentación

Para el tratamiento RS (*Rhodotorula mucilaginosa* y *S. cerevisiae*), la primera pudo diferenciarse de *S. cerevisiae* en medio NYDA, debido a que, mientras *R. mucilaginosa* es una colonia color salmón, *S. cerevisiae* es una colonia color blanco.

En la Figura 4.10 se presenta la cinética de crecimiento para ambas levaduras. Se puede observar que *R. mucilaginosa* redujo su población a 1 Log UFC/mL después de haber sido inoculada en el mosto, y después de 24 h ya no fue detectada en el medio, por lo que puede considerarse que esta levadura no se adapta a las condiciones del mosto (azúcar, SO₂, pH y deficiencia de oxígeno). Esto coincide a lo evaluado en los ensayos de tolerancia, debido a que en los resultados se mostró que *R. mucilaginosa* no mostró tolerancia al sulfitado ni a la concentración de azúcares. Por otra parte, *S. cerevisiae* se adaptó después de 48 h de haberse inoculado, llegando a un máximo de 9 Log UFC/mL después de 72 y 96 h. Se puede observar que el comportamiento de *S. cerevisiae* se asemeja con el control N05.



Figura 4.10. Comportamiento poblacional de RS (*Rhodotorula mucilaginosa* y *S. cerevisiae*) durante la fermentación

Para el tratamiento PS (*Pichia fermentans* y *S. cerevisiae*), la levadura *P. fermentans* también pudo diferenciarse en medio NYDA de *S. cerevisiae*, debido a que presenta una morfología colonial diferente a *S. cerevisiae*. Mientras *P. fermentans* es una colonia rugosa, *S. cerevisiae* es lisa. En la Figura 4.11 se muestra la cinética de crecimiento de ambas levaduras.

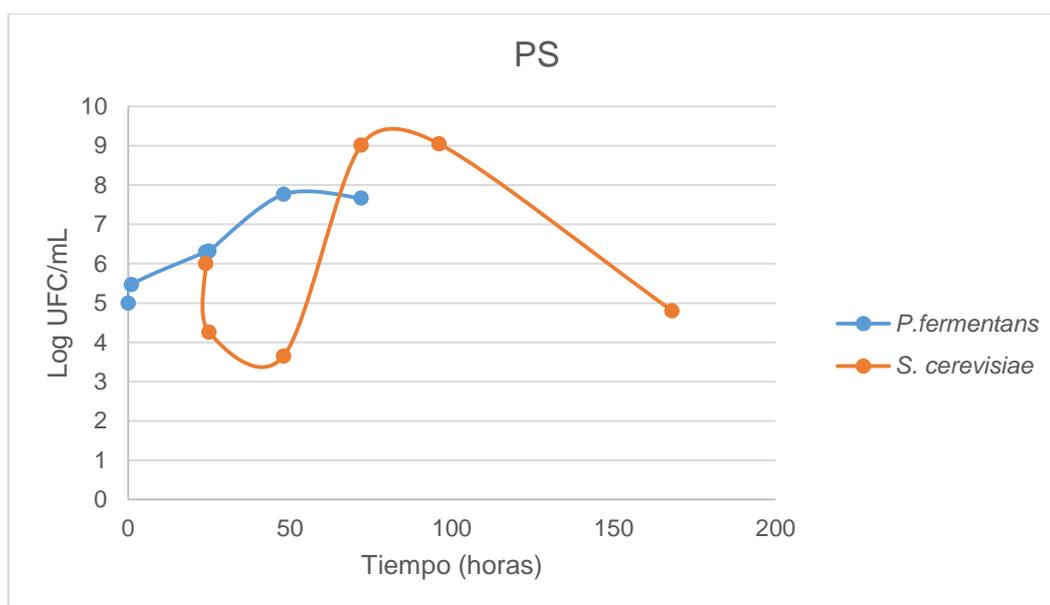


Figura 4.11. Comportamiento poblacional de PS (*Pichia fermentans* y *S. cerevisiae*) durante la fermentación

El ingreso de *P. fermentans* en el mosto no mostró una disminución en la población, esto quiere decir que rápidamente se adaptó al medio, mientras que la población de *S. cerevisiae* al ingresar al mosto, disminuyó su número a 3 Log UFC/mL, recuperándose y multiplicándose activamente hasta las 72 h, en donde alcanzó su mayor población con 9 Log UFC/mL. Nuevamente, el comportamiento de *S. cerevisiae* se asemeja al control N05. Sin embargo, el comportamiento de *P. fermentans* difiere con *R. mucilaginosa*. Debido a que *P. fermentans* se logró adaptar a las condiciones del mosto y detectarla hasta las 72 h, mientras *R. mucilaginosa* decayó su población a las 24 h.

Finalmente, por lo que respecta a CS (*Clavispora opuntiae* y *S. cerevisiae*), tampoco se pudo obtener la cinética de crecimiento de manera

individual para cada levadura, y únicamente se muestra el crecimiento poblacional de ambas (Figura 4.12). Nuevamente a las 72 y 96 h se muestra una concentración máxima de 9 log, la cual posteriormente decrece.

Al igual que con el tratamiento control HS, se seleccionaron al azar seis morfotipos de la placa a las 72 h, estriándolas en medio lisina durante tres pases seguidos. Se observó el crecimiento de dos morfologías, lo que indica que todavía a las 72 h, encontramos levaduras *Clavispora opuntiae*. Este comportamiento es muy parecido al control HS.

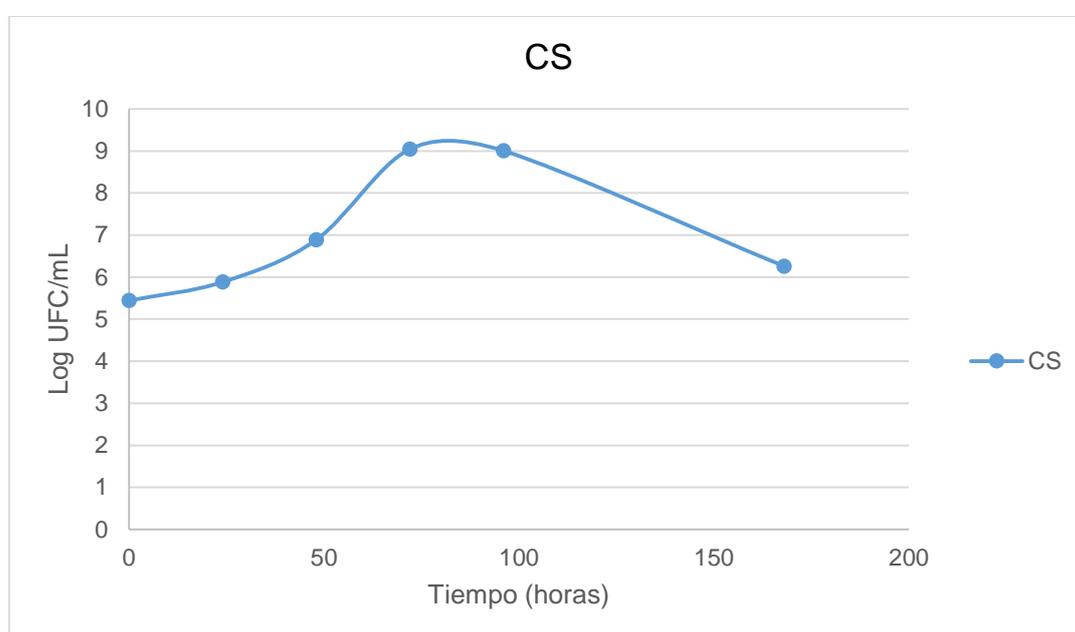


Figura 4.12. Comportamiento poblacional de CS (*Clavispora opuntiae* y *S. cerevisiae*) durante la fermentación

4.5. Análisis físicos y químicos de los vinos

4.5.1. Potencial de hidrógeno (pH), acidez total titulable (ATT) y acidez volátil (AV)

Los ácidos que tienen un efecto sobre el pH en el vino son el ác. tartárico, el ác. málico y el ác. láctico, siendo el primero el que libera la mayor concentración de iones hidronio, debido a que se encuentra en mayor proporción respecto a los demás. El rango de pH para la mayoría de los vinos tintos es entre 3.3 y 3.6 (Jackson, 2008).

Los vinos obtenidos a partir de la inoculación del mosto con las cepas no-S mostraron diferencias significativas en los valores de pH (Tabla 4.7). El valor más alto de pH lo tuvieron los controles, encontrándose por arriba de 3.7, mientras que los demás tratamientos se encontraron por debajo de éste. Esto pudiera deberse a que las levaduras durante la fermentación producen ácido succínico, siendo algunas cepas capaces de producir más que otras y viendo su influencia en el pH.

Tabla 4.7. Valores de potencial de hidrógeno (pH), acidez total titulable (ATT) y acidez volátil (AV) de vinos de la variedad 'Merlot'

Muestra	pH	ATT (g/L ác. tartárico)	AV (g/L ác. acético)
N05	3.72 ± 0.02 ^{ab}	7.44 ± 0.20 ^a	0.19 ± 0.05 ^b
HS	3.75 ± 0.01 ^a	7.59 ± 0.07 ^a	0.45 ± 0.03 ^a
RS	3.67 ± 0.02 ^{bc}	7.39 ± 0.11 ^a	0.22 ± 0.03 ^b
PS	3.66 ± 0.01 ^c	7.59 ± 0.11 ^a	0.27 ± 0.02 ^b
CS	3.65 ± 0.04 ^c	7.62 ± 0.15 ^a	0.25 ± 0.02 ^b

Se muestran los promedios de tres repeticiones y las desviaciones estándar. Prueba de medias de Tukey ($p \leq 0.05$). Medias con la misma letra son estadísticamente iguales. N05= control de levadura *S.cerevisiae*, HS= control fermentación mixta de *H. uvarum* con *S. cerevisiae*, RS= fermentación mixta de *R. mucilaginosa* con *S.cerevisiae*, PS= fermentación mixta de *P. fermentans* con *S.cerevisiae*, CS= fermentación mixta de *C. opuntiae* con *S. cerevisiae*.

El conjunto de todos los ácidos se expresa como acidez total titulable (Gil *et al.*, 2009). La acidez total titulable en términos de ácido tartárico deseable para vinos se encuentre en un rango que va de 5.5 a 8.5 g/L, en donde para vinos blancos se prefieren valores altos de acidez, mientras que para vinos tintos se prefieren valores bajos (Jackson, 2008).

Los valores obtenidos para la ATT oscilaron entre 7.39 g/L y 7.62 g/L. Los tratamientos evaluados no mostraron diferencias significativas entre ellos. Estos valores se encuentran dentro de los valores normales para vinos tintos (Jackson, 2008).

Lo que respecta a la acidez volátil, según la OIV (OIV Code Sheet – Issue 2015/01) el límite máximo permitido en un vino es de 1.2 g/L de ácido acético. Todos los tratamientos evaluados en este estudio obtuvieron valores por debajo del límite máximo permitido, encontrándose en el rango ideal desde 0.13 g/L hasta 0.33 g/L de ácido acético. Meunier y Rosier (2003) señalan que la concentración de acidez volátil ideal en los vinos debe ser <0.4 g/L de ácido acético, lo cual coincide con los valores obtenidos.

Podemos observar que el control HS fue estadísticamente diferente a todos los demás, obteniendo el valor de acidez volátil más alto (0.45 g/L). Jolly *et al.* (2014) reportan que distintas especies de *Hanseniaspora* (levaduras apiculadas) son productoras de ácido acético y etil acetato en concentraciones elevadas, haciéndoles menos atractivas para vinificaciones. Ortiz *et al.* (2015) realizaron fermentaciones mixtas de *S. cerevisiae* con diferentes cepas de *Hanseniaspora*, encontrando valores ≤ 0.2 g/L de ácido acético, lo cual difiere de nuestros resultados.

4.5.2. Grado alcohólico y azúcares reductores

El contenido de alcohol obtenido en los distintos tratamientos se muestra en la Tabla 4.8. No se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre todos los tratamientos, lo que indica que las levaduras no-S no representan un impedimento para que la levadura *Saccharomyces* realice de forma eficiente la transformación de azúcares a etanol, pudiendo ser utilizadas en vinificación. Las fermentaciones HS, PS y CS presentan una concentración ligeramente mayor de etanol, probablemente se deba a que las cepa de levaduras no-S probadas pudieron haber producido algo de este compuesto.

Tabla 4.8. Grado alcohólico (% v/v) y azúcares residuales (g/L) de vinos de la variedad ‘Merlot’ obtenidos con distintas cepas de levaduras

Muestra	Grado alcohólico (% v/v)	Azúcares residuales (g/L)
N05	13.16 ± 0.18 ^a	1.64 ± 0.11 ^a
HS	13.98 ± 0.81 ^a	1.71 ± 0.10 ^a
RS	12.97 ± 1.6 ^a	1.85 ± 0.02 ^a
PS	13.63 ± 0.47 ^a	1.69 ± 0.17 ^a
CS	13.75 ± 0.62 ^a	1.66 ± 0.13 ^a

Se muestran los promedios de tres repeticiones y las desviaciones estándar. Prueba de medias de Tukey ($p \leq 0.05$). Letras con la misma letra son estadísticamente iguales. N05= control de levadura *S.cerevisiae*, HS= fermentación mixta control de levadura *H. uvarum* con *S. cerevisiae*, RS= fermentación mixta de *R. mucilaginosa* con *S.cerevisiae*, PS= fermentación mixta de *P. fermentans* con *S.cerevisiae*, CS= fermentación mixta de *C. opuntiae* con *S. cerevisiae*.

De acuerdo al contenido de azúcares, los vinos se clasifican en: mistelas (>125 g/L), dulces (25-125 g/L), semidulces (5-25 g/L) y secos (<5 g/L) (OIV-MA-AS311-01A). Según esta clasificación, los vinos que obtuvimos fueron vinos secos, con valores que van de 1.65 a 1.85 g/L.

Con los que respecta al contenido de azúcares reductores residuales en los vinos obtenidos, éstos pueden considerarse normales y con fermentaciones completas. No se encontraron diferencias significativas en el contenido de azúcares reductores residuales entre las fermentaciones mixtas y el control de *S. cerevisia* (N05). Esto nos indica que las levaduras no-S evaluadas en este estudio no representan una competencia por azúcares con *S. cerevisiae*, corroborando estos resultados con los obtenidos para el grado alcohólico. Ortíz *et al.* (2015) encontraron valores de azúcares residuales ligeramente mayores (de 2.4 a 3.5 g/L) utilizando fermentaciones mixtas de especies de *Hanseniaspora* y *S. cerevisiae*. Sin embargo tampoco encontraron diferencias significativas entre tratamientos y los vinos obtenidos también fueron secos.

4.5.3. SO₂ total

En la Tabla 4.9 se muestran los valores obtenidos de SO₂ total. Se obtuvieron valores que van desde 117 a 120 mg/L, los cuales no exceden los valores establecidos por la norma (OIV Code Sheet Issue 2015/01) que señala un máximo de 150 mg/L. Por lo tanto los valores obtenidos no representan ningún peligro al consumidor y pueden ser utilizadas para vinificación.

Tabla 4.9. Valores de SO₂ total (mg/L) obtenidos de vinos de la variedad 'Merlot' en función de la cepa de levadura utilizada

Muestra	SO ₂ total (mg/L)
N05	130.13 ± 3.70 ^a
HS	118.40 ± 6.40 ^a
RS	117.33 ± 15.79 ^a
PS	124.80 ± 6.40 ^a
CS	117.33 ± 7.39 ^a

Se muestran los promedios de tres repeticiones individuales y las desviaciones estándar. Prueba de medias de Tukey ($p \leq 0.05$). Letras con la misma letra son estadísticamente iguales. N05= control de levadura *S.cerevisiae*, HS= fermentación mixta control de levadura *H. uvarum* con *S. cerevisiae*, RS= fermentación mixta de *R. mucilaginosa* con *S.cerevisiae*, PS= fermentación mixta de *P. fermentans* con *S.cerevisiae*, CS= fermentación mixta de *C. opuntiae* con *S. cerevisiae*.

Estadísticamente, no hay diferencias significativas tanto para las fermentaciones mixtas como para *S. cerevisiae*. Nisioutou *et al.* (2018), al realizar fermentaciones mixtas de *Starmerella bacillaris* con *S. cerevisiae* y un control de *S. cerevisiae*, no encontraron tampoco diferencias significativas en la producción de SO₂ total.

4.6. Análisis sensoriales

4.6.1. Prueba hedónica no estructurada

El análisis sensorial se llevó a cabo con 17 panelistas semientrenados, los cuales asistieron a una clase y realizaron una degustación de diferentes tipos de vinos. Se realizó una prueba hedónica no estructurada que va del 0 al 10 con un punto en el centro (Anexo 3). En donde 0 significó “me disgusta mucho” y 10 “me gusta mucho”. Los resultados de la prueba hedónica se muestran en la Tabla 5.9.

Tabla 4.10. Resultados de la prueba hedónica de vinos de la variedad ‘Merlot’ elaborados con distintas cepas de levaduras

Muestra	Visual	Olfativo	Gustativo	General	Descriptorios aromáticos mencionados
N05	6.7 ^a	6.5 ^a	5.8 ^a	6.1 ^a	Fresa, frambuesa, floral, vainilla
HS	6.7 ^a	6.1 ^a	6.1 ^a	6.5 ^a	Yogurt, frambuesa, pimienta
RS	7.0 ^a	7.2 ^a	5.9 ^a	6.5 ^a	Yogurt, fresa, cereza, ciruela, floral, cítrico
PS	6.8 ^a	6.6 ^a	6.0 ^a	6.6 ^a	Yogurt, fresa, moras, cítrico
CS	6.8 ^a	7.1 ^a	6.4 ^a	6.8 ^a	Yogurt, manzana, fresa, frambuesa, floral, cítrico

Se muestran los promedios de 17 datos individuales para cada tratamiento y las desviaciones estándar. Prueba de medias de Tukey ($p \leq 0.05$). Letras con la misma letra son estadísticamente iguales. N05= control de levadura *S.cerevisiae*, HS= fermentación mixta control de levadura *H. uvarum* con *S. cerevisiae*, RS= fermentación mixta de *R. mucilaginosa* con *S.cerevisiae*, PS= fermentación mixta de *P. fermentans* con *S.cerevisiae*, CS= fermentación mixta de *C. opuntiae* con *S. cerevisiae*.

No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ni con los controles N05 (*S. cerevisiae* sola) y HS (*H. uvarum* con *S. cerevisiae*) en ninguno de los aspectos evaluados (visual, olfativos, gustativo, general)

En general, todas las calificaciones se encuentran por arriba de 5, lo cual significa que los vinos tuvieron una tendencia a ser más agradables para los panelistas que desagradables. Lo cual es un atributo positivo para las cepas utilizadas.

Cabe mencionar que los vinos utilizados fueron termovinificados con la finalidad de que las variables medidas en los vinos fueran características de las levaduras inoculadas. Sin embargo, el uso de esta técnica puede influir en los aspectos visuales, olfativos y gustativos. En el aspecto visual se observa un color mucho más oscuro y opaco en el vino, debido a que durante el calentamiento, hay mayor liberación de antocianos al medio, alcanzado una concentración de hasta 280 mg/L, este aumento de color resulta ser el factor principal por el que se realiza la termovinificación, ya que mejora y estabiliza el color de los vinos tintos (Durner, 2016). El aspecto olfativo se ve fuertemente influenciado por esta técnica, ya que durante el calentamiento del mosto se pierden compuestos volátiles como terpenoides y fenoles (Geffroy *et al.*, 2015), trayendo como consecuencia una menor percepción de aromas durante el análisis sensorial. En el aspecto gustativo, el calentamiento del mosto influye en la percepción del catador al momento de pasar el vino sobre el paladar.

Geffroy *et al.* (2015) mencionan que la termovinificación es conocida por producir vinos con un perfil sensorial estandarizado, descrito frecuentemente por los enólogos como “yogurt de plátano”. Esto coincide con nuestros resultados obtenidos, en donde los panelistas describieron en general las muestras con un aroma a yogurt. Aunque también podemos observar que además de éste, predominaron aromas a “fresa y frambuesa” en la mayor parte de los tratamientos (Tabla 4.10).

Para todos los tratamientos hubo aromas específicos de cada uno. Para el control N05 detectaron aromas a vainilla, HS pimienta, RS cereza, PS moras y CS manzana.

4.6.2. Prueba de rangos de Kramer

La prueba fue realizada a la par de la prueba anterior. Durante esta prueba el catador clasificó las muestras en orden decreciente de preferencia, asignando con el número 1 al vino que más gustó, el número 2 al que sigue en su preferencia y así sucesivamente hasta el número 5 que fue aquel vino que menos agradó. Según las muestras analizadas y los panelistas utilizados, se busca en las tablas de Kramer el rango numérico correspondiente. Si al momento de hacer la sumatoria de las muestras, éstas se encuentran dentro del rango establecido en las tablas, se considera que el tratamiento es indiferente (no agrada ni más ni menos que los otros), si se encuentran por debajo del rango, significa que se prefieren por sobre las demás y, si se encuentran por arriba rango, se consideran que son menos preferidos que los otros.

Todos los vinos evaluados se encontraron en el rango de indiferentes con base al gusto de los panelistas incluyendo el control N05 (*S. cerevisiae*). Los vinos obtenidos si bien no son preferidos dentro de la población, tampoco son rechazados. Por lo tanto, las cepas no-S no generaron alteraciones negativas en los vinos capaces de afectar la preferencia general de los panelistas.

Tabla 4.11. Resultados de la prueba de preferencia de Kramer de los vinos elaborados con distintas levaduras

Muestra	General
N05	55
HS	47
RS	55
PS	52
CS	47
Rango	35-67

Sumatoria de 17 mediciones. Rango obtenido con base a la tabla de rangos de Kramer ($p \leq 0.05$)

V. CONCLUSIONES

Identificación de levaduras

Las poblaciones de levaduras varían de acuerdo al mes y al órgano muestreado, obteniendo poblaciones que van de 1-5 log UFC g⁻¹.

Aureobasidium pullulans y *Cryptococcus* sp. son las especies de levaduras más ampliamente difundidas en el viñedo, pero al ser levaduras ambientales y altamente oxidativas no cuentan con un potencial enológico.

El género *Saccharomyces* fue indetectable en las muestras tomadas de los distintos órganos de la vid.

Los géneros de levaduras no-S que presentaron potencial enológico se encontraron en las hojas, y corresponden a *Rhodotorula*, *Pichia* y *Clavispora*.

Selección de levaduras

La cepa *Pichia fermentans* tiene características enológicas deseables (efecto *killer*) y es capaz de desarrollar en presencia de azúcar, etanol y SO₂.

La cepa *Clavispora opuntiae* presentó la mayor tolerancia a etanol con respecto a las demás levaduras (*H. uvarum*, *P. fermentans* y *R. mucilaginosa*), también presentó tolerancia a SO₂ y azúcar. Asimismo, posee actividad β glucosidasa, pero no efecto *killer*.

La cepa de *Rhodotorula mucilaginosa* no fue tolerante a ninguna de las tres condiciones probadas (azúcar, etanol y SO₂), lo cual se vio reflejado en el ensayo de vinificación al decaer su población al poco tiempo.

Ensayos de microvinificación y análisis sensorial

La presencia de las cepas de levaduras no-S durante la fermentación no influye en el proceso fermentativo de *S. cerevisiae*. Todas las fermentaciones se completaron a los siete días.

El medio lisina no permite cuantificar levaduras no-S durante las cinéticas de crecimiento en cultivos mixtos de cepas *Saccharomyces* y no-S, siendo útil para determinar si las cepas aisladas son o no *Saccharomyces* spp al realizar varios pases.

Las cepas de levaduras *Pichia fermentans* (3.1HM), *Clavispora opuntiae* (5.7HE) se adaptan en el medio fermentativo, siendo detectables hasta las 72h después de iniciada la fermentación, su uso resulta viable en vinificación, ya que no afecta el crecimiento de *S. cerevisiae*.

El uso de las cepas evaluadas no propició diferencias significativas en cuanto a ATT, AV, azúcares reductores, grado alcohólico y SO₂ con el control de *S. cerevisiae*, siendo posible su uso en vinificación. Los vinos producidos se encuentran dentro de los valores establecidos por los organismos encargados de regular la calidad de los vinos.

En los vinos obtenidos predominaron los aromas a fresa y frambuesa. Ningún vino se destacó sobre los demás en preferencia por los consumidores.

El uso de la termovinificación para la elaboración de los vinos enmascaró algunas características olfativas, debido a que en todos los tratamientos se detectaron aromas a 'yogurt', característico de vinos sometidos a pasteurización.

RECOMENDACIONES PARA FUTUROS TRABAJOS

1. Resulta altamente recomendable realizar un análisis de los compuestos volátiles producidos en las diferentes vinificaciones. Esto nos permitiría obtener información detallada de los compuestos que produce cada levadura no-*Saccharomyces*.
2. Utilizar metodologías alternativas a la termovinificación para la esterilización de los vinos, ya que ésta puede provocar la pérdida de compuestos volátiles y enmascarar otro tipo de aromas.
3. Realizar una preselección de los catadores para el análisis sensorial. Esto con la finalidad de que los seleccionados sean capaces de detectar aromas y sabores diferentes de manera acertada.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Alexandre, H., Rosseaux, I. and Charpentier, C. (1994). Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. FEMS Microbiology Letters 124(1): 17-22.
- Arroyo-López, F. N., Salvadó, Z., Tronchoni, J., Guillamón, J. M., Barrio, E. and Querol, A. (2010). Susceptibility and resistance to ethanol in *Saccharomyces* strains isolated from wild and fermentative environments. Yeast 27: 1005-1015.
- Barata, A., Seborro, F., Belloch, C., Malfeito-Ferreira, M. and Loureiro V. (2008). Ascomycetous yeast species recovered from grapes damaged by honeydew and sour rot. Journal of Applied Microbiology 104: 1182-1191.
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M. and Loureiro, V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. International Journal of Food Microbiology 153: 243-259.
- Beaven, M. J., Charpentier, C. and Rose, A. H. (1982). Production and Tolerance of Ethanol in Relation to Phospholipids Fatty-acyl Composition in *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 431. Microbiology 128 (7): 1447-1455.
- Belda, I., Zorraonandia, I., Perisin, M., Palacios, A. and Acedo, A. (2017). From vineyard soil to wine fermentation: Microbiome approximations to explain the “terroir” concept. Frontiers in Microbiology 8:1-12.
- Bernardi, A. M. (2013). Selección de levaduras vínicas provenientes de la provincia de Mendoza. Tesis de grado de Licenciatura en Bromatología, Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina. 69 p.
- Bevan, E.A. and Makower, M. (1963). The physiological bases of the killer character in yeast. Proceedings of the XI International Congress of Genetics. Delft, The Netherlands 1: 202-203.
- Bokulich, N. A., Thorngate, J. H., Richardson, P. M. and Mills, D. A. (2013). Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage and

- climate. Proceedings of National Academy of Sciences 111(1): 139-148.
- Bokulich, N. A., Collins, T. S., Masarweh, C., Allen, G., Heymann, H., Ebeler, S. E. and Mills, D. (2016). Associations among wine grape microbiome, metabolome, and fermentation behavior suggest microbial contribution to regional wine characteristics. *mBio* 7(3).
- Carbonell, P. y Martínez, J. M. (2013). Estructura y composición de la uva y su contribución al vino. *Revista de Enología Científica y Profesional* 139:1-5.
- Carrasco, P., Querol, A. and Del Olmo, M. (2001). Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains. *Archives of Microbiology* 175 (6): 450–457.
- Carrascosa, A., Martínez-Rodríguez, A., Cebollero, E. and González, R. (2011). *Saccharomyces* yeasts II: secondary fermentation. *In*: Carrascosa, A., Muñoz, R. and González, R (Eds). *Molecular Wine Microbiology*. Ed: Elsevier, London, UK. Pp 33-48.
- Castilleja-Miranda, D.E., Ortíz-Barrera, E., Medrano-Arvizu, S.M., Pacheco-Aguilar, R. and Martínez-Peniche, R.A. (2015). Aislamiento, selección e identificación de levaduras *Saccharomyces* spp. nativas de viñedos en Querétaro, México. *Agrociencia* 49: 759-773.
- Clemente-Jiménez, J. M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F. J. and Rodríguez-Vico, F. (2004). Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiology* 21: 149-155.
- Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., Serrano, A., Tello, J., Aporta, I., Vélez, M. D. and Valero, E. (2011). Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries. *International Journal of Food Microbiology* 145: 132-139.
- Crespo-Sampere, Ana., Estiarte, N., Marín, S., Sanchis, V. and Ramos, A. J. (2013). Propidium monoazid combined with real-time quantitative PCR to quantify viable *Alternaria* spp. contamination in tomato products. *International Journal of Food Microbiology* 165: 214-220.

- De la Cruz-de Aquino, M.A., Martínez-Peniche, R.A., Becerril-Román, A.E. y Chávaro-Ortíz, M.S. (2012). Caracterización física y química de vinos tintos obtenidos en tres regiones de Querétaro. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35: 61-67.
- De la Garza-Toledo, H., Martínez, M., Lara, L., Rodríguez-Herrera, R., Rodríguez-Martínez, J. and Aguilar, C.N. (2008). Production of a Mexican Alcoholic Beverage: Sotol. *Research Journal of Biological Science* 3(6): 566-571.
- Durner, D. (2016). Improvement and stabilization of red wine color. *In*: Carle, R. and Schweiggert, R. (Eds). *Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages*. Ed: Elsevier, Pp: 239-264.
- Escalante-Minakata, P., Blaschek, H. P., Barba de la Rosa, A. P., Santos, L. and De León-Rodríguez, A. (2008). Identification of yeast and bacteria involved in the mezcal fermentation of *Agave salvia*. *Letters in Applied Microbiology* 46:626-630.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. and Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 329-337.
- Fleet, G. (1992). Spoilage Yeasts. *Critical Reviews in Biotechnology* 12 (1-2): 1–44.
- Fleet, G. (1993). The microorganisms of winemaking-isolation enumeration and identification. *In*: Fleet, G.H (Eds) *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Suiza. pp: 1-27.
- Fleet, G. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology* 86 (1–2): 11–22.
- Galet, P. (1983). *Précis de Viticulture*. 4eme ed. Ed. Imprimerie Charles-Dehan. Montpellier, France. 582 p.
- García, J. (2008). *Maridaje, enología y cata de vinos*. 1a ed. Ed: Innovación y cualificación ediciones, Málaga, España. 408 p.

- Garijo, P., López, R., Santamaría, P., Ocón, E., Olarte, C., Sanz, S. and Gutiérrez, A.R. (2011). Presence of enological microorganisms in grapes and the air of a vineyard during the ripening period. *European Food Research Technology* 233: 359-365.
- Geffroy, O., López, R., Serrano, E., Dufourcq, T., García-Moreno, E., Cacho, J. and Ferreira, V. (2015). Changes in analytical and volatile compositions of red wines induced by pre-fermentation heat treatment of grapes. *Food Chemistry* 187: 243-253.
- Gil, M., García, F. y García, P. (2009). *El vino y su servicio*. Ed: Parainfo, Madrid, España. 352 p.
- Grube, M., Schimid, F. and Berg, G. (2011). Black fungi and associates bacterial communities in the phyllosphere of grapevine. *Fungal Biology* 115: 978-986.
- Hernández, A., Martín, A., Córdoba, M., Benito, M., Aranda, E. and Pérez-Nevado, F. (2008). Determination of killer activity in yeasts isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *International Journal of Food Microbiology* 121(2):178-188.
- Hernández, L. F., Espinosa, J. C., Fernández-González, M. and Briones, A. (2003). β -glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *International Journal of Food Microbiology* 80 (2): 171–176.
- Hidalgo, J. (2011). *Tratado de Enología*. 2a Ed. Mundi-prensa, Madrid, España. 1813 p.
- Hidalgo, L., e Hidalgo, J. (2011). *Tratado de Viticultura*. 4a Ed. Mundi-prensa, Madrid, España. 2043 p.
- Hu, K., Zhu, X. L., Mu, H., Ma, Y., Ullah, N. and Tao, Y. S. (2015). A novel extracellular glycosidase activity from *Rhodotorula mucilaginosa*: its application potential in wine aroma enhancement. *Letters in Applied Microbiology* 62: 169-176.
- Ingram, L.O. and Buttke, T.M. (1984). Effects of alcohols on microorganisms. *Advances in Microbial Physiology* 25: 253–300.
- Jackson, S. R. (2008). *Wine Science. Principles and Applications*. 3a ed.

Academic Press Elsevier. 749 p.

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

Jolly, N., Varela, C. and Pretorius, I. (2014). Not your ordinary yeasts: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Research* 14: 215-237.

Keller, M. (2015). *The Science of Grapevines. Anatomy and Physiology*. 2a ed. Academic Press Elsevier, Washington, Estados Unidos. 491 p.

Lam, F.H., Ghaderi, A., Fink, G.R. and Stephanopoulos, G. (2014). Engineering alcohol tolerance in yeast. *Science* 346 (6205): 71-75.

Lissarrague, J.R. y Baeza, P. (2008). *Biología de la vid. In: Curso de Viticultura*. Baeza, P., Lissarrague, J.R., Sánchez, P., Sotés, V. and Ruiz, C. (Eds.). Departamento de Producción Vegetal. Fitotecnia. Universidad Politécnica de Madrid. Madrid, España. 252 p.

Lopes, C. A. and Sangorrin, M. P. (2010). Optimization of killer assays for yeast selection protocols. *Revista Argentina de Microbiología* 42: 298-306.

Ma, D., Yan, X., Wang, Q., Zhang, Y. and Tao, Y. (2017). Performance of selected *P. fermentans* and its extracellular enzyme in co-inoculation with *S.cerevisiae* for wine aroma enhancement. *Food Science and Technology* 86: 361-370.

Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D. and Polonelli, L. (1997). Yeast killer systems. *Clinical Microbiology Reviews* 10 (3): 369–400.

Marquina, D., Santos, A. and Peinado, J. M. (2002). Biology of killer yeasts. *International Microbiology* 5 (2): 65–71.

Mendes, A., Clímaco, M. C. and Mendez, A. (2001). The role of non-*Saccharomyces* species in releasing glycosidic bound fraction of grape aroma components - A preliminary study. *Journal of Applied Microbiology* 91 (1): 67–71.

- Mendes, S.D.C., Ramírez-Castrillón, M., Feldberg, N.P., Bertoldi, F.C. and Valente, P. (2017). Environmental yeasts communities in vineyards in the mountains of Santa Catarina State, Brazil. *World Journal Microbiology Biotechnology* 33:128.
- Meunier, Y. and Rosier, A. (2003). *La cata de vinos, introducción a los vinos franceses*. Ed. Thurse S.A y H. Blume. Madrid, España. 188 p.
- Miranda, D. E., Aldrete, J. A., Arvizu, S. M., Iturriaga, M., Soto, L. and Martínez-Peniche, R. Á. (2017). Growth kinetics for the selection of yeast strains for fermented beverages. *In: Morata, A. and Loira, I (Eds) Yeast-Industrial application*. Ed. INTECH, pp. 87-67.
- Navarre C. (1994). *Manuel d'Œnologie*. 5ème. Éd. J.-B. Baillière. Paris, France. 287 p.
- Nisiotou, A., Sgouros, G., Mallouchos, A., Nisiotis, C.S., Michaelidis, C., Tassou, C. and Banilas, G. (2018). The use of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* and *Starmerella bacillaris* strains as a tool to create chemical complexity in local wines. *Food Research International* 111: 498-508.
- Nisiotou, A. A. and Nychas, G.J.E. (2007). Yeast populations residing on healthy or *Botrytis*-infected grapes from vineyard in Attica, Greece. *Applied Environmental Microbiology* 73 (8): 2765-2768.
- Ocón, M. E. (2014). *Diversidad de levaduras no-Saccharomyces en diferentes ecosistemas vitivinícolas*. Tesis de grado de doctorado, Facultad de Ciencias, Estudios Agroalimentarios e Informática. Universidad de la Rioja, Logroño, España. 177p.
- Ocón, M. E., Gutiérrez, A. E., Garijo, P., López, R. and Santamaría, P. (2010). Presence of non-*Saccharomyces* yeasts in cellar equipment and grape juice during harvest time. *Food Microbiology* 27: 1023-1027.
- OIV. (2018). *World Vitiviniculture situation, statical report*. Ed: OIV, París, Francia. 16 p.
- OIV. (2015). *Compendium of International Methods of Analysis*. Ed: OIV, Paris, France. 1 p.

- Ortíz-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 Querétaro, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 21 (2): 169–183.
- Ortiz, M. J., Barraón, N., Baffi, M. A., Arévalo-Villena, M. and Briones, A. (2013). Spontaneous must fermentation: Identification and biotechnological properties of wine yeasts. *LWT - Food Science and Technology* 50 (2): 371–377.
- Pérez, G., Fariña, L., Barquet, M., Boido, E., Gaggero, C., Dellacassa, E. and Carrau, F. (2011). A quick screening method to identify β -glucosidase activity in native wine yeast strains: Application of Esculin Glycerol Agar (EGA) medium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27 (1): 47–55.
- Pérez-Martín, F., Seseña, S., Fernández-González, M., Arévalo, M. and Llanos, M. (2014). Microbial communities in air and wine of a winery in two consecutive vintage. *International Journal of Food Microbiology* 190: 144–153.
- Peynaud, E. (1986). *El gusto del vino*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. 300 p.
- Pina, C., Antonio J. and Hogg, T. (2004). Inferring ethanol tolerance of Saccharomyces and non-Saccharomyces yeasts by progressive inactivation. *Biotechnology letters* 26: 1521-1527.
- Pinto, C., Pinho, D., Sousa, D., Pinheiro, M., Egas, C. and Gomes, A. (2014). Unravelling the diversity of grapevine microbiome. *PLoS ONE*, 9(1).
- Querol, A., Jiménez, M. and Huerta, T. (1990). Microbiological and Enological Parameters during Fermentation of Musts from Poor and Normal Grape-Harvests in the Region of Alicante (Spain). *Journal of Food Science* 55(6): 1603–1606.
- Renouf, V., Falcou, M., Miot-Sertier, C., Perello, M. C., De Revel, G. and Lonvaud Funel, A. (2006). Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeast species during the initial stages of winemaking. *Journal of*

- Applied Microbiology 100: 1208-1219.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. and Dubourdieu, D. (2006). Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications. 2a Ed. Faculty of Enology, University of Bordeaux II, Bordeaux, France. 497 p.
- Ricci, M., Martini, S., Bonechi, C., Trabalzini, L., Santucci, a. and Rosi, C. (2004). Inhibition effects of etano on the kinetics of glucose metabolism by *S. cerevisiae*: NMR and modeling study. Chemical Physycs Letter 387(4-6): 377-382.
- Roderick, G., Hufbauer, R. and Navajas, M. (2012). Evolution and biological control. *Evol Appl* 5(5): 419-423.
- Romancino, D. P., Di Maio, S., Muriella, R. and Oliva, D. (2008). Analysis of non-*Saccharomyces* yeast populations isolated from grape musts from Sicily (Italy). *Journal of Applied Microbiology* 105 (6): 2248–2254.
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M. and Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology* 86 (1–2): 169–180.
- Romano, P. and Suzzi, G. (1993). Sulfur dioxide and wine microorganisms. *In*: Fleet, G.H. (Ed.). *Wine Microbiology and Biotechnology*. Ed: Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland. pp: 373-394.
- Rong, X., Rotondo, F., Schisler, D., Paul, P. and McSpadden Gardener, B. (2017). Tracking native and applied populations of *Cryptococcus flavescenes* in the environment. *Planta Gene* (11): 31-40.
- SAGARPA, 2018. www.gob.mx (Fecha de consulta: Noviembre,2018).
- Santos, A. and Marquina, D. (2011). The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to proapoptotic concentrations of *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Fungal Genetics and Biology* 48(10): 979-989.
- Segura, L. E., Kirchmayr, M. R., Flores, B., Gschaedler, M. and Anne, C. (2010). PCR-RFLP de las regiones ITS-5.8S como herramienta de identificación de levaduras: ventajas y desventajas. *Revista Digital Científica y Tecnológica* 8:1-12.

- SIAP. 2016. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Programa de trabajo de la campaña contra la enfermedad de pierce, a operar con recursos del componente de sanidad federalizado del incentivo de sanidad vegetal del programa de sanidad e inocuidad agroalimentario 2016, en el estado de Querétaro. SIAP. 7 p.
- Slaninova, I., Sesták, S., Svoboda, A. and Farkas, V. (2000). Cell wall and cytoskeleton reorganization as the response to hyperosmotic shock in *Saccharomyces cerevisiae*. Archives of Microbiology 173(4): 245-252.
- Somers, J. M. and Bevan, E. A. (1969). The inheritance of the killer character in yeast. Genetical Research, 13 (1): 71–83.
- Torija M. J. 2002. Ecología de levaduras: selección y adaptación a fermentaciones vínicas. Memoria presentada por para optar al grado de Doctora en Bioquímica. Universitat Rovira I Virgili Departament De Bioquímica I Biotecnologia Facultat D'enologia. Tarragona, España. 270 p.
- Valero, E., Schuller, D., Cambon, B., Casal, M. and Dequin, S. (2005). Dissemination and survival of commercial wine yeast in the vineyard: a large-scale, three years study. FEMS yeast research 5: 959-969.
- Varela, C. and Borneman A.R. (2016). Yeasts found in vineyards and wineries. Yeast 34(3): 111-128.
- Wang, Y., Li, Y., Xu, W., Zheng, X., Zhang, X., Abdelhai, M., Zhao, L., Li, H., Diao, J. and Zhang, H. (2018). Exploring the effect of β -glucan on the biocontrol activity of *Cryptococcus podzolicus* against postharvest decay of apples and the possible mechanisms involved. Biological Control (121): 14-22.
- Wang, Z., Zhuge, J., Fang, H. and Prior, B. A. (2001). Glycerol production by microbial fermentation: A review. Biotechnology Advances 19(3): 201–223.
- Williams, S., Slatko, B. and McCarrey, J. (2007). Laboratory investigations in molecular biology. Jones and Bartletts publishers, London, UK. 234 p.
- Zargoc, T., Maráz, A., Cadez, N., Povhe Jemec, K., Péter, G., Resnik, M., Nemanic, J. and Raspor, P. (2001). Indigenous wine killer yeasts and their

applications as a starter culture in wine fermentation. Food Microbiology 18:
441-451.

ANEXOS

ANEXO 1. FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL ANÁLISIS SENSORIAL DE VINOS

Este documento intenta explicar las cuestiones relativas a la utilización que se realizaría de sus datos de participación en el análisis sensorial de vinos. Léalo atentamente y consulte con el instructor todas las dudas que se le planteen.

1. Información acerca del análisis sensorial.

Desde el Laboratorio de Fermentaciones y Fisiología de Frutas ubicado en la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro se llevará a cabo la evaluación de una bebida fermentada producida por microorganismos seleccionados naturalmente del fruto, que no resultan dañinos al ser humano. La bebida cumple con los requerimientos de inocuidad y no contiene aditivos perjudiciales a la salud.

El objetivo de dicho análisis es determinar la aceptabilidad del producto por el consumidor.

2. Uso y confidencialidad de los datos.

Los datos que se obtengan de su participación serán utilizados únicamente con fines de información estadística para calificar el grado de aceptación de la bebida fermentada, garantizando la confidencialidad de los datos proporcionados por el participante.

3. Declaración de consentimiento.

Si en el caso de decidir participar y consentir la colaboración escriba los datos requeridos en dicho documento como símbolo de aceptación de los términos antes descritos.

Yo, _____ he leído el documento de consentimiento informado que me ha sido entregado, he comprendido las explicaciones en él facilitadas acerca del análisis sensorial y he podido resolver todas mis dudas y preguntas que he planteado al respecto. También he sido informado de que mis datos personales serán protegidos y serán utilizados únicamente con fines de formación y desarrollo profesional.

Tomando todo ello en consideración y en tales condiciones, **CONSIENTO** participar en el análisis sensorial y que los datos que se deriven de mi participación sean utilizados para cubrir los objetivos especificados en el documento.

Fecha _____

Firma _____

**ANEXO 2. CONCENTRACIÓN Y PUREZA DE ADN DE LEVADURAS
AISLADAS DE DIFERENTES ÓRGANOS DE LA VID**

Código	Cepa	Conc. ADN (ng/μL)	A260/280	A260/230
3	L3RF	459.1	2.06	1.64
5	L5RF	870.3	2.06	1.48
6	L6RF	36.4	2.02	1.2
7	L1HJ	286.2	2.12	1.92
8	L2HJ	64	2.08	1.33
9	L3HJ	1902.1	2.13	2.15
10	L4HJ	328.2	2.16	2
11	L5HJ	43	2.1	1.56
15	L3HM	141.5	2.14	1.67
17	L5HM	62.7	2.17	1.34
18	L6HM	131.1	2.13	1.67
19	L7HM	111.5	2.1	1.43
20	L8HM	124.6	2.15	1.53
21	L1HE	263.1	2.13	1.92
22	L2HE	420.7	2.04	1.47
23	L3HE	164.1	2.11	2
24	L4HE	737.7	2.07	1.61
25	L5HE	30	1.97	0.73
26	L6HE	68.8	2.1	1.54
27	L1FA	351.1	2.17	2.01
28	L2FA	97.1	2.14	1.45
29	L3FA	157.6	2.09	1.55
30	L4FA	208.4	2.17	2.01
31	L5FA	204	2.09	1.96
32	L6FA	126.3	2.15	1.55
33	L7FA	459.6	2.18	1.96
34	L8FA	109.8	2.08	1.49
35	L1FE	98.3	2.15	1.56
36	L2FE	104.1	2.05	1.37
37	L3FE	130.2	2.12	1.34
38	L4FE	171.6	2.14	1.74
39	L5FE	243.6	2.13	2.1
40	L2.1HM	85.9	2.14	1.43
41	L2.2HM	427.3	2.17	2.08
42	L2.3HM	158.8	2.14	1.6
43	L2.4HM	197.8	2.11	1.96
45	L2.6HM	249.2	2.18	1.94
46	L2.7HM	47	1.96	1.1
47	L2.1HE	96.5	1.92	1.09
48	L2.2HE	37.9	2.18	1.54
49	L2.3HE	162.1	2.1	1.67

50	L2.5HE	618.4	2.1	2.01
51	L2.6HE	61.6	2.05	1.11
52	L3.1HM	157.9	2.12	1.61
55	L3.4HM	343.7	2.08	1.86
56	L3.5HM	214.5	2.07	1.74
57	L3.6HM	184.9	2.1	1.78
59	L3.8HM	724.1	2.05	1.55
60	L3.1HE	34.1	1.99	0.9
61	L3.2HE	459	2.13	1.93
62	L3.3HE	218.9	2.03	1.51
63	L3.4HE	195.6	2.11	1.9
64	L3.5HE	336.4	2.11	1.77
65	L3.6HE	603.5	2.14	2.16
66	L3.7HE	247.8	2.1	2
67	L3.8HE	280.8	2.15	2.16
68	L1FM	100.3	2.11	1.8
69	L2FM	72.6	2.04	1.1
70	L3FM	408.3	2.09	1.83
71	L4FM	483.4	2.07	1.62
73	L6FM	59.1	2.11	1.39
75	L8FM	201.1	2.09	1.65
79	L4.4HM	400.4	2.11	1.8
80	L4.5HM	336.9	2.09	1.74
82	L4.7HM	87.9	2.16	1.53
83	L4.8HM	488.5	2.11	1.82
84	L4.1HE	163.5	2.11	1.86
85	L4.2HE	84	2.08	1.55
86	L4.3HE	60.7	2.15	1.4
88	L4.5HE	149.5	2.09	1.92
89	L4.6HE	31	2.07	1.57
90	L4.7HE	463.1	2.1	1.98
92	L5.1HM	52.7	2	1.86
93	L5.2HM	109	2.06	1.95
94	L5.3HM	247.3	2.07	1.88
95	L5.4HM	286.6	2.08	1.7
96	L5.5HM	649.7	2.02	1.71
97	L5.6HM	83.8	2.06	1.64
98	L5.7HM	193.6	1.97	1.31
99	L5.8HM	286.5	2.08	1.6
100	L5.1HE	102.3	2.02	2.01
101	L5.2HE	84.7	2.13	2
102	L5.3HE	75.7	2.17	1.94
103	L5.4HE	180.2	2.15	2.12
106	L5.7HE	54.8	2.16	1.68
107	L5.8HE	84.4	2.08	1.67
108	L1Y	106.7	2.13	2.2

109	L2Y	227	2.1	1.97
110	L3Y	84.9	2.13	2.14
111	L4Y	265.9	1.89	1.05
112	L5Y	324.2	2.07	1.78
113	L6Y	62.4	2.14	2.08
115	L8Y	197.4	2.13	2.13

ANEXO 3. PRUEBA DE ESCALA HEDÓNICA PARA EL ANÁLISIS SENSORIAL

Edad _____ Sexo _____ Fecha _____

Marque con una X el punto en la línea de acuerdo a su preferencia. Siga el orden evaluando la muestra indicada en los recuadros.

Muestra		Me disgusta mucho		Me gusta mucho
<input style="width: 40px; height: 20px;" type="checkbox"/>	Visual	----- ----- ----- ----- -----		
	Aroma	----- ----- ----- ----- -----		
	Sabor	----- ----- ----- ----- -----		
	Aceptación General	----- ----- ----- ----- -----		
			Tipos de aromas:	<input style="width: 100%; height: 40px;" type="text"/>

Muestra		Me disgusta mucho		Me gusta mucho
<input style="width: 40px; height: 20px;" type="checkbox"/>	Visual	----- ----- ----- ----- -----		
	Aroma	----- ----- ----- ----- -----		
	Sabor	----- ----- ----- ----- -----		
	Aceptación General	----- ----- ----- ----- -----		
			Tipos de aromas:	<input style="width: 100%; height: 40px;" type="text"/>

Muestra		Me disgusta mucho		Me gusta mucho
<input style="width: 40px; height: 20px;" type="checkbox"/>	Visual	----- ----- ----- ----- -----		
	Aroma	----- ----- ----- ----- -----		
	Sabor	----- ----- ----- ----- -----		
	Aceptación General	----- ----- ----- ----- -----		
			Tipos de aromas:	<input style="width: 100%; height: 40px;" type="text"/>

Muestra		Me disgusta mucho		Me gusta mucho
<input style="width: 40px; height: 20px;" type="checkbox"/>	Visual	----- ----- ----- ----- -----		
	Aroma	----- ----- ----- ----- -----		
	Sabor	----- ----- ----- ----- -----		
	Aceptación General	----- ----- ----- ----- -----		
			Tipos de aromas:	<input style="width: 100%; height: 40px;" type="text"/>

Muestra		Me disgusta mucho		Me gusta mucho
<input style="width: 40px; height: 20px;" type="checkbox"/>	Visual	----- ----- ----- ----- -----		
	Aroma	----- ----- ----- ----- -----		
	Sabor	----- ----- ----- ----- -----		
	Aceptación General	----- ----- ----- ----- -----		
			Tipos de aromas:	<input style="width: 100%; height: 40px;" type="text"/>