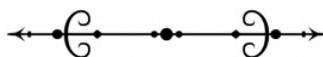


UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN JUAN

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



Selección de levaduras nativas *Saccharomyces cerevisiae* para vinificaciones en variedades blancas de viñedos de Pozo de los Algarrobos, San Juan.



Autor: Diego Bernardo Petrigani

Directora: Dra. Yolanda Paola Maturano

Codirectores: Dra. María Victoria Mestre y Dr. Fabio Vázquez

San Juan, marzo 2022.

AGRADECIMIENTOS

Al concluir una etapa maravillosa de mi vida quiero extender un profundo agradecimiento, a quienes hicieron posible este sueño, aquellos que junto a mi caminaron en todo momento y siempre fueron inspiración, apoyo y fortaleza.

En primer lugar, quiero agradecer a mi directora de tesis, Dra. Yolanda Paola Maturano y mi co-directora Dra. María Victoria Mestre Furlani por todo el apoyo técnico, científico y personal que me han brindado, también la admiración por todos sus logros y su amplia trayectoria científica pero aún más por su gran calidad humana.

A mi co-director académico Dr. Fabio Vázquez por su gran conocimiento compartido en las cátedras de Microbiología y Genética general y por sus valiosas y constructivas sugerencias a este trabajo final.

Agradecer a la Dra. Mariana Combina, Lic. Valeria Chimeno y Dra. Magali González del laboratorio de Microbiología Enológica de la Estación Experimental Agropecuaria Mendoza de INTA, por brindarme todos sus conocimientos y herramientas que fueron necesarios para llevar a cabo los análisis moleculares del proceso de investigación. No hubiese podido arribar a estos resultados de no haber sido por su incondicional ayuda.

Quiero extender mi agradecimiento a la Dra. Rosalía Paz y Dra. Magali Giménez pertenecientes al Centro de Investigaciones de la Geósfera y Biósfera (CIGeoBio), por su disponibilidad y generosidad para compartir sus experiencias y amplios conocimientos sobre Biología molecular y por el préstamo del termociclador en momentos claves del proceso de investigación de esta tesis.

A la Dra. María Cristina Nally directora del Instituto de Biotecnología (IBT) de la Facultad de Ingeniería de U.N.S.J. y a todo su personal por la colaboración y compañerismo brindado.

A la Lic. Leticia Rodríguez Assaf, vicedirectora del Dpto. de Biología, por todo su apoyo y acompañamiento en los momentos finales de la carrera.

A la Dra. Natalia Andino y la Dra. Viviana Fernández por la predisposición y ayuda en la corrección de los análisis estadísticos de esta tesis.

Gracias a cada docente de la carrera de Licenciatura en Biología de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de U.N.S.J., quienes con su apoyo y enseñanzas constituyen la base de mi nueva vida profesional.

A Fernando Aragón compañero y amigo de viaje de esta maravillosa aventura y no puedo dejar de recordar cuantas tardes y horas de trabajo nos juntamos a lo largo de nuestra formación, no puedo dejar de agradecer por tu apoyo y constancia en tantas horas de estudio compartidas.

A mi compañera de vida Iris del Valle por su incondicional apoyo, contención, acompañamiento y aguante durante todo este tiempo que llevo mi nueva formación académica. Muchas gracias!!!!

A Mabel por darme la gran oportunidad de poder concretar mi anhelo como estudiante y lograr mi meta; sus palabras de apoyo continuo y confianza para seguir adelante.

Por último, y no menos importantes, quiero agradecer a mi hijo Enzo, por su apoyo constante e incondicional; a mi mamá Beba, a mi papá Carlos que desde el cielo nunca dejó de acompañarme, mis hermanos, cuñados y sobrinos.

DEDICATORIA

*A mi mamá Beba
y a mi hijo Enzo.*

*Aunque sacudas con todas tus fuerzas
el reloj de arena,
cada grano caerá a su tiempo....
No fuerces nada.... Todo llega.*

INDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	6
Historia de la Vitivinicultura en la Argentina	6
Vitivinicultura en San Juan	8
Panorama de consumo actual	10
La uva	11
El mosto	13
Componentes del mosto	13
Producción de vino	15
Proceso de vinificación en blanco	15
Fermentación alcohólica	17
Levaduras	22
Selección de levaduras nativas con propiedades enológicas	26
Criterios tecnológicos de selección de levaduras nativas	27
Medios de cultivos y formas de conservación de las levaduras	28
Métodos de identificación molecular de levaduras seleccionadas	30
Levaduras nativas seleccionadas para uso enológico	32
HIPÓTESIS	35
OBJETIVOS	37
Objetivo general	37
Objetivos específicos	37
METODOLOGÍA	39
Actividades y metodología	39
1. Sitio de estudio	39
2. Muestreo	40
3. Aislamiento de levaduras nativas <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41
3.1 Aislamiento	41
3.2 Purificación y conservación	42

4. Identificación molecular de las levaduras <i>S. cerevisiae</i> nativas seleccionadas	43
4.1 Extracción de ADN Total	43
4.2 Diferenciación molecular intraespecífica mediante metodología de PCR Interdelta	44
5. Caracterización fisiológica de interés enológico de levaduras nativas <i>S. cerevisiae</i>	45
5.1 Producción de H ₂ S	45
5.2 Capacidad de crecimiento celular a baja temperatura y altas concentraciones de azúcar, etanol y dióxido de azufre (SO ₂)	46
6. Evaluación del comportamiento de las levaduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> seleccionadas y cepa comercial en condiciones enológicas usando cultivos puros	48
6.1 Parámetros elegidos para evaluar el comportamiento de las cepas	49
7. Análisis sensorial de los vinos obtenidos en micro vinificaciones	51
ANÁLISIS DE DATOS	52
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
8. Selección de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	60
8.1 Aislamiento y caracterización fisiológica de levaduras nativas con aptitudes enológicas ...	60
8.2 Diferenciación intraespecífica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por PCR Interdelta	63
9. Vinificaciones a nivel de laboratorio	70
10. Análisis sensorial	73
CONCLUSIONES	77
PROYECCIÓN	79
ANEXOS	80
Anexo I Técnicas analíticas utilizadas en los ensayos	81
Anexo II Medios de cultivos utilizados en los ensayos	82
Anexo III Soluciones para extracción de ADN de levaduras	83
Anexo IV Preparación de los diferentes sustratos para la resistencia a medios estresantes	84
Preparación de material de vidrio y mostos para vinificaciones en laboratorio	84
Anexo V Planilla de cata	85
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

ABREVIATURAS

°: Grados alcohólicos o Guy-Lussac = %v/v de etanol

°Bx: Grados brix.

°C: Grados centígrados.

ACP: Análisis de componentes principales.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

CO₂: Dióxido de carbono.

FA: Fermentación alcohólica.

g: gramos.

g/L: Gramos por litro.

h: Hora.

hL: hectolitros.

H₂S: Sulfuro de hidrógeno o ácido sulfhídrico.

INV: Instituto Nacional de Vitivinicultura.

kb: Kilobase.

LSA: Levadura seca activa.

M: Marcador de peso molecular.

m: Metro.

mb: Megabases.

mg/L: Miligramos por litro.

min: minutos.

mL: Mililitro.

mM: Milimolar.

NPA: Nitrógeno prontamente asimilable.

NS: No-*Saccharomyces*.

OeMv: Observatorio español del mercado de vinos.

OIV: Organización Internacional de la viña y el vino.

pb: Pares de base.

pH: Potencial hidrógeno.

ppm: partes por millón.

rpm: Revoluciones por minuto.

Sc: *Saccharomyces cerevisiae*.

SO₂: Dióxido de azufre IV ó Anhídrido sulfuroso.

spp.: Subespecie.

Ty: Retrotransposon.

v/v: Volumen sobre volumen.

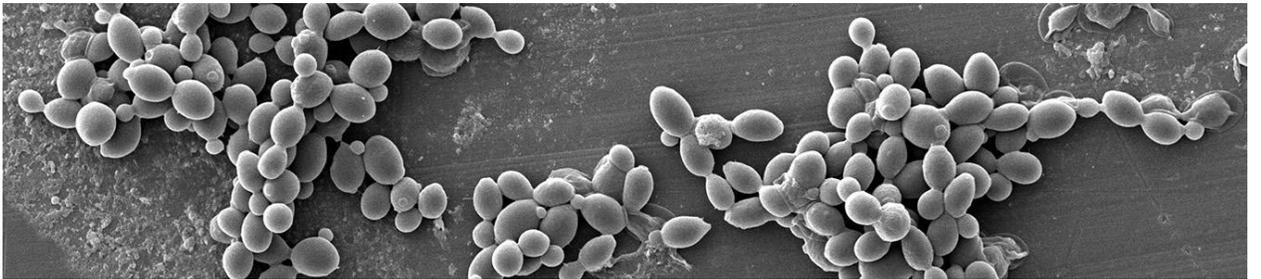
WLN: Caldo Wallerstein Nutriente

YEPD: Yeast peptone dextrose (Extracto de levadura peptona dextrosa).

δ: Delta.

μL: Microlitro.

μM: Micromolar

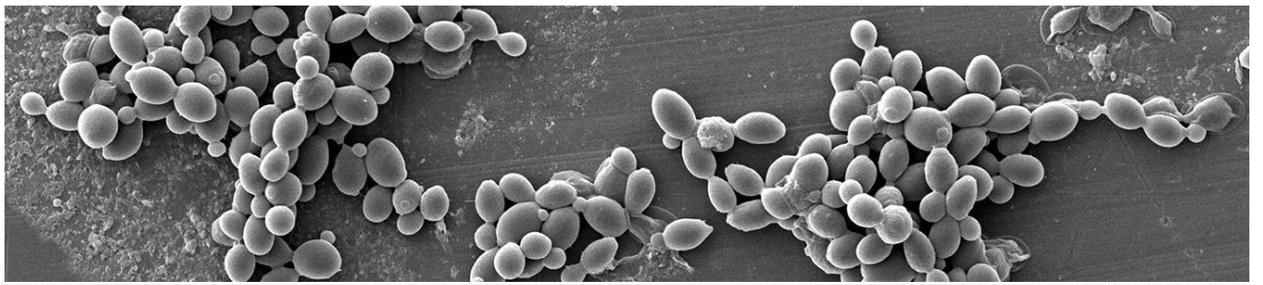


RESUMEN

RESUMEN

San Juan es la segunda provincia productora de vinos en Argentina, donde la comercialización y consumo demanda más calidad y tipicidad de los mismos. Una alternativa para aumentar el potencial de los mostos y dar originalidad a los vinos es tener levaduras nativas seleccionadas del viñedo. Pozo de los Algarrobos es una región vitivinícola reconocida, de características particulares para el cultivo de la vid. Hoy están instaladas bodegas con tecnologías de última generación y con viñedos propios; apuntando a tener su propio *pull* microbiano para realzar las características excepcionales de la zona. El objetivo del presente trabajo fue seleccionar levaduras nativas *Saccharomyces cerevisiae* de Pozo de los Algarrobos- Caucete - San Juan con aptitudes para llevar a cabo la fermentación de variedades blancas de interés enológico. Las levaduras fueron aisladas de fermentaciones espontáneas de mostos de uvas cosechadas aleatoriamente de los viñedos de *Vitis vinífera* variedades Viognier y Chardonnay. Se tomaron muestras al comienzo, mitad y final de la fermentación alcohólica y se sembraron en placas de Petri con medio diferencial WLN. Las levaduras seleccionadas fueron sometidas a las siguientes caracterizaciones: resistencia a etanol (14% v/v), a las dosis de SO₂ agregadas al inicio del proceso (200ppm), capacidad de comenzar a fermentar en mostos con altos niveles de azúcares (28°Brix), y baja producción de H₂S. La identificación molecular intraespecífica se realizó mediante la metodología de PCR interdelta con los cebadores δ 12 y δ 21 mediante el protocolo de Legras y Karst, con el fin de diferenciar polimorfismos y aleatoriedad en la distribución de las cepas seleccionadas. La identificación molecular indicó que estuvieron presentes 13 cepas diferentes en las vinificaciones de Viognier y 12 cepas en Chardonnay. Para el varietal Viognier quedó seleccionada la cepa V22 y para Chardonnay la cepa C14, quienes reunieron las mejores características enológicas y tecnológicas y sus perfiles genéticos no coincidieron con otros aislamientos ni con las cepas comerciales. Se llevó a cabo micro vinificaciones y los vinos obtenidos fueron evaluados sensorialmente por un panel de cata especializado.

Palabras claves: Levaduras, *Saccharomyces cerevisiae*, Viognier, Chardonnay, vino blanco.



INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Historia de Vitivinicultura en la Argentina

La historia de la vitivinicultura argentina se remonta a la época de la colonización, ya que el cultivo de la vid estaba estrechamente unido con las prácticas agrícolas del colono español. A mediados del siglo XVI, los conquistadores llevaron al Cuzco las primeras plantas de vid, de la especie *Vitis vinífera*. Desde allí fue conducida a Chile en 1551 y luego introducida a la Argentina en el año 1556 en la provincia de Santiago del Estero (Pandolfi *et al.* 2004).

Desde esta provincia se propagó el cultivo hacia el centro, oeste y noroeste del país. No existe datos exactos sobre la fecha de implantación de los primeros viñedos en Mendoza y San Juan, aunque algunos historiadores opinan que se realizaron primero en esta última provincia, entre los años 1569 y 1589 (Pandolfi *et al.* 2004).

Favorecida por óptimas condiciones climáticas y de suelo, la vitivinicultura se fue extendiendo, principalmente, en las provincias andinas donde se producían vinos en volumen reducido. A partir de 1853 permitieron la transformación en región vinícola. Con la llegada en 1884 del ferrocarril que vinculaba Mendoza y San Juan con Buenos Aires, las provincias cuyanas asumen el papel de proveedoras de productos frutihortícolas y en especial de vino para abastecer el mercado nacional y muy marginalmente al internacional a través del puerto de Buenos Aires (Pandolfi *et al.* 2004).

Se trata de una actividad económica distribuida en varias zonas argentinas, la cual se extiende al pie de la Cordillera de los Andes a lo largo de 2.400 kilómetros, entre los 22° y 42° de Latitud Sur, desde Salta hasta Río Negro. Cuenta, por ello, con una gran diversidad climática y de suelos que convierten a cada región en un terruño único.

A partir de la década del '90 se inició un proceso de reconversión con la implantación de variedades de alta calidad enológica, tales como Malbec, Bonarda, Cabernet Sauvignon, Syrah, Merlot, Tempranillo, Chardonnay y Sauvignon Blanc, entre otras, generando materia prima adecuada para la elaboración de vinos de gran calidad. Ese proceso de reconversión en viñedos ha sido acompañado por la incorporación de

tecnología en las etapas de producción, elaboración y comercialización, de la mano de recurso humano calificado local (Coviar, 2018).

La superficie de vid implementada en la República Argentina alcanza las 215.169 ha (I.N.V. 2019). Hay 18 provincias argentinas que registran superficie cultivada de vid. El 70,4% del total se encuentra en Mendoza, 21,1% en San Juan, 3,6% en La Rioja, 1,6% en Salta, 1,3% en Catamarca, 0,8% Neuquén y 0,8% Río Negro, siendo estas 7 provincias las que concentran el 99,5% de la superficie de vid del país (Enolife, 2021).

Esta actividad manifiesta un acelerado y sostenido desarrollo, mejorando sus estándares cualitativos tanto en el sector primario como en el industrial, dando lugar a una actividad económica crecientemente sustentable, respetuosa del medio ambiente y de gran importancia social y económica para todas las provincias productoras (Wines of Argentina, 2019).

La región de Cuyo conformada por Mendoza, San Juan y La Rioja concentran el 95% del total de la superficie plantada en el país con 187.501 ha de viñedo. Teniendo en cuenta la trayectoria vitivinícola y el alto grado de desarrollo industrial, la región de Cuyo es considerada la más productiva de Sudamérica y una de las más importante a nivel mundial (Wines of Argentina, 2019).

Según el I.N.V, la República Argentina logró su mayor valor en la historia para las exportaciones de vinos fraccionados, en el 2021 (Tabla 1), con U\$S 817 millones, superando el record anterior logrado en el 2012 de U\$S 786 millones. En un contexto global de crecimiento y recuperación del comercio del vino, según el Observatorio español del Mercado de vinos (OeMv) que superará los niveles de pre pandemia, Argentina no estuvo al margen y fue uno de los países que más creció (I.N.V. 2022).

Tabla 1 Exportaciones argentinas de vinos en hL. Enero-Diciembre 2020-2021 por tipo (I.N.V 2022).

DETALLE	FRACCIONADO			GRANEL			TOTAL VINOS ENE-DIC 21/20		
	2020	2021	Var. % 21/20	2020	2021	Var. % 21/20	2020	2021	Var. % 21/20
Sin mención varietal	285.035	292.793	2,7	1.070.176	405.910	-62,1	1.355.211	698.704	-48,4
Varietal	1.701.814	1.866.807	9,7	861.167	752.009	-12,7	2.562.981	2.618.816	2,2
Espumoso	29.894	43.061	44,0	-	-	-	29.894	43.061	44,0
Otros Vinos*	193	700	263,4	-	-	-	193	700	263,4
TOTAL VINOS	2.016.935	2.203.362	9,2	1.931.343	1.157.919	-40,0	3.948.278	3.361.282	-14,9
Part.% sobre total anual	51	66		49	34				

* Otros vinos: incluye vino especial y vino gasificado

Un gran año para el comercio del vino a nivel mundial, donde Argentina ha conseguido mejoras importantes en las exportaciones de vinos fraccionados, creciendo en volumen y precio en una categoría que aporta valor agregado desde la producción y la industria (I.N.V. 2022).

Argentina fue uno de los cuatro países que pudieron lograr crecimientos de volumen, siendo el que más creció, seguido por Italia, Nueva Zelanda y Portugal. Esto le permitió escalar varios puestos en el ranking mundial de países exportadores de vinos, proyectando pasar al 8º lugar en fraccionados y al 6º en vino a granel, según los últimos datos publicados por el OeMv (I.N.V.2021).

Vitivinicultura en San Juan

San Juan es la segunda provincia en importancia en la producción de vinos en Argentina y comprende diversas regiones, Valles de Tulum, Ullum y Zonda; de Pedernal; de Calingasta; de Iglesia; de Jáchal y de Valle Fértil (Figura 1). La superficie cultivada con uva para vinificar alcanza las 44.923 ha (21% del País), con un total de 4881 viñedos. Es la provincia que tiene mayor diversificación en cuanto a la aptitud de sus variedades.



Figura 1: Valles vitivinícolas de la provincia de San Juan www.winesofargentina.org.ar

En 2020, San Juan elaboró 3.434.370 hl entre vino y mosto sulfitado. El 55% de lo elaborado fue mosto y 45% vino, de este porcentaje de vino elaborado el 50.1% es de vinos tinto y el 48% de vino blanco (Figura 2). La provincia de San Juan es la mayor productora de uva en fresco y pasas del país. El 28,8% de la superficie de vid de la provincia está plantada con variedades de uva con esta aptitud, siendo las que más han aumentado su superficie cultivada en los últimos 10 años en desmedro de las uvas aptas para elaboración que han disminuido hectáreas (I.N.V. 2020).

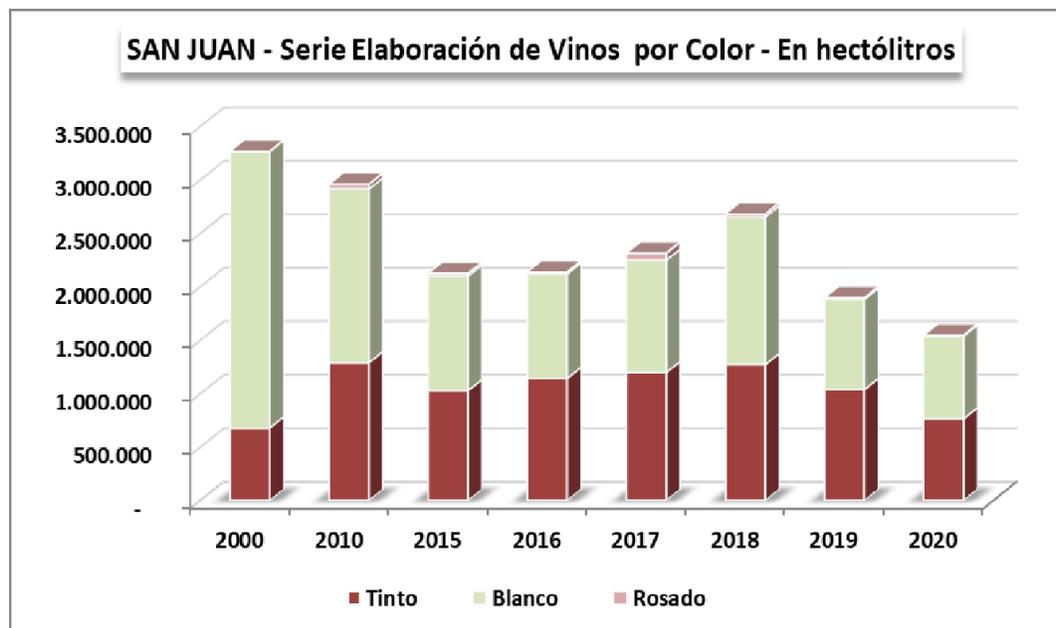


Figura 2 Serie de elaboración de vinos por color en hL. (I.N.V. 2020)

Los datos reportados indican una disminución de la superficie implantada con vid, además se registró una reducción de la producción de uva para vinificar y elaboración de vinos para consumo (I.N.V., 2020).

Panorama del consumo de vinos.

La caída en el consumo de vinos a nivel nacional se acentuó a partir del año 2016, agravándose en el 2018 donde se tocó la menor cifra histórica de 18.7 L per cápita. Durante el 2020 se acentuó la tendencia en el consumo de vino con respecto a otras bebidas, Sergio Villanueva, gerente del Fondo Vitivinícola: menciona que “en la etapa de la pandemia el vino creció mucho, la gente almorzaba y cenaba en sus casas y el precio era razonable para el bolsillo, por debajo del aumento de costos”; Carlos Fiochetta, gerente de la Coviari, “En el 2020 nadie esperaba ese aumento de consumo; llegamos a 950 millones de litros, 60 millones más que el año previo y pudimos volver a 21 litros por personas”, los vinos tintos crecieron un 9% más que el año anterior, con clara tendencia en el mix de consumo respecto del blanco: 78% tintos y 22% blancos (I.N.V. 2020).

En los últimos años, el sector vitivinícola ha experimentado modificaciones en los procedimientos de elaboración en los vinos blancos, debido a que cada vez es un sector más competitivo y debe satisfacer la creciente demanda. Es por ello, que se está empezando a introducir nuevos vinos blancos en el mercado, enfocados en su papel como fuente de placer sensorial: más complejos y atractivos desde el punto de vista aromático (Bercedo, 2020). El aroma es uno de los atributos más importantes que contribuye a la calidad final del vino, y es el resultado de infinitas variaciones en la producción, que va desde la selección de las uvas, a la utilización de diversas técnicas para producir vinos con perfiles de sabor específicos (Bercedo, 2020). Una de estas herramientas es la selección de microorganismos nativos para realizar la fermentación de mostos de uvas.

La uva

La uva, el fruto de la vid (*Vitis vinífera*), es la materia prima con que se elabora el vino a través de la fermentación alcohólica, es una baya carnosa, agrupada en racimos. El racimo está compuesto por dos partes bien diferenciadas: el grano, representando el 95%, y el escobajo, que representa el 5% restante. Este último, constituye la estructura del racimo y cumple funciones de soporte de los granos y de comunicación de éstos con el resto de la planta (Najul, 2015).

Desde el punto de vista botánico, la uva, es una baya carnosa y jugosa, constituida por el epicarpio, llamado hollejo; el sarcocarpio (meso y endocarpio), llamado pulpa y las semillas o pepitas (Figura 3). La proporción de los componentes del grano varía notablemente con la variedad, el grado de madurez, la producción por planta y la marcha climática del año (Oreglia, 1978).

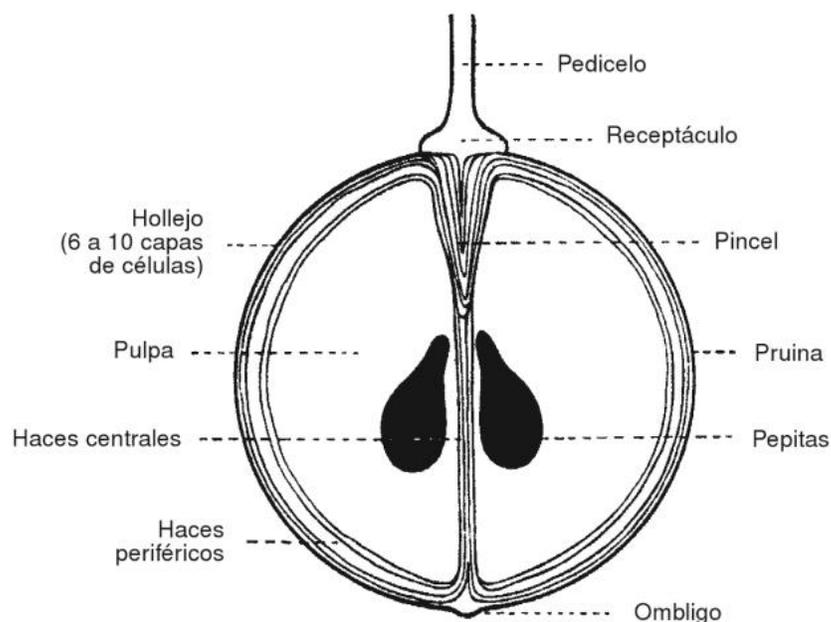


Figura 3 Corte esquemático de un grano de uva (Peynaud, 1999).

El hollejo encierra los demás componentes del grano conformando su límite externo. Tanto los pigmentos antociánicos como las flavonas, están localizados en el hollejo, de ahí que, con las uvas tintas, se pueden elaborar vinos blancos, a condición de separar el mosto de las partes sólidas inmediatamente después de la molienda o de obtenerlo por prensado de la uva entera. El hollejo también posee sustancias tánicas en sus células que se encuentran en vacuolas en forma granular (Najul, 2015). La pulpa, por su parte, tiene cantidades mínimas de sustancias tánicas, por eso, los vinos elaborados sin las partes sólidas del grano (vinificación en blanco) tienen menos contenidos de tanino. Otras sustancias de gran interés enológico son los precursores aromáticos, que están localizados en las células de las capas más internas del hollejo o en las más externas de la pulpa. El hollejo está cubierto exteriormente por una capa de consistencia cerosa, llamada pruina, que lo protege contra la incidencia de los agentes atmosféricos (Vila, 2010).

La pulpa representa del 83 al 92% del peso del grano y es la parte principal, ya que sus células contienen en sus vacuolas prácticamente la totalidad del mosto. La composición química de la pulpa es casi igual a la del mosto, siendo los componentes de mayor interés los azúcares y los ácidos (Oreglia, 1978).

El mosto

El líquido turbio y más o menos viscoso, obtenido por el molido o el prensado de la uva se llama mosto, y constituye la materia prima del vino. Su composición es extremadamente compleja. La densidad del mosto es siempre superior a 1, y está sujeta a las sustancias disueltas o dispersas en él. Su valor nutritivo depende principalmente de la concentración de azúcar (Oreglia, 1978). El pH de los mostos y vinos se encuentra entre 2,8 y 3,8 de acuerdo a la bibliografía, pero en la zona estudiada es poco usual encontrar mostos o vinos de pH 2,8, excepto en uvas verdes. Si bien los valores más frecuentes son de alrededor de 3,4–3,6, es frecuente encontrar mostos con pH 4,0 o superior (Najul, 2015).

Componentes del mosto

- Agua: es el constituyente más importante del mosto de 65 al 90%. Las sustancias contenidas en el mosto sin clarificar están en suspensión (sustancias inertes, microorganismos, fracciones de tejidos), en dispersión coloidal (proteínas, polifenoles, pectinas y enzimas) y solución verdadera (metales, electrolitos, ácidos orgánicos e inorgánicos, sales y azúcares).
- Azúcares: están compuestos por glucosa y fructosa (Figura 4), y provienen del metabolismo primario de la planta y se encuentran en concentraciones entre 170 a 220 g/L. El contenido de estos compuestos en uvas y mostos dependen de factores climáticos y agronómicos que afectan la madurez de los frutos. La fotosíntesis es el proceso por el cual se sintetiza la sacarosa, que luego es hidrolizada por acción enzimáticas en glucosa y fructosa para ser transportadas desde las hojas hasta el racimo en el momento del envero (Bucolo, 2020).

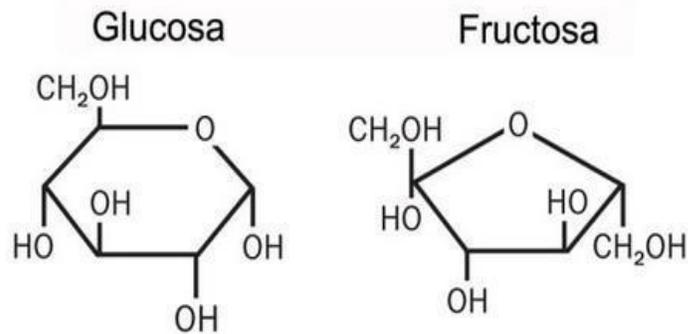


Figura 4 Estructura química de los principales azúcares del mosto (Biotech, 2017).

- Ácidos orgánicos: la acidez del mosto constituye un dato enológico tan importante como la cantidad de azúcares, esta puede variar según el estado de madurez de 3 a 10 g/L, expresado en ácido sulfúrico. La acidez de la uva madura se debe en primer lugar a la presencia de tres ácidos: tartárico, málico y cítrico. La proporción de los otros ácidos que pueden estar presentes es relativamente baja, pero aquellos son numerosos: ácido ascórbico, fumárico, galacturónico, pirúvico, glicérico, glicólico, glucurónico, oxálico, entre otros (Ribereau-Gayon *et al.* 1989).
- Materias minerales: las materias minerales de las diferentes partes del racimo y de la pulpa son las mismas que las de otros órganos vegetales. El potasio es el elemento principal, representa en óxidos el 50% de las materias minerales de las cenizas. Luego el calcio, siempre más abundante que el magnesio. El ácido fosfórico es el anión más importante (Ribereau-Gayon *et al.* 1989).
- Sustancias nitrogenadas: el nitrógeno de la pulpa representa la cuarta o quinta parte del nitrógeno total del grano. El contenido de compuestos nitrogenados en uvas y sus mostos dependen del grado de madurez, de las condiciones del suelo, climáticas, fertilización del suelo, la sanidad de las plantas, entre otros. Las materias nitrogenadas se encuentran en el mosto en forma amoniacal y en forma orgánica, constituida por aminoácidos, polipéptidos, proteínas, manoproteínas, vitaminas, donde los aminoácidos y el ion amonio conforman el nitrógeno prontamente asimilable por las levaduras (Bucolo, 2020). Los compuestos nitrogenados son muy importantes para obtener una población

saludable de levaduras y así lograr una fermentación vigorosa y completa. Se necesitan alrededor de 120 a 140 mg/L de N fácilmente asimilable para poder completar una fermentación alcohólica (Najul, 2015).

Producción de vino

Se considerará vinos a los productos obtenidos por la fermentación alcohólica total o parcial de los azúcares naturales de la uva fresca o del mosto virgen, de uvas provenientes de la especie *Vitis vinífera L.* (Resolución N° C.71 Instituto de Vitivinicultura INV 24/01/1992), elaborado en la zona de producción de la uva (Ley Nacional N°14878, artículo N°17 (a) año 1959). A través de la fermentación alcohólica las levaduras convierten los azúcares naturales de la uva en etanol, CO₂ y otros productos (Najul, 2015).

Proceso de vinificación en blanco

Entendemos por vinificación en blanco la fermentación del mosto de uvas blancas o tintas en ausencia de los hollejos y semillas.

La vinificación es el conjunto de operaciones llevadas a cabo para transformar en vino los mostos de uvas blancas, tintas o rosadas. Las etapas de la vinificación varían según el tipo de vino, los principales procesos involucrados en la elaboración de vinos blancos son (Figura 5):

- *Cosecha*: En todo el hemisferio sur la vendimia o cosecha de la uva para vinificar se realiza desde mediados de enero hasta finales de abril dependiendo de la variedad y de la región de procedencia de la uva. La vendimia debe contener uvas maduras y sanas excluyendo hojas y sarmientos. Puede ser manual o mecánica (Achigar, 2017).
- *Despalillado*: Los granos de uva se separan del escobajo (parte verde del racimo). Esta operación se realiza mediante aparatos mecánicos (despalilladoras) que tienen un cilindro perforado en el cual gira un eje con

paletas que extrae los escobajos por el extremo, el jugo, la pulpa y los hollejos pasan a través de las perforaciones (Achigar, 2017).

- *Estrujado*: Los granos pasan por rodillos acanalados donde se rompe el hollejo de la uva permitiendo la liberación de la pulpa y el jugo. El estrujado debe ser leve para evitar que se rompan las semillas ya que esta ruptura otorga un sabor muy astringente que puede afectar la calidad del vino (Achigar, 2017).
- *Maceración*: consiste en dejar reposar el mosto junto con los hollejos durante un tiempo determinado. De esta manera el mosto adquiere características de los hollejos. En la elaboración de vinos blancos, este proceso suele ser inexistente, o durar tan solo unas horas (12 a 16 h) y se produce a baja temperatura controlada, para evitar el inicio del proceso de fermentación. En caso de la maceración en blanco, luego de transcurrido el tiempo se debe escurrir el mosto separándolo de las partes sólidas de la uva (prensado) (Achigar, 2017).
- *Encubado*: es la conducción del mosto escurrido por medio de bombas a las piletas o vasijas de vinificación. Las vasijas pueden ser de distintos materiales: madera, hormigón o acero inoxidable; estas últimas son las más utilizadas en la actualidad, destacando su buena hermeticidad, su fácil mantenimiento y un buen intercambio térmico (Achigar, 2017).
- *Fermentación*: Es la etapa más importante de la vinificación. El objetivo principal es la transformación total de los azúcares en alcohol. Es consecuencia de la actividad de las levaduras que pueden ser comerciales o nativas. La temperatura de fermentación para vinos blancos varía en un rango de 15°C a 20°C. El proceso se completa cuando la cantidad de azúcares reductores es inferior a los dos gramos por litro (Achigar, 2017).
- *Descube*: Es el vaciamiento de la vasija de fermentación, separando el vino nuevo de las borras de fermentación que precipitan en el fondo.
- *Crianza*: el proceso llamado crianza, consiste en estacionar los vinos en barricas de madera (generalmente roble francés o americano), lo cual permitirá que el vino se enriquezca en aromas, sabores y estructura. La crianza en barricas, además, favorece la estabilización del color (Achigar, 2017).

- *Estabilización, filtrado y embotellado*: el vino se somete a bajas temperaturas para disminuir la concentración de bitartratos potásicos y con la incorporación de clarificantes de naturaleza coloidal se arrastra hacia el fondo de la vasija aquellos elementos en suspensión no deseados en el vino. La filtración es la retención de las partículas que contiene el vino estabilizado mediante su paso por un filtro. Esta operación es complementaria a la clarificación y/o estabilización. El Paso siguiente es el embotellado (Achigar, 2017).

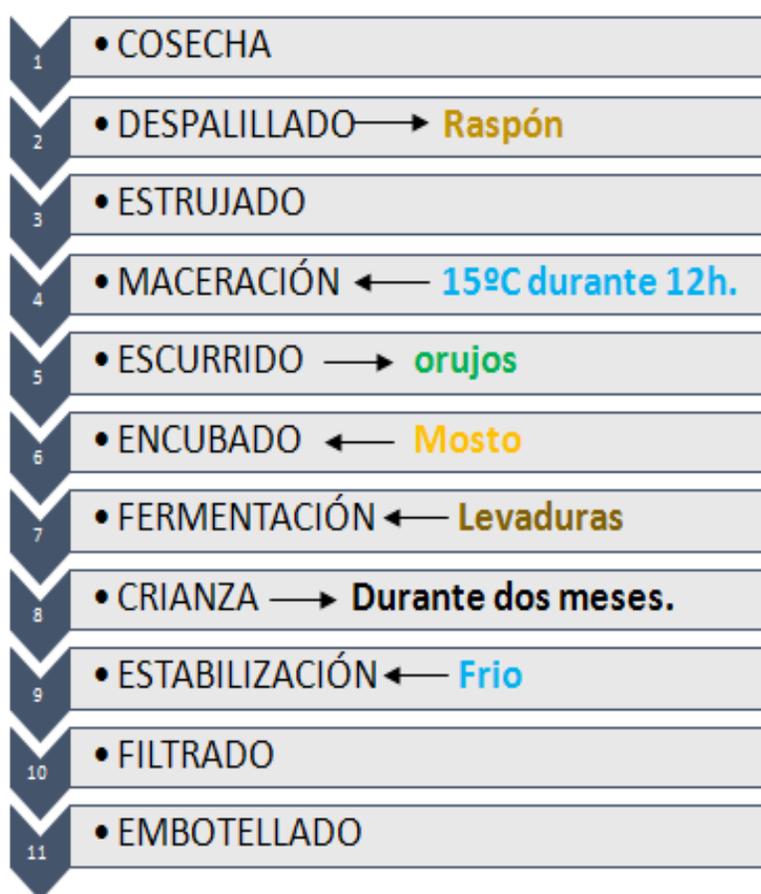


Figura 5 Proceso de elaboración de vinos blancos.

Fermentación alcohólica

El nombre de fermentación se dio en principio a los fenómenos de descomposición de la materia orgánica con rápido y tumultuoso desprendimiento de gas, y la raíz del

nombre procedía del verbo hebraico *fervere*, que significa hervir (Suarez Lepe *et al.* 2021).

El descubrimiento de las levaduras nos transporta a 1680. Leeuwenhoek, observó y describió glóbulos en la cerveza; en 1789 Lavoisier, contribuyó a comprender las reacciones químicas durante la producción de alcohol a partir de la caña de azúcar. Pero no sería hasta 1857 que Louis Pasteur explicaría el proceso de fermentación, donde los agentes responsables eran las levaduras y describió el papel clave de estos microorganismos como responsables de la fermentación alcohólica (Solari *et al.*, 2018).

Las fermentaciones de alimentos se remontan al menos a 4000 años a C. En el siglo XVI, el comienzo de la industrialización se marcó con las intervenciones tecnológicas en la producción de alimentos y bebidas. Sin embargo, fue en los dos últimos siglos cuando se produjeron cambios significativos en el sistema alimentario mundial. Antiguamente, la fermentación de los alimentos estaba destinada a la conservación y mejora del sabor; hoy en día, en la fermentación de alimentos y bebidas se utilizan diversas tecnologías y operaciones con el objetivo de convertir materias primas bastante perecederas e indigeribles en alimentos y bebidas agradable, con valor añadido y alta estabilidad. La garantía de la calidad y seguridad del producto final es el principal objetivo de las tecnologías aplicadas (Vilela, 2019).

La O.I.V. define al vino como “el alimento natural obtenido exclusivamente por fermentación alcohólica, total o parcial, de uva fresca, estrujada o no, de mosto de uva”, numerosos estudios científicos establecen los beneficios del consumo moderado de vino, incluyendo la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares, cáncer o la mejora de la función cognitiva (Pargas-Dans *et al.*, 2020). Los principales beneficios del vino se asocian a sus componentes polifenólicos, que evitan el envejecimiento prematuro de las células (Zulay, 2021). Los beneficios para la salud humana que se asocian según el tipo de vino, el tinto destaca notablemente por sus potenciales beneficios para el sistema cardiovascular (Miralles, 2018).

En la elaboración de los vinos, una etapa fundamental es la fermentación alcohólica (FA) la cual es una conversión bioquímica que permite degradar los azúcares naturales

del mosto de uva en etanol y dióxido de carbono. La conversión se representa mediante la siguiente estequiometría:



A pesar de parecer, a nivel estequimétrico, una transformación simple, la secuencia de transformaciones para degradar la glucosa hasta dos moléculas de alcohol y dos moléculas de dióxido de carbono es un proceso muy complejo (Vázquez *et al.*, 2007).

Tanto la fermentación como la respiración comparten la misma vía metabólica común: la glucólisis, también denominada vía de Embden - Meyerhof. La glucosa presente en el mosto ingresa al citoplasma celular por diferencia osmótica, a través de los transportadores de membrana. Luego, dentro del citoplasma comienza la glucólisis (Figura 6). La degradación de los azúcares por las levaduras mediante vía glicolítica comprende un conjunto de reacciones enzimáticas que permiten transformar la glucosa en ácido pirúvico (Mestre, 2017).

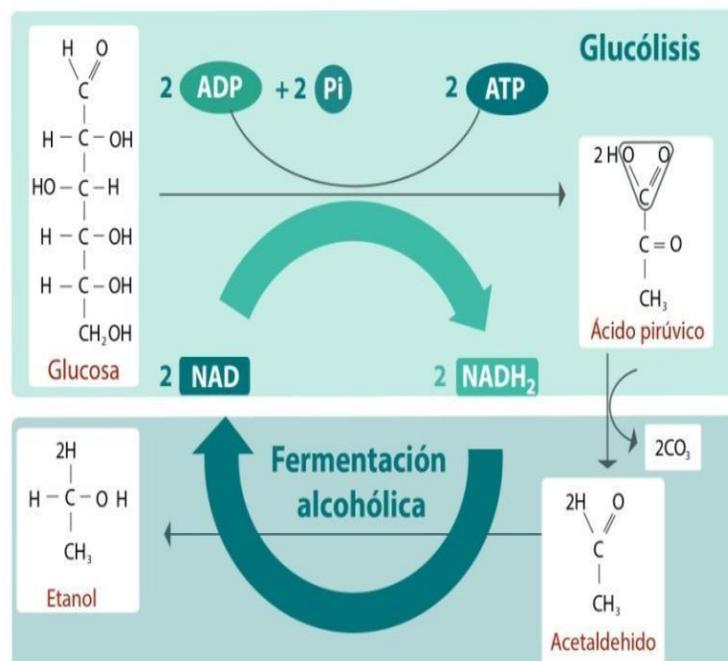


Figura 6 Esquema simplificado de la conversión de azúcares en alcohol (biología.edu.ar).

Posteriormente, dependiendo de la presencia o ausencia de oxígeno en el medio, el ácido pirúvico es el punto de partida para llevar a cabo la fermentación alcohólica (ausencia de Oxígeno) o la respiración (presencia de oxígeno).

La FA en condiciones enológicas se efectúa de manera muy específica: anaerobiosis, pH bajo, alta concentración de azúcar inicial, y agentes fermentativos como las levaduras para obtener concentraciones de alcohol al finalizar el proceso.

Durante este proceso intervienen diferentes géneros de levaduras, aportando distintas características sensoriales al vino. El género *Saccharomyces* destaca por su mayor eficiencia en la conversión de azúcares y su tolerancia a concentraciones elevadas de etanol y SO₂, y es el género fermentativo por excelencia (Miranda-Castilleja *et al.*, 2015).

La FA puede ocurrir de tres formas (Fleet, 2003):

- 1) Espontánea, desde la microbiota presente de manera natural en el epicardio de la uva o en equipos y superficies de la bodega; ésta realza la tipicidad del vino debido a las características únicas aportadas por los microorganismos nativos.
- 2) Adicionando levadura seca activa (LSA), lo cual brinda un proceso reproducible y controlable, pero le resta tipicidad al producto.
- 3) Inoculación con levaduras nativas seleccionadas, las cuales permitirán procesos controlables y reproducibles, sin que los vinos pierdan el carácter único y típico que los microorganismos nativos proporcionan.

Durante la fermentación espontánea de los mostos se produce una sustitución secuencial de distintas especies de levaduras (Figura 7). Inicialmente, cuando el grado alcohólico es bajo, predominan las levaduras apiculadas, producen bajo contenido de etanol, también pueden producir importantes concentraciones de ácidos y otros compuestos volátiles. Predominan los géneros *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Cándida*, *Rhodotorula*, *Kluyveromyces* y *Pichia*. Estas levaduras aseguran el inicio de la fermentación, aunque son muy sensibles al anhídrido sulfuroso (antiséptico utilizado en enología, único autorizado por el I.N.V.), además pueden tener poca tolerancia al

etanol, de manera que su participación es reducida cuando las vendimias han sido muy sulfitadas (Belda *et al.*, 2014). Son las levaduras no-*Saccharomyces* (NS), vocablo utilizado en el mundo de la enología para referirse a muchas especies diferentes de levaduras (Checa, 2020).

La presión selectiva a lo largo del proceso fermentativo (disminución gradual de los nutrientes y oxígeno, como así también, el aumento de la concentración de alcohol en el medio) determina la sucesión de las poblaciones microbianas en el vino. Se favorece el dominio de aquellas especies que presentan el metabolismo fermentativo más eficiente, principalmente *S. cerevisiae*, junto con una mayor resistencia al grado alcohólico. Por ello, esta especie suele ser la que lleva a cabo la mayor parte del proceso fermentativo (Pretorius, 2000).

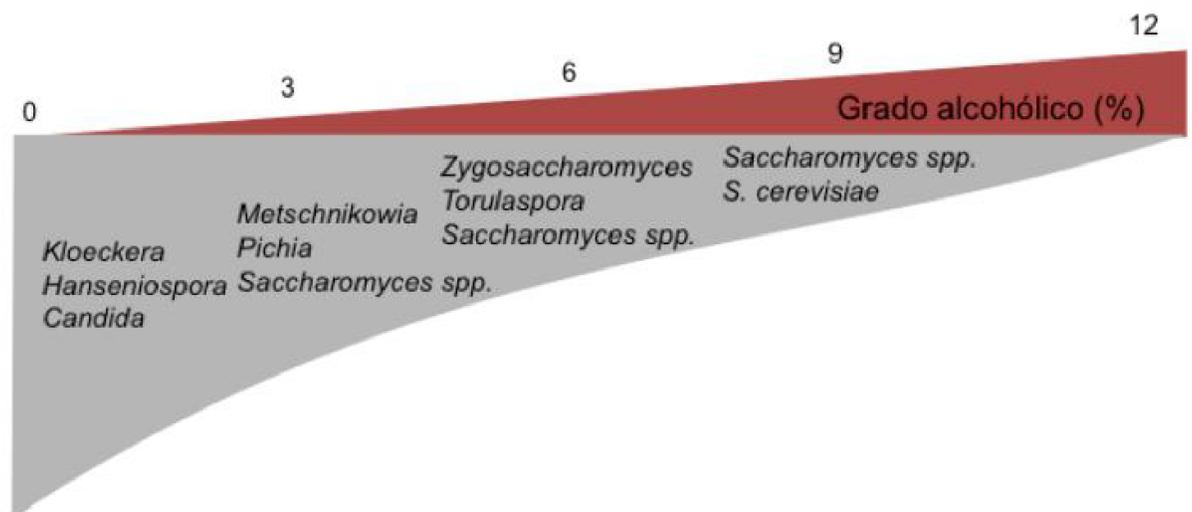


Figura 7 Sucesión de especies durante el proceso de vinificación conforme aumenta el grado alcohólico en el vino (Belda *et al.* 2014).

En un proceso de vinificación la contribución de una levadura a las características organolépticas finales del vino puede deberse a diferentes aspectos: liberación de etanol y otros solventes al medio que favorecen la extracción de los componentes aromáticos contenidos en la uva, la producción de una gran variedad de metabolitos aromáticos (alcoholes, ésteres, aldehídos, compuestos volátiles sulfurados, etc.) y la

liberación de enzimas capaces de transformar compuestos aromáticamente neutros de la uva (los denominados precursores) en compuestos aromáticos (Belda *et al.*, 2014).

La selección de cepas de levadura procedentes de viñedos de la zona permite mantener las cualidades de las fermentaciones espontáneas, con la seguridad y reproducibilidad que requieren las fermentaciones industriales. Una selección de levaduras nativa adecuada no solo garantizará un proceso de fermentación exitoso, si no que contribuirá a la producción de vinos con características sensoriales marcadas y diferenciadas propias de cada región vitivinícola (Belda *et al.*, 2014). Durante todo el proceso de vinificación, las levaduras están presentes y se van desarrollando, aportando características propias de cada una y marcando la diferencia que permite apreciar que un vino es diferente de otro.

Levaduras

Anton van Leeuwenhoek (1632-1723) fue la primera persona que observó y describió las levaduras al tomar muestras de cerveza, que examinó a través de su primitivo microscopio de lente simple. Aunque, fue más tarde, cuando Louis Pasteur (1822-1895) habiendo realizado estudios detallados sobre la fermentación en vinos y cerveza, concluyó que las levaduras eran las responsables de convertir el azúcar en etanol y dióxido de carbono, cuando eran obligados a vivir en condiciones anaerobias (Ferrer Piquer, 2018).

Los hongos constituyen un gran grupo de organismos, diversos y muy extendidos, que incluyen a los mohos, las setas y las levaduras. La mayoría de los hongos son microscópicos y terrestres, que habitan en suelos, o en materia vegetal muerta y cumplen una importante función en la mineralización del carbono orgánico. Los hongos se reproducen de modo asexual por alguna de estas tres maneras distintas: mediante el crecimiento y extensión de las hifas filamentosas; mediante la producción de esporas asexuales o por simple división celular como en las levaduras con yemas. La mayoría de los hongos también forman esporas sexuales como parte de un elaborado ciclo vital (Madigan *et al.*, 2015).

Taxonómicamente pertenecen al Dominio Eukaryota, forman parte del reino Fungi y se dividen en los Phylum Ascomycota, Basidiomycota, Zygomycota y Chytridiomycota. (Kurtzman et al., 2011), el grupo de interés Ascomycota es un grupo grande y variado de hongos, que van desde especies unicelulares como las levaduras *Saccharomyces* (Figura 8) hasta especies de crecimientos filamentosos como el *Aspergillus* (Madigan et al., 2015). Generalmente las levaduras, ya sean ascomicetos o basidiomicetos, se caracterizan por su crecimiento asexual que se produce predominantemente por gemación o fisión, y que no forman sus estados sexuales dentro o sobre un cuerpo fructífero. Los estudios taxonómicos describen hasta 149 géneros de levaduras y más de 1500 especies, de las cuales 40 han sido aisladas en el mosto y durante su fermentación (Escribano Viana, 2021).

Las levaduras que se encuentran en el ambiente enológico pueden dividirse en dos grandes grupos: los pertenecientes al género *Saccharomyces*, representadas principalmente por *S. cerevisiae* y las levaduras denominadas no-*Saccharomyces*, caracterizadas por su limitado poder fermentativo (Escribano Viana, 2021).

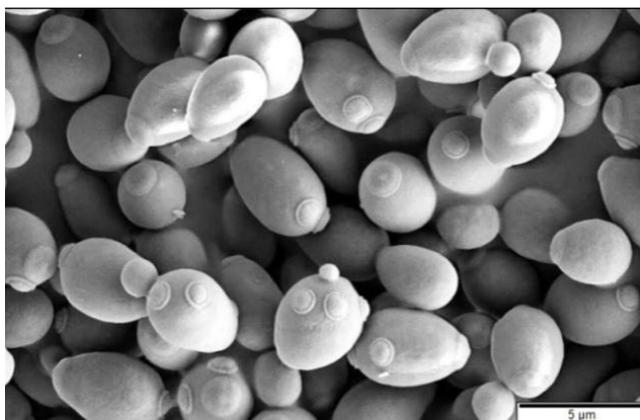


Figura 8 Levaduras vista bajo microscopio electrónico de barrido. www.vinetur.com

Las levaduras no-*Saccharomyces* que están presentes en el mosto y durante la FA pueden clasificarse en tres grandes grupos: grupo uno, levaduras aerobias como *Pichia spp.*, *Debaryomyces spp.*, *Rhodotorula spp.*, *Candida spp.*; grupo dos: las levaduras apiculadas con baja actividad fermentativa como *Hanseniaspora* especies *uvarum* y *guilliermondii* u *occidentalis* y el grupo tres incluye las levaduras con metabolismo

fermentativo como *Kluyveromyces marxianus*, *Torulaspota delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* y *Zygosaccharomyces bailli* (Escribano Viana, 2021). El conocimiento de las levaduras responsables de la fermentación y su cinética de crecimiento es esencial para comprender el impacto de éstas en la calidad del vino (Sánchez, 2021).

El crecimiento de las levaduras durante la FA (Figura 9) está definido por diferentes fases de desarrollo: latencia, aceleración, crecimiento exponencial, ralentización del crecimiento, estacionaria y declive (Escribano Viana, 2021).

- Fase de latencia: período de aclimatación de las levaduras al nuevo ambiente, durante el cual el número de microorganismos no sufre modificación (Suárez Lepe *et al.* 2021).
- Fase de aceleración: las levaduras comienzan a multiplicarse (Escribano Viana, 2021). En esta fase se va acortando el tiempo de generación, que es el tiempo que una célula tarda en dividirse. Cuando ese tiempo llega a ser el mínimo es el momento en el que entra en la siguiente fase (Suárez Lepe *et al.*, 2021).
- Fase de crecimiento exponencial: el número de divisiones celulares crece durante unas horas con progresión geométrica. La longitud de esta fase varía dependiendo de las especies de microorganismos y con las condiciones ambientales (nutritivas y físico-químicas) (Suárez Lepe *et al.*, 2021).
- Fase de ralentización del crecimiento: corresponde con la última parte de la fase anterior en la que, debido a los factores limitantes del medio, las levaduras dejan de crecer (Escribano Viana, 2021) y el tiempo de generación comienza a alargarse (Suárez Lepe *et al.*, 2021).
- Fase estacionaria: en esta fase se establece un cierto equilibrio entre división y muerte celular, de forma que el número de levaduras vivas en esa población permanecen constante. Se empieza a poner de manifiesto un conjunto de situaciones desfavorables (agotamientos de nutrientes, aparición de productos perjudiciales para el crecimiento, originados por su propio metabolismo, modificaciones del pH, potencial redox, etc. (Suárez Lepe *et al.*, 2021).
- Fase de declive: la población de las levaduras disminuye rápidamente, produciéndose una importante reducción de la población de células vivas. las

células mueren y por autólisis comienzan a secretar al medio las sustancias que contienen (Escribano Viana, 2021).

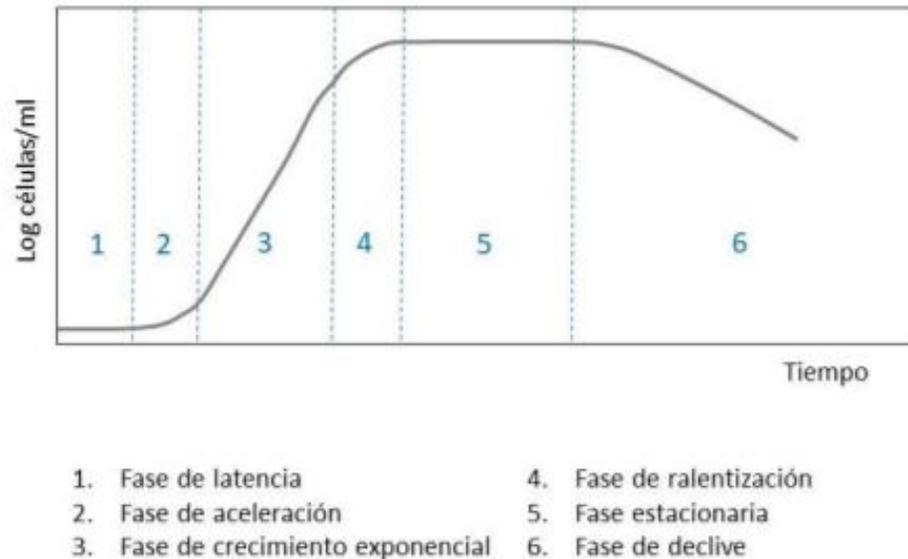


Figura 9 Fases de desarrollo de las levaduras durante la fermentación alcohólica (Escribano Viana, 2021).

Habitualmente se relaciona la palabra levadura directamente con el proceso de fermentación, más concretamente con el del pan, la cerveza y el vino. Por lo que es común el considerar a las levaduras como hongos fermentativos. De hecho, muchas veces se ha tratado a las levaduras como sinónimo de *Saccharomyces*. Sin embargo, como ya se ha mencionado, no todas las levaduras tienen capacidad de fermentar (Kurtzman et al., 2011).

Poseen un metabolismo aeróbico como anaeróbico, utilizan el metabolismo aeróbico (respiración) para producir gran cantidad de biomasa y una vez que las concentraciones de oxígeno disminuyen, realizan un proceso anaeróbico (fermentación), donde todos los cambios organolépticos que sufre el mosto hasta convertirse en vino suceden durante esta etapa, fruto en gran medida de los metabolitos que surgen del crecimiento microbiano durante la fermentación (Gutiérrez Fernández de Pierola, 2018).

Saccharomyces cerevisiae: es una especie de levadura que presenta células de forma elipsoidal, su reproducción vegetativa se realiza por brotación o gemación multilateral y su fase vegetativa es predominantemente diploide. Una fase vegetativa

haploide puede generarse únicamente en las cepas heterotálicas, después de la meiosis y la germinación de ascosporas (Pretorius, 2000). El genoma de una cepa tipo de *S. cerevisiae* de laboratorio ha sido completamente secuenciado, presentando aproximadamente 6000 genes que codifican para proteínas. Este genoma es relativamente pequeño y rico en guanina y citosina con pocos elementos repetitivos y pocos intrones, lo que lo hace mucho más compacto comparado con el de otras células eucariotas (Pretorius, 2000). Las cepas haploides contienen aproximadamente 12-13 mb de ácido desoxirribonucleico (ADN) nuclear distribuido en 16 cromosomas lineales cuyos tamaños varían entre 250 y 2000 kb. La mayor parte de las cepas de *S. cerevisiae* usadas en laboratorio son haploides o diploides, sin embargo, las cepas industriales de esta especie suelen ser diploides o poliploides. La poliploidía confiere ventajas para adaptarse a condiciones ambientales variables mediante el incremento del número de genes importantes para la fermentación (Massera, 2010).

Selección de levaduras nativas con propiedades enológicas

Desde sus orígenes, el vino se ha elaborado a través de la microbiota natural presente en la superficie de la uva y asociada a las superficies de las instalaciones de la bodega. Hasta finales del siglo XIX en las bodegas se prescindía del uso de cultivos puros de levadura como inóculos en las fermentaciones (Achigar, 2017).

El botánico y enólogo Müller-Thurgau (1850-1927) fue quien, en 1890, introdujo el método de inocular el mosto con levaduras iniciadoras (Achigar, 2017) y a mediados de la década de 1960, aparecieron en el mercado las primeras Levaduras Secas Activas (LSA) como inóculos para la elaboración de vino. Con una inoculación adecuada de la LSA y adición de SO₂ al jugo de uva, los enólogos lograban establecer el control microbiológico del proceso lo que no era posible en fermentaciones espontáneas. Los vinos obtenidos bajo esta modalidad de trabajo poseen reproducibilidad y calidad homogénea a lo largo de las diferentes vendimias. Sin embargo, algunos productores siguen apostando a la fermentación espontánea bajo el concepto de aumentar la complejidad en el vino (Mestre, 2017).

El predominio de las especies de *S. cerevisiae* y su especial relevancia en el éxito del proceso de vinificación ha provocado que la tecnología de los cultivos iniciadores se desarrollara, en inicio, exclusivamente en torno a estas especies. A la hora de innovar en cuanto a nuevas cepas iniciadoras de fermentación existen dos posibilidades: la selección de nuevas cepas de acuerdo a ciertos criterios definidos y la mejora genética de las ya existentes. La selección de nuevas cepas implica la búsqueda de levaduras directamente en las uvas y viñedos, así como en las fermentaciones espontáneas. Lógicamente, posterior al aislamiento, es necesario un proceso de caracterización enológica que asegure un buen comportamiento de cara a su uso (Belda *et al.*, 2014).

Criterios tecnológicos de selección de levaduras nativas

Existen diversos programas de selección de levaduras, donde los principales criterios de selección especialmente para *S. cerevisiae* se pueden asociar en caracteres deseables y caracteres indeseables (Tabla 1).

Tabla 1 Características tradicionalmente empleadas en los programas de selección para levaduras vínicas (Mestre, 2019).

CARACTERES DESEABLES	CARACTERES INDESEABLES
Elevada tolerancia y producción de etanol.	Producción de SO ₂ .
Total degradación de azúcares fermentables.	Producción de H ₂ S.
Resistencia al SO ₂ .	Producción de etil fenoles.
Capacidad de fermentar a bajas temperaturas.	
Producción de enzimas hidrolíticas de interés enológico.	
Fenotipo <i>Killer</i> .	
Poder de floculación.	

Durante el proceso de selección deben considerarse las necesidades particulares de la región y, una vez evaluadas las bondades tecnológicas generales, considerar criterios particulares como la adaptación a bajas temperaturas y producción de aromas, mostos con concentraciones altas de azúcares o requerimientos bajos de nitrógeno asimilable (Miranda-Castilleja *et al.*, 2015).

El nitrógeno es un macronutriente esencial para el crecimiento y metabolismo de las levaduras. Su disponibilidad en el jugo de uvas es fundamental para la creación de los componentes estructurales necesarios para las múltiples generaciones de levaduras. Las concentraciones insuficientes de NPA en los mostos se asocian con fermentaciones lentas o detenidas, mayor duración y bajas velocidades de fermentación y desarrollo de aromas desagradables. Altos niveles de NPA están asociados con una menor duración de la fermentación alcohólica. Se necesita una concentración mínima de 130 – 140 mg/L de NPA para poder completar una fermentación alcohólica (Paladino *et al.*, 2004). Factor importante para seleccionar levaduras es aquellas que requieran de una dosis menor para satisfacer sus necesidades primarias para su reproducción.

Para realizar un buen aislamiento de microorganismos de las bayas y mostos de uvas, hay que tener en cuenta que las levaduras se encuentran en los viñedos repartidas irregularmente sobre los sarmientos, hojas, racimos y en la superficie de los granos de uva maduros; localizándose sobre todo en los estomas y lugares donde existen microfisuras, que pueden exudar hacia el exterior sustancias azucaradas, y en mucha menor cuantía sobre la pruina que cubre el resto del hollejo (Bernardi, 2013).

El número de levaduras encontradas en las bayas depende del estado sanitario de los racimos, de las condiciones climáticas del cultivo y del viñedo, y de los tratamientos fitosanitarios aplicados al mismo, resultando en el orden de 10^3 a 10^5 células por grano de uva (Bernardi, 2013).

Medios de cultivos y formas de conservación de las levaduras

El medio de crecimiento tradicional de extracto de levadura-peptona-dextrosa (YEPD) con agar, a veces abreviado como YPD, es el más comúnmente utilizado para el aislamiento de levadura de uvas, mostos o vinos. Sin embargo, este método es más general que específico, por lo que se pueden cultivar todo tipo de levaduras en él. De modo que se puede utilizar para el recuento total de levaduras. También es muy útil realizar una prueba de cribado preliminar y, a continuación, proceder con la selección e identificación de la especie de levadura (Loira *et al.*, 2019).

Otros medios de uso frecuente en enología para el recuento total de levaduras son el WLN (un medio de crecimiento de levadura diferencial), que permite la identificación de levaduras enológicas en función del color y la morfología de sus colonias. Actualmente, las técnicas de aislamiento disponibles permiten detectar, diferenciar entre levaduras e incluso, en algunos casos, cuantificar las levaduras no *Saccharomyces* (Loira *et al.*, 2019).

Los tres objetivos que hay que alcanzar para conservar correctamente las cepas de levaduras en los laboratorios de microbiología son: que el cultivo a conservar sea puro, evitando que se produzcan contaminaciones durante el proceso de conservación; que durante el tiempo de conservación sobrevivan al menos 70-80% de las células y, por último, que estas células permanezcan genéticamente estables (García López, M. *et al.*, 2000).

En la mayoría de los casos conviene utilizar células maduras del inicio de la fase estacionaria de la curva de crecimiento (García López, M. *et al.*, 2000). La temperatura de conservación debe ser lo más baja posible, se aconseja a -70°C o más. La guarda de las cepas de levadura debe ser en tubos cerrados herméticamente o sellados; con un crioprotector no iónico, como por ejemplo el glicerol al 30%, que protege del daño que se pueda producir en las células microbianas en el momento de la congelación.

Métodos de identificación molecular de levaduras seleccionadas

Los métodos clásicos de identificación de levaduras basados en criterios fisiológicos, morfológicos y bioquímicos no permiten diferenciar adecuadamente entre cepas de una misma especie y pueden arrojar resultados ambiguos debido a que, en muchos casos, las propiedades fisiológicas de los microorganismos son afectadas por las condiciones de cultivo. No obstante, los espectaculares avances en el campo de la Biología Molecular ocurridos años atrás, han permitido el desarrollo de nuevas y más poderosas herramientas para la diferenciación entre especies, así como entre cepas de una misma especie, de levaduras vínicas muy relacionadas entre sí (Chimeno, 2015).

La OIV (Organización Internacional de la Viña y el Vino), recomienda adoptar herramientas de biología molecular para identificar tanto las levaduras de vinificación (*S. cerevisiae*) como otras especies de levaduras relacionadas con la vinificación. En métodos dependientes de cultivos para la identificación de levaduras de vinificación a nivel cepas recomienda: Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) del ADN mitocondrial (ADNmit); Amplificación de secuencias Delta (δ) y Genotipado por microsatélites (Resolución OIV-OENO 408-2011).

Desde su descubrimiento por Kary Mullis en el 1983 la PCR ha conocido numerosas aplicaciones para la identificación de diferentes especies de plantas y bacterias; es una técnica para síntesis *in vitro* de secuencias específicas de ADN. Es una forma simple y muy rápida de amplificar uno o varios fragmentos de genes (Figura 10). La reacción está basada en la hibridación de dos oligonucleótidos que encuadran una región central sobre una doble cadena de ADN o matriz. Estos oligonucleótidos tienen secuencias diferentes y son complementarios de las secuencias que se encuadran en el fragmento a amplificar. (Chimeno, 2015).

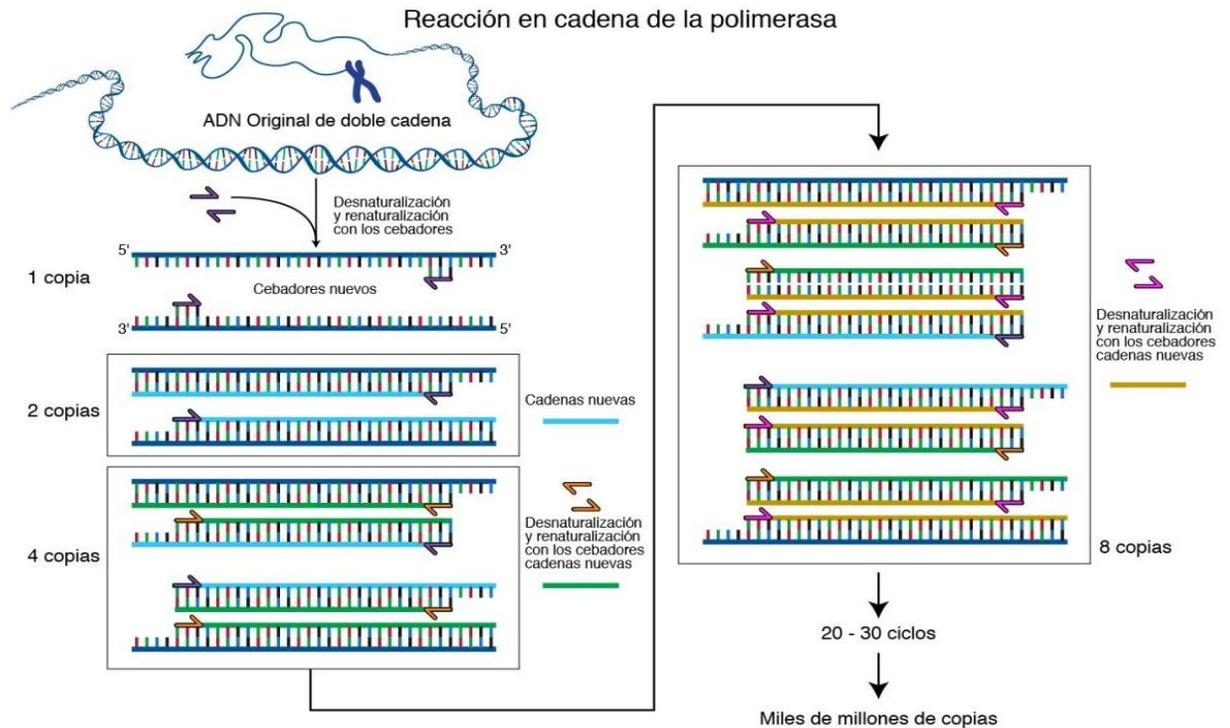


Figura 10 Representación gráfica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (www.genome.gov/es/genetics).

Para el presente trabajo se decidió utilizar la técnica de Amplificación de secuencia Delta (δ), que permiten obtener marcadores ampliamente polimórficos para *S. cerevisiae*, además de ser una metodología sencilla y robusta. Por otro lado, cabe mencionar que es una herramienta ampliamente utilizada en la caracterización de cepas de origen vínico (Chimeno, 2015).

Las secuencias δ son elementos de 0,3 kb que flanquean los retrotransposones Ty1. Cerca de 100 copias de δ están presentes en el genoma de levadura como parte de retrotransposones Ty1 o como elementos aislados. Sin embargo, estas secuencias δ están concentradas en regiones genómicas contiguas a los genes ARNt. La estabilidad de los elementos δ permitió el desarrollo de los cebadores específicos ($\delta 1$ y $\delta 2$) y su uso para la identificación de cepas de *S. cerevisiae* a nivel industrial mediante la amplificación de las secuencias Interdelta (Ness *et al.*, 1993) (Figura 11).

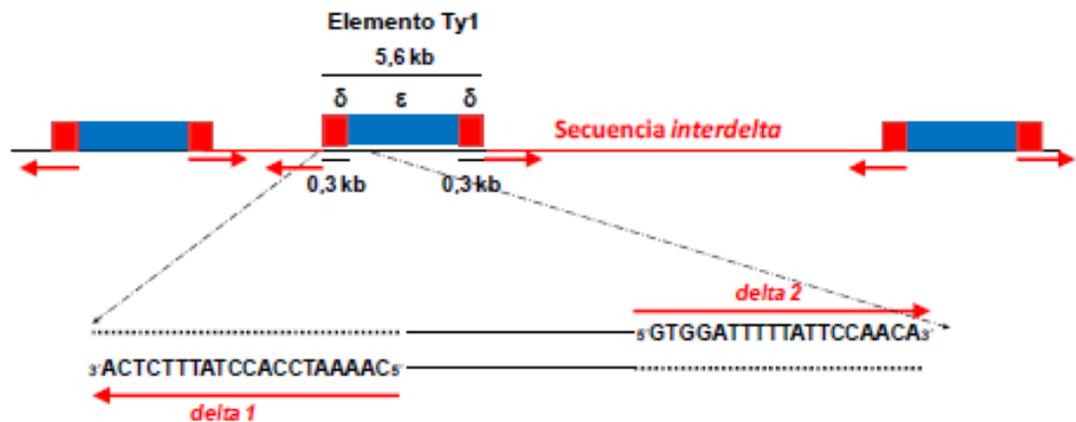


Figura 11 Amplificación de las secuencias interdelta del genoma de *S. cerevisiae* empleando los primers delta 1 y delta 2.

La estabilidad de los elementos δ indican que esta técnica es altamente confiable para la identificación de cepas *S. cerevisiae* a nivel industrial (Vázquez *et al.*, 2016), Legras y Karst (2003), con el diseño de nuevos cebadores ($\delta 12$ y $\delta 21$) mejoraron la técnica, ya que estos cebadores revelaban mayores polimorfismos, que se reflejaban con la aparición de un mayor número de bandas, como consecuencia, se conseguía diferenciar un mayor número de cepas. Además, se estandarizó las concentraciones de ADN para prevenir la influencia de las concentraciones en el perfil de bandas obtenidos.

Ciani *et al.* (2004), obtuvo perfiles de amplificación con menos bandas muchos más estables empleando temperaturas de hibridación de 55°C para la caracterización de cepas de *S. cerevisiae* (Massera, 2010).

Levaduras nativas seleccionadas para uso enológico.

El uso de cepas de levaduras nativas que posean características enológicas adecuadas y también estrechamente relacionado con el territorio del viñedo, es deseable por su mejor adaptación a las condiciones medioambientales y puede contribuir al mantenimiento de las propiedades sensoriales "típicas" de los vinos de cada región específica (Belda *et al.*, 2014; Achigar, 2017).

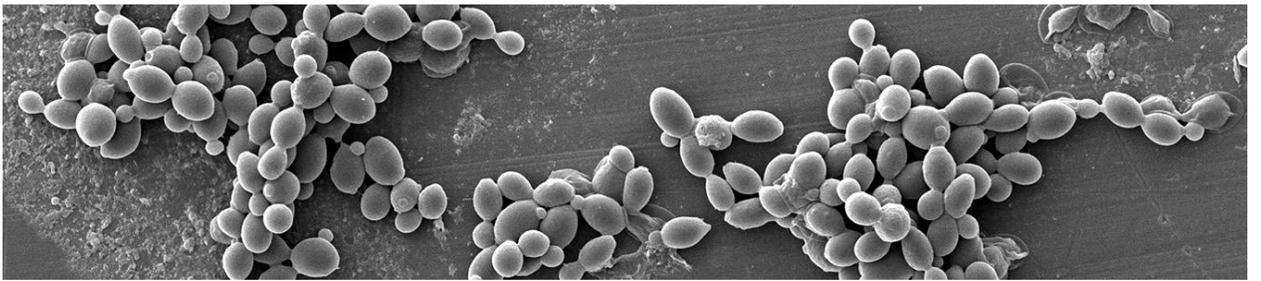
En la industria vitivinícola uno de los avances tecnológicos más importante es el control microbiológico del proceso fermentativo por inoculación masiva del mosto de uva con cultivos seleccionados de cepas de *S. cerevisiae*. El desarrollo de la fermentación se considera prácticamente realizado por el inóculo seleccionado, obteniéndose vinos con características estandarizadas y predecibles, garantizando un comienzo y final de fermentación controlada (Castrillo Cachón, 2018). Hay que tener en cuenta las posibles interacciones entre el cultivo iniciador con la microbiota autóctona del mosto, aunque se trate de una cepa comercial de *S. cerevisiae* inoculada como LSA, no está absolutamente garantizada su implantación.

La microflora autóctona está compuesta por varios géneros y especies de levaduras que dependen de varios factores como la variedad de la uva, el estado y sanidad de la uva en el momento de la vendimia, las condiciones ambientales como la temperatura, lluvia y suelo, y los tratamientos fitosanitarios.

Ante la falta de trabajos realizados sobre aislamientos de levaduras nativas *S. cerevisiae* de uvas blancas, y en especial de variedades Viognier y Chardonnay, se propuso como una opción favorable la selección y caracterización de las mismas, apuntado a mejorar y realzar las bondades del vino varietal blanco y promover el consumo de un vino con características únicas.

La zona de estudio está inserta en una Identificación Geográfica, donde se busca poner en valor el origen y la identidad de los productos regionales, la selección de levaduras autóctonas configura una innovación tecnológica con potencial para ampliar la calidad y características y fortalecer la tipicidad de los vinos. El estudio ecológico es importante para descubrir y explotar el potencial enológico oculto en la biodiversidad de levaduras en las regiones vitivinícolas.

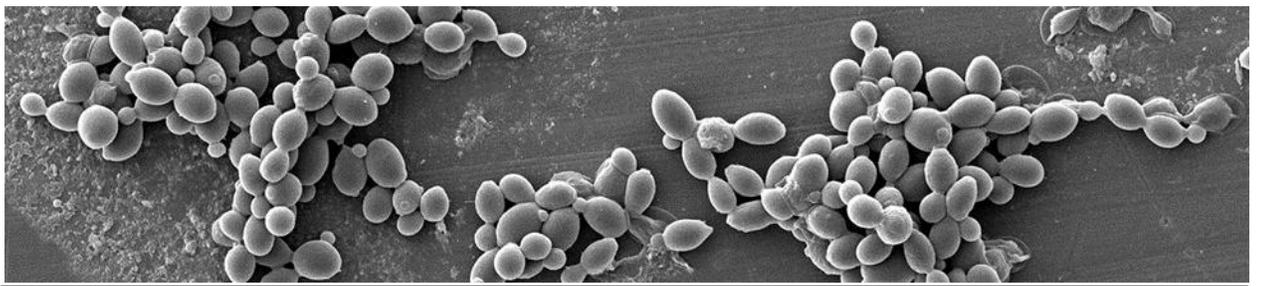
Sobre esta base y mediante el establecimiento de un programa de selección detallada, se podrá cumplir con los objetivos propuestos en este trabajo, de aislamiento y caracterización de cepas de levaduras nativas de *S. cerevisiae* de uvas de variedades Chardonnay y Viognier de viñedos de Pozos de los Algarrobo – Caucete.



HIPÓTESIS

HIPÓTESIS DEL TRABAJO

Las levaduras nativas seleccionadas para vinificación de variedades blancas logran implantarse con éxito en el proceso fermentativo y producen vinos con un perfil organoléptico determinado otorgando características genuinas que distinguen los vinos de la región.



OBJETIVOS

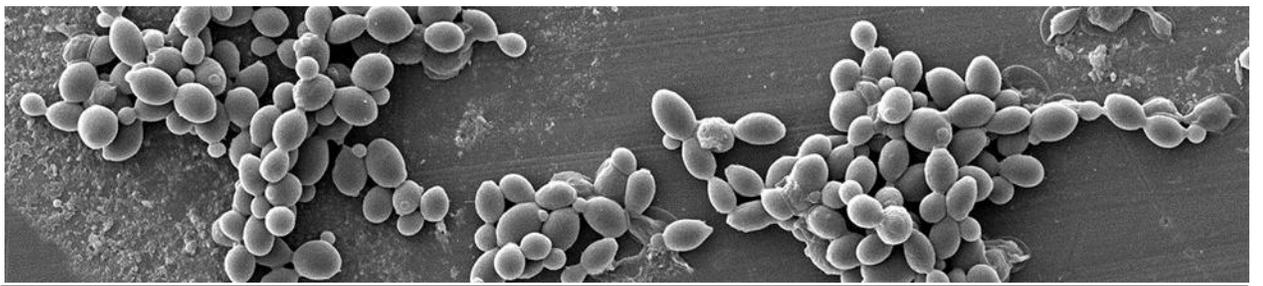
OBJETIVOS

Objetivo general

Seleccionar levaduras nativas *Saccharomyces cerevisiae* de Pozo de los Algarrobos-San Juan con aptitudes para llevar a cabo la fermentación de variedades blancas de interés enológico.

Objetivos específicos

- Aislar levaduras nativas *Saccharomyces cerevisiae* de variedades blancas distintivos de la región: Viognier y Chardonnay.
- Seleccionar levaduras nativas *S. cerevisiae* de acuerdo a caracteres fisiológicos y aptitudes enológicas para vinificar mostos de uva de la región.
- Comparar molecularmente los aislamientos nativos de levadura *S. cerevisiae* y la cepa comercial que comúnmente emplean los vitivinicultores de la zona.
- Conducir fermentaciones con las levaduras starter seleccionadas y evaluar el aporte organoléptico al producto final.



METODOLOGÍA

METODOLOGÍA

Actividades y metodología

1. Sitio de estudio

En el presente estudio se utilizaron frutos de vid (*Vitis vinífera L.*) de los cultivares Viognier y Chardonnay cosechados en madurez tecnológica durante febrero de 2020, pertenecientes a las fincas de “Casa Montes Bodega y Viñedos S.A.” (Figura 12) que se encuentra ubicada en la localidad de Pozos de Algarrobos – Caucete – San Juan, $31^{\circ}40'33.54''S$, $68^{\circ}14'59.74''O$ a 700 m.s.n.m., con una temperatura media anual de $17^{\circ}C$, precipitaciones anuales por debajo de los 200 milímetros y suelos aluvionales. La finca de la firma posee riego por goteo, la conducción es en espaldero bajo con plantas injertadas sobre pie americano (Vivero Rauscedo – Italia) y la distancia entre hileras es de 2,50 m y entre plantas 2,0 m.

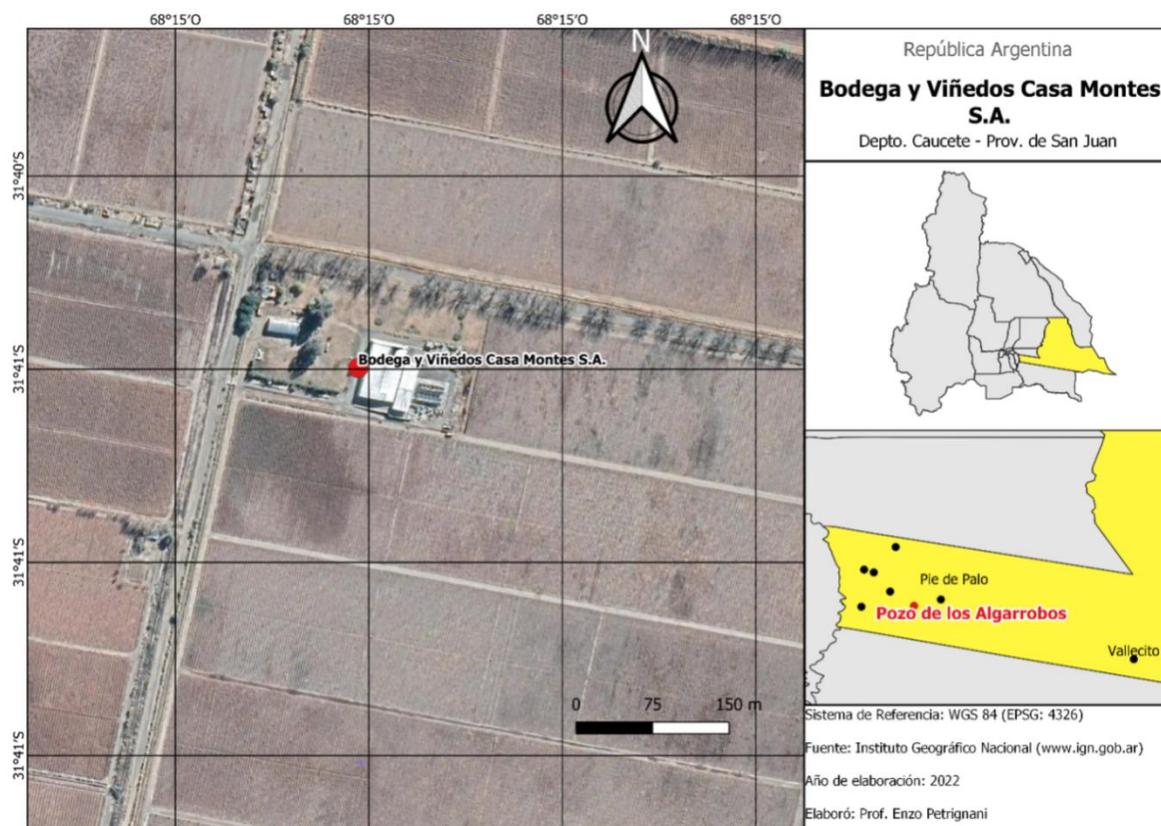


Figura 12 Área de estudio

Es importante destacar que el sitio de estudio es reconocido desde el 2015 por el I.N.V. (Instituto Nacional de Vitivinicultura) como una “Indicación Geográfica (I.G.)” de la Argentina por sus características particulares de microclima y suelo (terruño de origen o *terroir*) (Resol. C 30/2015).

2. Muestreo

Con el objetivo de obtener levaduras autóctonas de la especie *S. cerevisiae*, se procedió a la toma de muestras en los viñedos pertenecientes a las fincas de la firma “Casa Montes Bodega y Viñedos S.A.” ubicados en la localidad de Pozos de los Algarrobos – Caucete.

Se tomaron muestras de los frutos de vid (*Vitis vinífera* L.) de las variedades Viognier y Chardonnay (Figura 13). Dichas muestras fueron cosechadas de hileras y plantas al azar de cada variedad de uva y colocadas en bolsas plásticas estériles con cierre hermético y se conservaron en frío (4°C). La cantidad de uva que se cosechó de cada varietal fue aproximadamente 30 kg. El procesamiento se llevó a cabo en el laboratorio del Instituto de Biotecnología – IBT (U.N.S.J.).

La toma de muestra se realizó cuando las uvas alcanzaron su madurez tecnológica, el Viognier con 22,2°Bx y Chardonnay con 22,8°Bx; la misma se llevó a cabo el día 3 de febrero de 2020 en horas de la mañana y de forma manual. El estado sanitario visual de las uvas no revelaban síntomas de enfermedades o ataque de insectos.



Figura 13 Imágenes tomadas de las variedades Viognier y Chardonnay y toma de muestras de los viñedos de la firma.

3. Aislamiento de levaduras nativas *Saccharomyces cerevisiae*.

3.1. Aislamiento

Para el aislamiento de las levaduras nativas de las bayas de uvas de las dos variedades (Viognier y Chardonnay) se procedió de la siguiente manera:

Parte 1: Se eligieron al azar granos de uva de cada varietal y se colocaron 3 y 5 granos de uva en 2 Erlenmeyer con 50 mL de solución fisiológica previamente esterilizado (NaCl 0.85%), por duplicado y se taparon con tapones de algodón y se agitaron durante 15 min a 125 rpm en agitador orbital SI – 600. Se procedió de la misma manera en los dos varietales rotulando los Erlenmeyers debidamente. (Figura 14).



Figura 14 Aislamientos de levaduras en solución fisiológica

Parte 2: Las muestras dentro de las bolsas recolectoras estériles se estrujaron manualmente para obtener mosto de cada varietal, y los mismos fueron empleados para conducir fermentaciones espontáneas. Se llenaron 3 erlenmeyers de 1000 mL con 800 mL de mosto de cada varietal (3 réplicas) y se los tapó con válvula de Müller con H₂SO₄ al 50% que actúa como trampa de humedad y permite que el CO₂ producido durante la fermentación pase a través del ácido concentrado, de esta manera sólo se libera CO₂ producido de acuerdo con la estequiometría de la fermentación (Mestre, 2019). Los erlenmeyers se colocaron en incubadora a 20±1°C para que fermenten a temperatura constante. El seguimiento de la fermentación se realizó diariamente pesando los erlenmeyers hasta peso constante. La pérdida del 5% del peso inicial indica la mitad del proceso fermentativo y la pérdida del 10% del peso inicial indica la finalización de la fermentación.

Al mosto obtenido por el prensado de las uvas se le realizaron las siguientes determinaciones (ANEXO I): azúcares totales (g/L), acidez total (g/L), Nitrógeno prontamente asimilable (mg/L) y pH (Tabla 2). Antes de la fermentación espontánea al mosto se le incorporó SO₂ como antiséptico para evitar el desarrollo de bacterias en una dosis de 100 mg/L de SO₂ Total.

Tabla 2 Datos analíticos de los mostos de Viognier y Chardonnay.

Variedad	Azúcares T (°Bx)	Ac.Total (g/L)	NPA (mg/L)	pH	SO₂ Total (mg/L)
Viognier	22,2	4,05	182	3,52	100
Chardonnay	22,8	4,08	170	3,51	100

Tanto de las suspensiones en solución fisiológica como de las fermentaciones, se tomaron alícuotas para realizar diluciones y luego se sembraron en medios nutritivos.

- Suspensiones de solución fisiológica: se sembraron muestras sin dilución y con dilución 1/10. (Parte 1).
- Fermentaciones espontáneas: En placas de Petri, se sembraron alícuotas sin dilución y con diluciones seriadas sucesivas y se contabilizó aquellas que presentaron entre 30 y 300 colonias, en tres momentos de la fermentación, al inicio, a la mitad de la fermentación y al final. (Parte 2).

La siembra se realizó mediante extensión en superficie sobre placas de Petri con medio de cultivo diferencial WLN (ANEXO II). Se incubaron a 28±1°C durante 120 h en incubadora, este medio permite diferenciar morfológicamente ciertas especies y géneros que ya fueron previamente reportados.

3.2. Purificación y conservación:

Una proporción de aquellas UFC que presentaron la morfología asociada a *S. cerevisiae* se repicaron en medio WLN para verificar su pureza y luego, se sembraron en medio YEPD- agar (ANEXO II), mediante estriado con el fin de aumentar biomasa de los aislamientos y se incubaron a 28±1°C por 48-72h. Cuando se desarrollaron las

levaduras se conservaron en una solución con glicerol al 30% a $-80\pm 1^{\circ}\text{C}$ para su empleo posterior.

4. Identificación molecular de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* nativas seleccionadas.

4.1. Extracción de ADN total

Para la extracción de ADN se utilizó la técnica de Hoffman y Winston, (1987) modificada que se describe a continuación:

En tubos Falcón de 15 mL de capacidad que contenían 5 mL de medio de cultivo YEPD líquido estéril (ANEXO II), se inocularon células de levaduras *S. cerevisiae* (200 μL de células conservadas en glicerol) e incubaron para desarrollo de biomasa a $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 h y a 120 rpm en agitador orbital.

Los tubos Falcón se sometieron a centrifugación a 3000 rpm durante 5 min. Se retiró el sobrenadante. Luego se re suspendieron los pellets de levaduras mediante agregado de 1 mL de agua pura estéril y se homogeneizó. A continuación, se transfirieron a microtubos de 1.5 mL (Eppendorf) estériles y se centrifugaron durante 5 min a 13000 rpm.

Las células recolectadas por centrifugación (retirar el sobrenadante), se sometieron a lisis celular mediante el agregado de 200 μL de solución 1F (ANEXO III) y 0,3 g de perlas de vidrio (diámetro 0,45 – 0,52 mm) para la ruptura mecánica de las células. A continuación, se adicionaron 200 μL de fenol/cloroformo/isoamílico (25:24:1) para precipitar proteínas e impurezas celulares y se agitaron en vórtex durante 3-4 min a 3000 rpm.

En el paso siguiente se agregó 200 μL de solución TE (ANEXO III), para mantener en solución los ácidos nucleicos. A continuación, se centrifugó durante 5 min a 13000 rpm, se recuperó la fase acuosa con una pipeta y se recibió en microtubos limpios y estériles, y se agregó 1 mL de etanol 100% ($-20\pm 1^{\circ}\text{C}$) para precipitar los ácidos nucleicos. Luego se mezcló por inversión y centrifugó (13000 rpm durante 2 min.) eliminando el

sobrenadante. En el siguiente paso se re-suspendieron los ácidos nucleicos en 100 μL TE, se agregó 2 μL RNAsa y se incubó a $37\pm 1^\circ\text{C}$ de 1 - 4 h con el fin de digerir el ARN. Posteriormente se agregó 4 μL $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ y 1 mL etanol 100% ($-20\pm 1^\circ\text{C}$) se mezcló por inversión, para precipitar el ADN; nuevamente se centrifugó a 13000 rpm durante 2 min. Se eliminó el sobrenadante y se lavó con 200 μL de etanol al 70% ($-20\pm 1^\circ\text{C}$). Por último, se centrifugó (13000 rpm durante 2 min.), se eliminó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente. Los ácidos nucleicos fueron resuspendidos en 50 μL de TE y conservados a $-20\pm 1^\circ\text{C}$ (Figura 15).

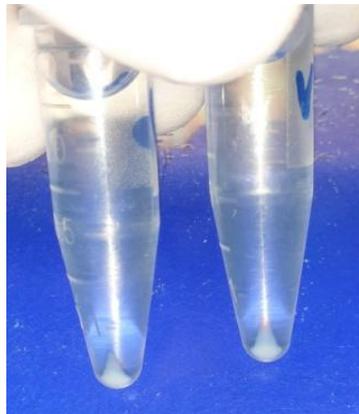


Figura 15 ADN de levaduras aisladas.

La integridad del ADN obtenido se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa 0,7% en buffer TBE 0.5 X (ANEXO III) con Bromuro de etidio (Concentración) sometidos durante 60 min a 90 V. Como patrón de peso molecular se utilizó el marcador I EcoRI/Hind III (Fermentas Inc., Hanover, USA). Las imágenes fueron captadas al exponer los geles en un transiluminador de UV (Chimeno, 2015).

4.2. Diferenciación molecular intraespecífica mediante metodología de PCR Interdelta.

Se utilizó para la diferenciación intraespecífica de las cepas previamente identificadas como *Saccharomyces* spp la metodología PCR Interdelta (Legras y Karst, 2003). Cada reacción de amplificación PCR se llevó a cabo en un volumen final de 30 μL con los siguientes componentes: 11.4 μL de agua miliQ para completar el volumen final, 3 μL

de buffer 10x con MgCl₂, 6 μL dNTP 's 2 mM, 2μL del primer δ12 (5'-TCAACAATGGAATCCCAAC-3') 15 μM, 2μL del primer δ21 (5'-CATCTTAACACCGTATATGA-3') 15 μM, 0.6μL Taq Polimerasa 5U/μLy 5μL de ADN (250 ng). Para esto se utilizó el termociclador Eppendorf AG 22331, cuyos pasos programados de PCR (Interdelta) Incluyen:

- 1) Desnaturalización inicial: 95°C durante 4 minutos;
- 2) Desnaturalización: 95°C durante 0,3 minutos;
- 3) Hibridación: 46°C durante 0,3 minutos;
- 4) Extensión: 72°C durante 1,3 minutos;
- 5) Repetición de los pasos 2, 3 y 4: 35 ciclos;
- 6) Extensión final: 72°C durante 10 minutos.

Los productos de la reacción fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa 1.2% en TBE 0.5 X (ANEXO III) con Bromuro de etidio sometidos durante 60 min. a 90 V. Las imágenes fueron captadas al exponer los geles a transiluminador de UV en fotodocumentador con cámara CCD acoplada y analizadas con el software Gel Doc XR (Bio Rad Laboratorios Limited, Hemel Hempstead, UK) (Chimeno, 2015).

5. Caracterización fisiológica de interés enológico de levaduras nativas *Saccharomyces cerevisiae*.

5.1. Producción de H₂S.

El potencial genético de las cepas nativas para producir H₂S se estableció siguiendo la metodología propuesta por Jiranek *et al.* (1995). A partir de un cultivo puro de cada cepa, se realizó el aislamiento de las mismas en el medio comercial BigGy agar (Difco). Las placas fueron incubadas 48-72 h a 28±1°C y posteriormente se analizó la coloración alcanzada por las colonias de cada cepa. Este medio de cultivo posee Citrato amónico de Bismuto, el cual en presencia de H₂S va oscureciendo las colonias. Esto permitió estimar el potencial de cada cepa para producir H₂S (Figura 16) por

acción de la enzima sulfito reductasa en un medio con deficiencias de nitrógeno (Massera, 2010). La clasificación de cada cepa, en función de la coloración de sus colonias aisladas, se llevó a cabo teniendo en cuenta la escala propuesta por Mendes-Ferreira *et al.* (2002):

- Blanco: cepa no productora de H₂S (-)
- Marrón claro: Producción escasa de H₂S (+/-)
- Marrón: Producción baja de H₂S (+)
- Marrón oscuro: Producción media de H₂S (++)
- Negro: Cepa muy productora de H₂S (+++)



Figura 16 Producción de H₂S por parte de las levaduras de *S. cerevisiae* en función de la coloración de sus colonias en medio BigGy agar (Difco). Las levaduras no productoras son blancas (-), las escasamente productoras son marrón claro (+/-), las que tienen baja producción son marrones (+), las de producción media son marrón oscuro (++) y las muy productoras son negras (+++) (Massera, 2010).

5.2. Capacidad de crecimiento celular a baja temperatura y altas concentraciones de azúcar inicial, etanol y dióxido de azufre (SO₂).

La capacidad de las levaduras para crecer y fermentar bajo condiciones estresantes tales como: baja temperatura (15±1°C), elevada concentración de etanol (14% v/v), elevada concentración de azúcar inicial (28°Brix) y SO₂ (200 ppm libre), fue evaluada de acuerdo a la metodología propuesta por Vázquez *et al.*, 2001.

Todas las levaduras aisladas de Viognier y Chardonnay conservadas en glicerol al 30%, fueron activadas en tubos Falcón con medio YEPD líquido, durante 48 h a 27±1°C y a 100 rpm (Figura 17 a y b). A continuación, se realizó el lavado con agua destilada estéril

de las levaduras y, posteriormente, el hambreado resuspendiendo el pellet de levaduras lavadas en una solución de agua peptonada al 0,1% durante 48 h.

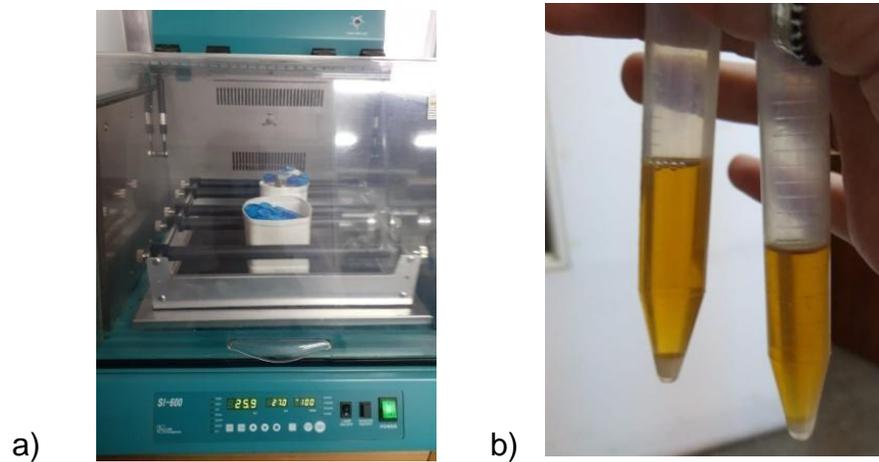


Figura 17 a) Activación de levaduras en agitador orbital. b) Biomasa de levaduras activas.

Para comprobar la resistencia de las levaduras a diferentes parámetros de fermentación se realizó el conteo directo en Cámara de Neubauer de las células de levaduras activadas para inocular una concentración de 1×10^6 células/mL en tubos que contenían sustratos con diferentes composiciones (ANEXO IV).

Los tubos inoculados fueron incubados en condiciones estáticas a $15 \pm 1^\circ\text{C}$ (a) y $27 \pm 1^\circ\text{C}$ (b, c y d). Cada tubo contenía en su interior una campana Dürham invertida llena con el mosto (ANEXO IV), para evidenciar la acumulación de gases (CO_2) producido durante el proceso fermentativo de las levaduras. Durante los primeros tres días los tubos fueron monitoreados cada 24 h para detectar el entrapamiento de gas en las campanas (Figura 18 a y b).

Las levaduras que presentaron el llenado completo de la campana de Dürham con CO_2 durante los primeros tres días, fueron seleccionadas como tolerantes a los factores analizados. Las levaduras que no produjeron gas suficiente como para llenar la campana, se consideró que tenían actividad negativa (Mestre, 2019).

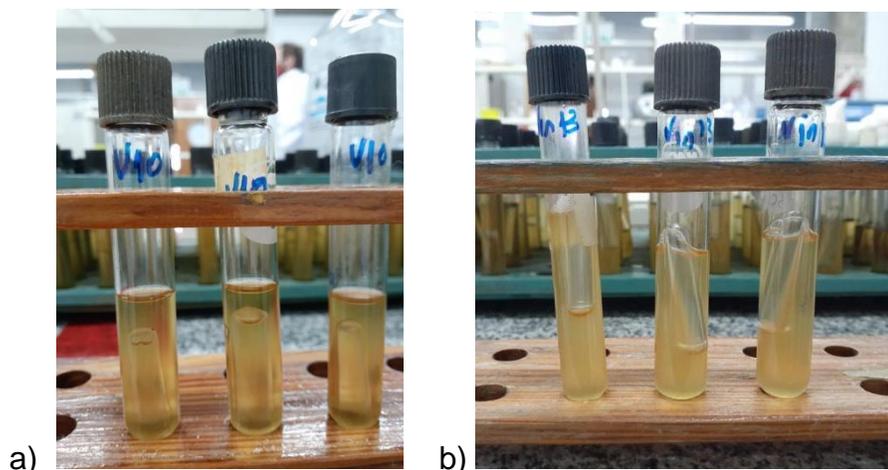


Figura 18 a) Campanas de Dürham sin acumulación de CO₂. b) Campanas Dürham llenas de CO₂.

6. Evaluación del comportamiento de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* seleccionadas y cepa comercial en condiciones enológicas usando cultivos puros.

La levadura comercial Anchor Vin 13 – Anchor Oenology utilizada por la bodega para la fermentación de mostos blancos, fue empleada como levadura control.

Se procedió a realizar fermentaciones con mosto fresco de cada variedad (Viognier y Chardonnay) conservado en frío, el protocolo a seguir se describe a continuación:

- Se sembraron en medio WLN las cepas de levaduras V22, C14 y la comercial Vin13, y se incubaron durante 48 h a $25 \pm 1^\circ \text{C}$.
- A continuación, se inoculó el desarrollo levuriano de las placas en los frascos Erlenmeyers de 250 mL con 100 mL de YEPD y se incubaron con agitación a $25 \pm 1^\circ \text{C}$ y 120 rpm en agitador orbital, durante 48 h.
- Posteriormente se prepararon los pre-inóculos mediante la inoculación de cada levadura activada en YEPD en mosto a 16°Bx estéril.
- Los mostos obtenidos al momento de la cosecha se utilizaron para el aislamiento de levaduras y luego se conservaron en Freezer. Para realizar las fermentaciones a nivel laboratorio se analizaron previamente (Anexo I) y se les realizaron las correcciones necesarias para una correcta fermentación. Los datos

del mosto Viognier fueron pH 3,9; NPA 180 mg/L; azúcar 21,2°Bx y acidez total 4,65 g/L. El mosto Chardonnay tenía de pH 3,8; NPA 185 mg/L; Azúcar 22,4°Bx y acidez total 4,68 g/L.

- Las vinificaciones fueron llevadas a cabo en frascos Erlenmeyers de 2000 mL de capacidad con 1700 mL de mosto fresco Viognier y Chardonnay. El inóculo inicial de todas las fermentaciones fue de 2×10^6 cél/mL. Luego de la inoculación los Erlenmeyers fueron tapados con válvulas de Müller con una solución de H₂SO₄ al 50%, esta válvula permite que el CO₂ producido durante la fermentación pase a través del ácido concentrado y se retenga humedad, de esta manera solo se elimina CO₂, producido de acuerdo con la estequiometría de la fermentación. Todos los sistemas fermentantes se incubaron a $17 \pm 1^\circ\text{C}$ en condiciones estáticas.
- Se tomó el peso inicial de cada Erlenmeyer y el seguimiento de la fermentación se realizó controlando el peso hasta alcanzar peso constante. Además, se llevó a cabo recuento de la población de levadura en cámara de Neubauer y de UFC en medio WLN por extensión realizando previamente las diluciones correspondientes. La disminución de peso se debe a la pérdida de CO₂.
- Finalizadas las fermentaciones se transvasaron los vinos a botellas rotuladas convenientemente para su posterior degustación con un panel entrenado.

6.1. Parámetros elegidos para evaluar el comportamiento de las cepas.

- El poder fermentativo de las vinificaciones fue calculado gravimétricamente evaluando la pérdida de peso acumulado (por liberación de CO₂ entre el inicio y el final de fermentación) sobre el volumen total de mosto:

$$\text{PF (\% v/v)} = 100 \times 1.3 \times (\text{pérdida de peso acumulada (g CO}_2\text{)/vol del mosto)}$$

Dónde 1.3 es la constante estequiométrica de la fermentación alcohólica.

- Consumo de azúcar:

$$\text{CA (g/L)} = \text{azúcar inicial (g/L)} - \text{azúcar final (g/L)}$$

- Rendimiento fermentativo:

$$\mathbf{RF = (azúcar\ inicial\ total\ g/L - azúcar\ final\ total\ g/L) / etanol\ \%v/v.}$$

- Pureza fermentativa:

$$\mathbf{PF = etanol\ \%v/v / acidez\ volátil\ (ácido\ acético).}$$

El cociente obtenido es un valor entre 0 y 1. Mientras más cercano a cero (0) indica que la cepa metaboliza los azúcares prevaleciendo la producción de etanol respecto a la producción de metabolitos secundarios.

7. Análisis sensorial de los vinos obtenidos en micro vinificaciones.

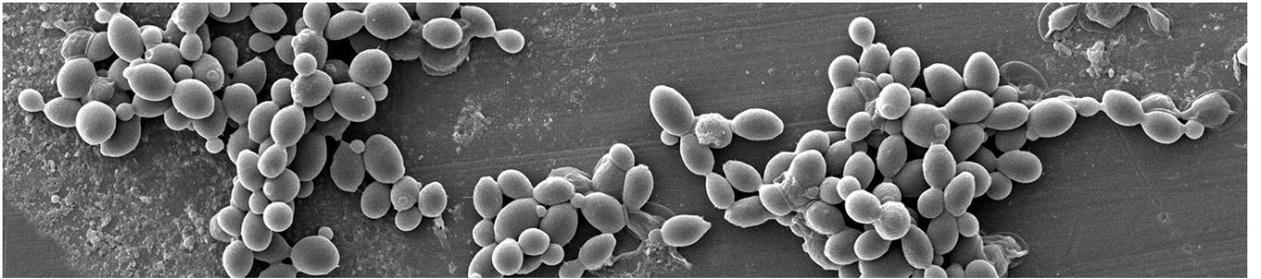
Una vez estabilizados los vinos con frío, fueron sometidos a un análisis descriptivo sensorial. El análisis sensorial (Cata) se llevó a cabo en la sala de degustación perteneciente al Consejo Profesional de Enólogos de San Juan. El panel estuvo conformado por 8 jurados calificados entre ellos el presidente y vicepresidente del Consejo Profesional de Enólogos y el presidente y vicepresidente del Centro de Enólogos de San Juan, (todos hombres de entre 40 a 65 años de edad).

Las características evaluadas se clasificaron en tres grupos en referencia al color, aroma y gusto (cromático, aromático y gustativo). Respecto al color se evaluó: tonalidad roja, tonalidad marrón. Nota mineral, frutilla, ciruela, cereza, mora, violeta, vainilla, pimentón, chocolate fueron los descriptores atribuidos al aroma. El gusto se evaluó mediante los descriptores de acidez, amargo, astringencia, dulzor, estructura, untuosidad y tipicidad varietal.

Para el análisis, se empleó un volumen de 30 mL de vino a temperatura de servicio por cada panelista. Los atributos a valorar fueron previamente descritos y se les pidió a los catadores que los clasificaran en una escala estructurada de 0 a 5 en una planilla entregada para tal fin (ANEXO V).

8. ANÁLISIS DE LOS DATOS.

Cada ensayo se realizó independientemente por duplicado y los resultados representan la media de dos determinaciones con sus respectivas desviaciones estándar. Para el análisis sensorial se llevó a cabo un análisis de componentes principales con las variables de la planilla de degustación (ANEXO V) .Para las medidas resumen de estadística descriptiva y el análisis de componentes principales se utilizó el software Infostat versión profesional 2018.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El interés principal del presente estudio fue seleccionar levaduras nativas de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, para la elaboración de vinos blancos con características únicas del lugar de implantación del viñedo.

Para la caracterización macroscópica del género de las levaduras aisladas se tuvo en cuenta la descripción realizada por Kurtzman (1998) y Bernardi (2013). Las observaciones de las colonias de levaduras aisladas, sugieren que corresponden al género *Saccharomyces spp.* debido a que coinciden con las siguientes características, colonias lisas, de color blanca, de forma circular, consistencia cremosa, con elevación redonda y con pico y bordes lisos.

Tras la cosecha y procesamientos de las muestras de uvas de *Vitis vinífera L. var.* Viognier y Chardonnay se aislaron del total de UFC una proporción de la misma morfología (20%) representada por 37 levaduras de la variedad Viognier y 23 levaduras de la variedad Chardonnay, con colonias con el aspecto típico de *S. cerevisiae*, es decir, colonia crema, mantecosa, lisa, circular y muy prominente y que termina en punta, generalmente más coloreada, desarrolladas en medio de cultivo diferencial WLN (Figura 19).

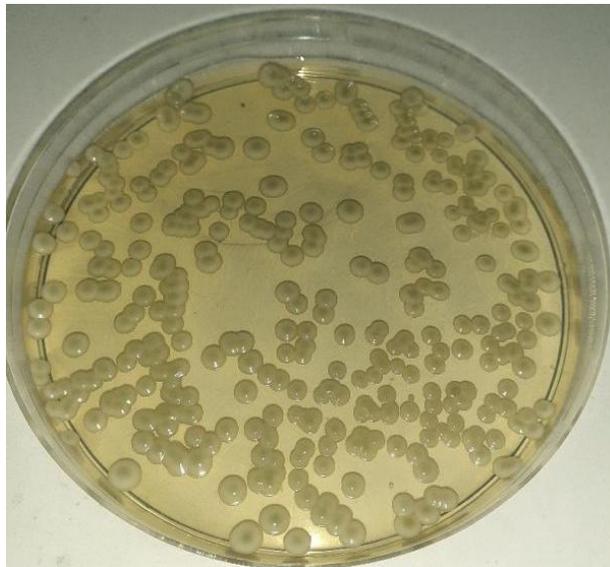


Figura 19 Colonias de levaduras *S. cerevisiae* en medio de cultivo WLN.

Las levaduras restantes presentaron morfologías correspondientes a los géneros del grupo de levaduras no-*Saccharomyces*. Las colonias con aspecto de *Saccharomyces cerevisiae* fueron nombradas con un prefijo y un número V: Viognier y C: Chardonnay. Las mismas fueron: V3-V10, V13-V18, V21-V30, V33-V45 y C12, C14, C15, C18, C29, C31, C35, C40-C55.

Realizar fermentaciones con levaduras autóctonas, adaptadas a su medio ambiente y a las características de los mostos locales, permite unir conceptos de fermentación natural y control de proceso, aumentando la posibilidad de obtener un producto netamente personalizado (Vázquez *et al.*, 2004), donde las levaduras nativas pueden modificar elementos relevantes en el perfil gustativo y de la sensación en boca, así como el color y la astringencia del vino (Almeida da Silva *et al.*, 2016). Por otro lado, permite destacar características típicas de las zonas vitivinícolas (Chimeno, 2015). Bernardi (2013) establece que varios autores demostraron en sus investigaciones, que los principales agentes de la fermentación alcohólica son cepas de especies *S. cerevisiae*, ellas están adaptadas a las características del mosto y pueden crecer bajo esas condiciones, transformándose en la especie dominante y completando la fermentación alcohólica, corroborando esta información con los resultados obtenidos en la etapa de caracterización tecnológica, nuestros aislamientos pertenecen a ese género y especie.

Todos los aislamientos *S. cerevisiae* y la levadura control fueron sometidos a los ensayos de caracterización fisiológica de interés enológico, obteniendo los siguientes resultados (Tabla 3):

Tolerancia al etanol: El etanol es el producto principalmente deseado de la fermentación, pero a su vez es un compuesto tóxico, por tal motivo, se buscan levaduras nativas que resistan concentraciones elevadas de etanol en el medio y sean capaces de mantenerse metabólicamente activas. Según Pretorius (2000) las levaduras indígenas pueden aclimatarse a diferentes estreses desarrollando factores de supervivencia (ácidos grasos de cadena larga o esteroides), al estar sometidas a la intemperie, con condiciones climáticas adversas y baja cantidad de nutrientes. En nuestro ensayo el 54% de las levaduras aisladas de variedad Viognier y el 61% de

Chardonnay toleraron la concentración de etanol evaluada (14% v/v) y comenzaron a fermentar después de 48h; y el 100% de las levaduras aisladas fermentaron a las 72 h (Tabla 3). Esta resistencia a altos contenidos de etanol producido en la fermentación, asegura tener vinos finales con azúcares residuales muy bajos y lograr una estabilidad del producto a través del tiempo.

Resistencia al SO₂: Durante el proceso de vinificación, se adiciona SO₂ que posee la característica de antioxidante, antiséptico, selector de la flora, antienzimático, defecante y solubilizante en una operación llamada sulfitado, por lo cual las levaduras seleccionadas para realizar la FA deben tolerar una concentración de SO₂ libre de 50 mg/L usada con frecuencia en vinificaciones de mostos blancos (Miranda-Callejas *et al.* 2015). La dosis de SO₂ en mostos y vinos se encuentra legislado por el I.N.V. (vino tinto seco 130 mg/l, para blanco y rosado seco y tinto abocado y dulce 180 mg/l en vino, vinos blancos y rosados abocado y dulce 210 mg/l, Resolución I.N.V, N° C-143/94). En este caso se probó una concentración mayor, 200 mg/L de SO₂ Libre, hay que destacar que la sensibilidad de las levaduras está directamente relacionado con el SO₂ molecular, que se encuentra en función al pH del mosto/vino, por lo cual el desarrollo en este medio las hace aptas para ser seleccionadas. Se obtuvieron los resultados siguientes: 9 aislamientos de Viognier (23.70%) iniciaron la fermentación a las 24 h de comenzado el ensayo, a las 48h iniciaron la fermentación 10 aislamientos más (26.30%) y a las 72 h los 18 aislamientos restantes (50.00%). De los aislamientos de Chardonnay a las 48 h fermentaron 10 levaduras (41.70%) y los 14 aislamientos restantes (58.30%) fermentaron a las 72 h. El sulfitado produce una esterilización parcial del mosto, permitiendo el control de microorganismos indeseables favoreciendo el desarrollo de cepas de *S. cerevisiae* que son resistentes (Suarez Lepe, *et al.*, 2021), por ello resulta importante conocer la tolerancia a la acción de este compuesto, no para su adición en forma indiscriminada sino para hacerlo de la manera adecuada, ya que un exceso en la dosis produce alteraciones organolépticas y genera problemas que se vinculan con la salud (Castrillon Cachón, 2018).

Elevada concentración de azúcar inicial: la capacidad de las levaduras de crecer en altas concentraciones de azúcares presentes en los mostos, es una característica de

gran interés en las zonas de climas cálidos-desérticos, como la zona de estudio, donde los mostos pueden llegar a contener cantidades de azúcares superiores a los 24°Bx. (Jordao *et al.*, 2015). El grupo de trabajo de Regodon en 1997 evaluaron levaduras nativas *S. cerevisiae* de la región de Extremadura (España) y reportaron que todas las levaduras ensayadas crecieron sin dificultad en mostos con 24°Bx, con concentraciones mayores presentaron escasos crecimientos a los 5 días y que fue aumentando con el paso del tiempo. En el ensayo realizado con mosto estéril con 28°Bx, se obtuvieron los siguientes resultados, el 31.58% de los aislamientos del mosto de variedad Viognier iniciaron la fermentación a las 24h, luego a las 48h el 63.53% y a las 72h el 100%; en cuanto a levaduras seleccionadas del mosto Chardonnay comenzaron la fermentación a las 48h el 79.17%, el porcentaje representa a 19 aislamientos de levaduras y a las 72 h el 100% de los aislamientos. Durante el crecimiento en la fermentación alcohólica en el mosto para producir bebidas alcohólicas, las células se ven afectadas al comienzo del proceso por un estrés osmótico debido a las altas concentraciones de azúcar, los mostos suelen contener 200-250 g/L de una mezcla de glucosa y fructosa (Jiménez-Martí *et al.*, 2010). Cuando el estrés es producido por elevadas concentraciones de glucosa, las levaduras necesitan contrarrestar el estrés osmótico, activando las vías glicolítica y de las pentosas fosfato y los implicados la formación de ácido acético a partir del acetaldehído (Jiménez-Martí *et al.*, 2010).

Podemos destacar que varios aislamientos del mosto Viognier resistieron la alta concentración del ensayo y comenzaron a fermentar a las 24 h, mientras el ensayo control fermentó a las 48 h de comenzado el ensayo.

Capacidad de crecimiento celular a bajas temperaturas (15°C): La temperatura de fermentación es una de las características diferenciadoras entre la vinificación en blanco y en tinto. En las vinificaciones en blanco, la temperatura de fermentación idónea es una temperatura entre 15 a 20±1°C ya que así se favorece una mayor producción y retención de aromas, alcoholes superiores, ácidos grasos de cadena corta y ésteres (Torija Martínez, 2002). Las fermentaciones a bajas temperaturas ponen en marcha una serie de rutas bioquímicas en la que participan un conjunto de proteínas de las levaduras relacionadas con aromas primarios de flores y frutas, se trata de una

sucesión de reacciones bioquímicas en la que están implicados alcoholes superiores que producen compuestos aromáticos clave como feniletanol y sus acetatos. Sin embargo, esta ruta, no se expresa a temperaturas más elevadas, por tanto, genera diferencias significativas en los perfiles aromáticos de los vinos (Muñoz-Bernal *et al.*, 2015). Tal como se logra observar en la tabla 3, no se registraron comienzos de fermentaciones cumplidas las 24 h para los aislamientos de levaduras nativas y la levadura comercial, cuando se incubaba a 15°C. A las 48h 18 aislamientos de Viognier (47.37%) y 5 de Chardonnay (20.83%), y a las 72h el 100% de los aislamientos comenzaron a fermentar. Es importante mencionar que la cepa comercial comenzó a fermentar a las 72h, destacando la posibilidad de aclimatación de las levaduras nativas a las condiciones fermentativas.

Tabla 3 Resultados de las caracterizaciones de los aislamientos de levaduras y levadura control.

Tolerancia	Tiempo	Viognier	Chardonnay	Control
Etanol (14%)	24 hs			
	48 hs	54,00%	61,00%	
	72 hs	46,00%	39,00%	100,00%
SO ₂ L (200 ppm)	24 hs	23,70%		
	48 hs	26,30%	41,70%	100,00%
	72 hs	50,00%	58,30%	
Azúcar (28° Bx)	24 hs	31,58%		
	48 hs	28,95%	79,17%	100,00%
	72 hs	39,47%	20,83%	
Temperatura (15°C)	24 hs			
	48 hs	47,37%	20,83%	
	72 hs	52,63%	79,17%	100,00%

Las levaduras nativas aisladas demostraron en un alto porcentaje la capacidad de fermentar mostos con altos contenidos de azúcares, SO₂ libre, reactivar fermentaciones con altos contenidos de alcohol e iniciar y completar fermentaciones a bajas temperaturas. Desde el punto de vista enológico, la importancia de las levaduras es garantizar una fermentación segura y completa, ya que es el primer paso para poder elaborar vinos de calidad. Es importante que la levadura inoculada garantice un inicio de fermentación rápida para ganar el medio a otros microorganismos, ser resistente a

elevado contenido de alcohol producido y tolerar bajas temperaturas de fermentación especialmente en mostos blancos.

Producción de H₂S: La capacidad de sintetizar este compuesto depende de la cepa (Strauss *et al.*, 2001; Comitini *et al.*, 2011). Las levaduras sintetizan sus estructuras a partir de amonio y/o aminoácidos, cuando la fuente de este nitrógeno asimilable es mínima, estos microorganismos comienzan a utilizar aminoácidos azufrados, liberando el grupo tiol, probablemente el compuesto de azufre más conocido en el vino es el tiol volátil sulfuro de hidrógeno (H₂S). El desarrollo de compuestos de azufre por levaduras incluye la degradación de aminoácidos y plaguicidas que contienen azufre, así como la liberación y/o metabolismo de los precursores que contienen azufre derivados de la uva (Castrillo Cachón, 2018). La presencia de moléculas con grupos sulfuro en el mosto – vino son los causantes de los aromas a reducido. Además, presentan un umbral de percepción bajo, con olor a huevo podrido, cebolla podrida, plásticos, neumáticos: por este motivo se espera que la producción de ácido sulfhídrico sea baja o mínima (Bernardi, 2013).

Son las levaduras, fundamentalmente *S. cerevisiae*, las principales responsables de la aparición del H₂S en los vinos. Por ello, se hace necesaria la búsqueda de cepas que generen cantidades mínimas o nulas de H₂S durante la fermentación.

De los resultados obtenidos, se puede observar que los aislamientos de levaduras nativas presentaron un potencial bajo a medio de acuerdo a la escala propuesta por Mendes-Ferreira *et al.* (2002). Los resultados obtenidos se reflejan en la tabla 4:

Tabla 4 Resultados obtenidos de producción de ácido sulfhídrico por las levaduras aisladas y levadura control. El número 1 indica no productora de H₂S y el número 5 muy productora de H₂S. Solo el 8,33% de los aislamientos de Chardonnay no producen H₂S, el resto de los aislamientos de los dos varietales son productoras escasas y productoras bajas de H₂S.

	1	2	3	4	5
Viognier	-	68,42%	31,58%	-	-
Chardonnay	8,33%	75,00%	16,67%	-	-
Control	-	100,00%	-	-	-

En las levaduras aisladas de mosto de Viognier, se observa que 26 cepas (68.42%) tienen potencial bajo de producción de H₂S y 12 cepas (31,58%) un potencial medio. Las levaduras aisladas de mostos de Chardonnay, 2 cepas (8.33%) no son productoras de H₂S, 18 cepas (75.00%) tienen una producción baja y 4 cepas (16.67%) una producción media.

Selección de *Saccharomyces cerevisiae*.

Aislamiento y caracterización fisiológica de levaduras nativas con aptitudes enológicas.

Para seleccionar los aislamientos de levaduras se realizó una sumatoria de puntos de acuerdo a la caracterización efectuada al comienzo de las fermentaciones (Tabla 5 y 6). La capacidad de las levaduras para crecer bajo condiciones extremas tales como: baja temperatura (15°C), elevada concentración de etanol (14% v/v), elevada concentración de azúcar inicial (28°Brix) y SO₂ (200 ppm libre), se otorgaron puntos de acuerdo a los inicios de fermentación de los ensayos de caracterización, teniendo en cuenta que el máximo puntaje se otorga a las levaduras que inician la fermentación en menor tiempo.

- 24 h: 3 ptos.
- 48 h: 2 ptos.
- 72 h: 1 pto.

La producción de H₂S es considerada un defecto, la puntuación que se otorgó a las levaduras, se realizó con una escala del 1 al 5, donde, 5 es no productora y 1 corresponde a una levadura muy productora de H₂S de acuerdo con la escala de Mendes-Ferreira *et al.* (2002):

- Blanco: cepa no productora de H₂S: 5ptos.
- Marrón claro: Producción escasa de H₂S: 4ptos.
- Marrón: Producción baja de H₂S: 3 ptos.
- Marrón oscuro: Producción media de H₂S: 2ptos.
- Negro: Cepa muy productora de H₂S: 1 pto.

Tabla 5 Aislamientos de levaduras de Chardonnay ordenados de acuerdo a la puntuación obtenida en la caracterización enológica. Los mayores puntajes representan aislamientos de levaduras que inician la fermentación dentro de la 24 h de puesto el ensayo. En color gris son los aislamientos que se descartan.

VARIEDAD: CHARDONNAY

	Azúcar	Alcohol	SO₂	Temperatura	Producción	Puntos
Aislamientos	28º Bx	14º	200 mg/l	15º C	H₂S	Totales
14	2	2	2	2	4	12
15	3	2	2	1	4	12
52	2	1	2	1	5	11
31	2	2	2	1	4	11
41	2	2	1	2	4	11
46	2	2	2	2	3	11
50	2	2	1	1	5	11
49	2	2	1	1	4	10
43	2	2	1	1	4	10
53	2	2	1	1	4	10
44	1	2	2	1	4	10
35	2	1	2	1	4	10
45	1	2	2	1	4	10
12	2	2	1	2	3	10
48	2	1	1	1	4	9
54	1	2	1	1	4	9
42	2	1	1	1	4	9
40	2	1	1	1	4	9
18	2	1	1	1	4	9
29	1	1	2	2	3	9
55	1	2	1	1	3	8
51	2	1	1	1	3	8
47	1	1	1	1	4	8

Tabla 6 Aislamientos de levaduras de Viognier ordenados de acuerdo a la puntuación obtenida en la caracterización enológica. Los mayores puntajes representan aislamientos de levaduras que inician la fermentación dentro de la 24 h de puesto el ensayo. En color gris son los aislamientos que se descartan.

VARIEDAD: **VIIGNIER**

Aislamientos	Azúcar	Alcohol	SO ₂	Temperatura	Producción	Puntos
	28º Bx	14º	200 mg/l	15º C	H ₂ S	Totales
22	3	2	3	2	4	14
6	3	2	3	1	4	13
21	3	2	2	2	4	13
25	1	3	3	2	4	13
9	1	3	3	1	4	12
10	3	1	2	2	4	12
28	1	2	3	2	4	12
29	2	2	3	1	4	12
40	3	2	1	2	4	12
34	2	2	3	2	3	12
18	3	1	1	2	4	11
16	1	3	2	1	4	11
13	2	1	3	1	4	11
14	2	2	2	1	4	11
33	1	1	3	2	4	11
35	3	2	1	2	3	11
42	3	1	1	2	3	10
44	3	1	1	2	3	10
26	1	2	2	1	4	10
30	1	2	1	2	4	10
7	2	2	1	1	4	10
8	2	2	1	1	4	10
23	1	2	2	1	4	10
24	1	1	2	2	4	10
37	3	1	1	2	3	10
38	3	2	1	1	3	10
3	1	1	2	1	4	9
4	2	1	1	1	4	9
5	2	1	1	1	4	9
15	2	1	1	1	4	9
27	1	1	1	1	4	8
45	1	1	1	1	4	8
17	1	1	2	1	3	8
36	2	1	1	1	3	8
41	2	1	1	1	3	8
43	1	1	1	2	3	8
39	1	1	1	1	4	8

Diferenciación intraespecífica de Saccharomyces cerevisiae por PCR Interdelta.

Contar con información sobre las levaduras nativas que conforman una colección de microorganismos, es de suma importancia ya que éstas podrían seleccionarse como iniciadoras de las fermentaciones vínicas para obtener un producto diferenciado. Fermentar con levaduras autóctonas, adaptadas a su medio ambiente y a las características de los mostos locales, permite aunar los conceptos de fermentación natural y control de proceso, aumentando la posibilidad de obtener un producto netamente personalizado. Por otro lado, es posible destacar características típicas de una zona vitivinícola, y resaltar lo que en el mundo del vino se conoce con el término de *Terroir*, que engloba dentro de otras cosas, la presencia de ecosistemas microbianos específicos en los distintos viñedos de las diferentes zonas vitícolas del mundo (Chimeno, 2015).

Una vez obtenido el material genético, es importante comprobar la integridad del ADN por electroforesis. Si el ADN obtenido está integro se debe observar bandas estrechas cercanas a los pocillos donde se realizó la siembra de la mezcla de ADN. Si está fragmentado, se observará una banda más ancha (1 cm) o un sendero muy luminoso en el carril de la muestra (Alejos Velázquez *et al.* 2014).

En la figura 20 podemos observar la integridad del ADN de los aislamientos como bandas estrechas cercanas a los pocillos de siembra.

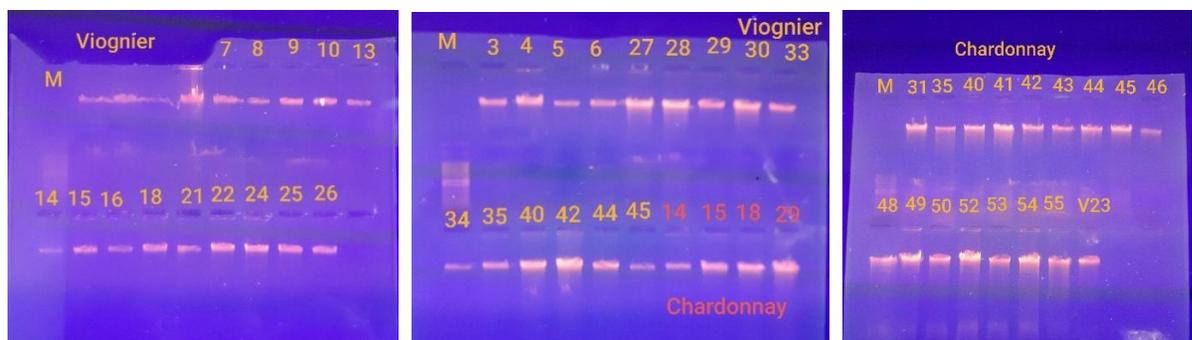


Figura20 Geles de agarosa expuestos a transiluminador revelando la integridad de ADN total de los aislamientos de levaduras de los varietales Viognier y Chardonnay.

Con el fin de complementar información acerca de las levaduras aisladas, se caracterizaron molecularmente los aislamientos de *S. cerevisiae* previamente analizados de acuerdo a aptitudes enológicas.

Este estudio a nivel molecular se basa en la comparación visual del perfil de bandas que presenta cada aislamiento de levadura analizada al que se denomina patrón interdelta. Mientras mayor sea la coincidencia en cantidad de bandas y tamaño que éstas presentan, mayor similitud habrá entre individuos.

Perfiles iguales nos indicaría que estamos frente a una misma cepa. La cantidad de bandas expresadas nos indica el polimorfismo en cada individuo analizado, mientras más polimórfico este se presente, mayores puntos de comparación tendremos (Legras *et al.*, 2003).

Sobre la base de los resultados obtenidos en la caracterización enológica, de un total de 37 aislamientos de levaduras del mosto de Viognier, se seleccionan 30 para la caracterización molecular y de 23 aislamientos de mosto de Chardonnay, 20 levaduras. La selección de aislamiento se realizó eliminando las levaduras con la menor puntuación en la caracterización enológica. En las primeras ampliaciones de las levaduras se obtuvieron los perfiles para agrupar de forma visual todas aquellas con igual patrón molecular (Figura 21 a y b).

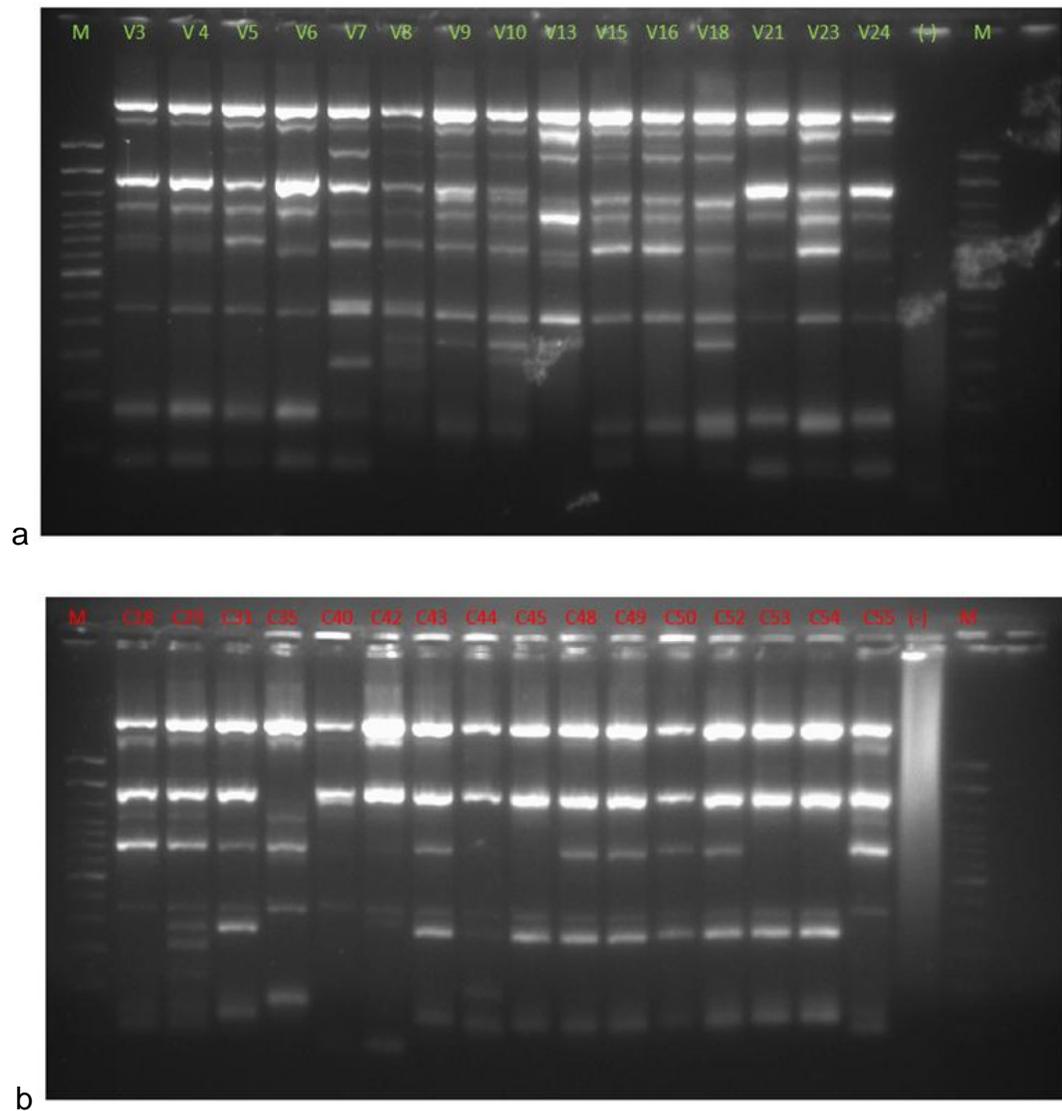


Figura 21 Perfiles genéticos de los aislamientos de levaduras de los varietales Viognier (a) y Chardonnay (b) realizados con la técnica PCR Interdelta.

Los resultados obtenidos indican que se encontraron 13 patrones interdelta diferentes para las levaduras aisladas de Viognier conformándose los siguientes grupos: I (V3, V4, V5); II (V6, V21, V24); III (V9, V10, V18); IV (V15, V16); V (V25, V26, V28, V29, V30, V40, V42, V44, V45); VI (V7); VII (V8); VIII (V13); IX (V14, V23); X (V22); XI (V27); XII (V33, V35); XIII (V34). Con respecto a las levaduras aisladas de Chardonnay resultaron 12 patrones diferentes y se agruparon de la siguiente manera: I (C31, C43, C48, C49, C50, C52); II (C45, C53, C54); III (C35); IV (C40); V (C42); VI (C18, C55); VII (C29); VIII (C15); IX (C41); X (C46); XI (C44); XII (C14).

Se realizó una nueva corrida en gel de agarosa sólo con los grupos que contenían más de un aislamiento con morfologías similares, para compararlas y asegurar la igualdad de los patrones genéticos de cada grupo (Figuras 22 y 23). De esta manera se puede disminuir o eliminar cepas idénticas para lograr el objetivo de encontrar una cepa de levadura nativa para cada cultivar, teniendo en cuenta la caracterización enológica realizada anteriormente.

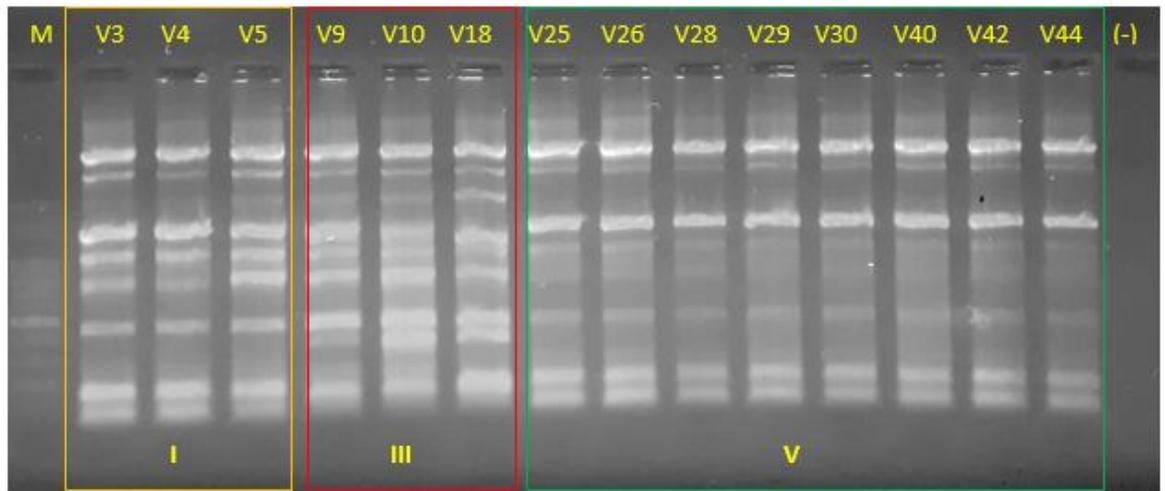


Figura 22 Corrida en gel de agarosa de los perfiles genéticos iguales de las levaduras aisladas de Viognier.

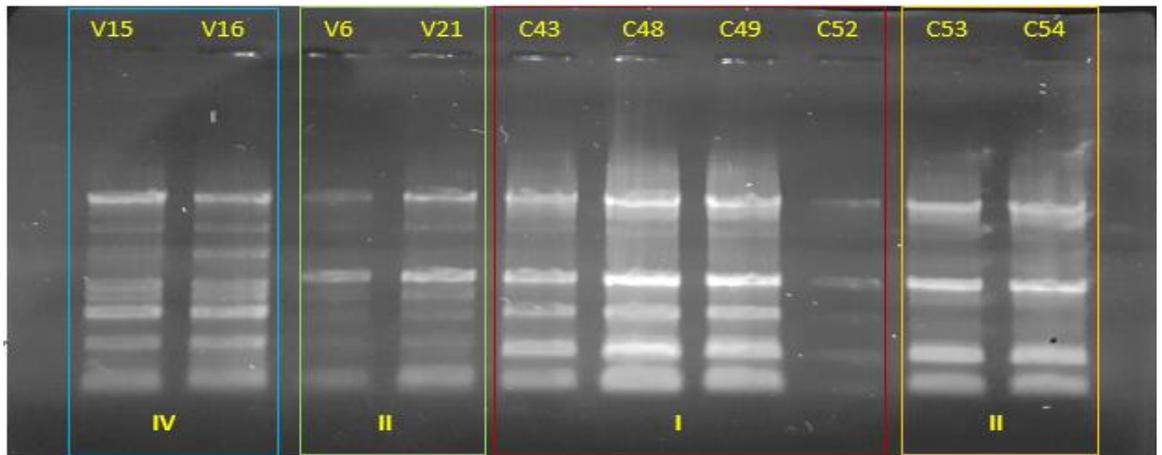


Figura 23 Corrida en gel de agarosa de los perfiles genéticos iguales de los aislamientos de Viognier (IV, II) y Chardonnay (I, II).

Una vez comparados los perfiles genéticos se seleccionó una levadura de cada grupo. Con las cepas de levaduras nativas seleccionadas de cada varietal se realizaron dos nuevas tablas (Tabla 7 y 8), con la caracterización enológica y con perfiles genéticos únicos para cada varietal.

Tabla 7 Cepas nativas aisladas y seleccionadas del varietal Viognier

VARIEDAD: VIOGNIER							
	Azúcar	Alcohol	SO ₂	Temperatura	Producción	Puntos	GPI
CEPAS	28º Bx	14º	200 mg/l	15º C	H ₂ S	Totales	
4	2	1	1	1	4	9	I
6	3	2	3	1	4	13	II
9	1	3	3	1	4	12	III
16	1	3	2	1	4	11	IV
25	1	3	3	2	4	13	V
7	2	2	1	1	4	10	VI
8	2	2	1	1	4	10	VII
13	2	1	3	1	4	11	VIII
14	2	2	2	1	4	11	IX
22	3	2	3	2	4	14	X
27	1	1	2	1	4	9	XI
35	3	2	1	2	3	11	XII
34	2	2	3	2	3	12	XIII

GPI: Grupo Patrón Interdelta.

Tabla 8 Cepas nativas aisladas y seleccionadas del varietal Chardonnay.

VARIEDAD: CHARDONNAY							
	Azúcar	Alcohol	SO ₂	Temperatura	Producción	Puntos	GPI
CEPAS	28º Bx	14º	200 mg/l	15º C	H ₂ S	Totales	
52	2	1	2	1	5	11	I
53	2	2	1	1	4	10	II
35	2	1	2	1	4	10	III
40	2	1	1	1	4	9	IV
42	2	1	1	1	4	9	V
18	2	1	1	1	4	9	VI
29	1	1	2	2	3	9	VII
15	3	2	2	1	4	12	VIII
41	2	2	1	2	4	11	IX
46	2	2	2	2	3	11	X
44	1	2	2	1	4	10	XI
14	2	2	2	2	4	12	XII

GPI: Grupo Patrón Interdelta.

A continuación, con la finalidad de seleccionar una levadura nativa (patrón molecular único) con aptitudes enológicas positivas para cada varietal, se realizaron diagramas de

Venn (Figura 24 y 25). El primer filtro corresponde a capacidad para fermentar mostos con 28°Bx (azúcar), para el caso de Viognier se descartaron cuatro cepas y en Chardonnay dos cepas. Luego se filtró de acuerdo con la capacidad para fermentar a 14° v/v, donde en Viognier se descartaron dos cepas y para el caso de Chardonnay, cinco cepas. Se continuó con iniciar fermentación con 200 mg/L de SO₂ libre, en esta instancia se descartaron tres cepas de Viognier y dos cepas de Chardonnay. Luego se descartaron aquellas levaduras que comenzaron las fermentaciones a las 72 h en condiciones de baja temperatura, en el caso de Viognier se descartaron dos cepas y de Chardonnay una cepa; y, por último, se eliminaron las cepas que producían H₂S, en ambos varietales se eliminó una cepa. La cepa V22, fue seleccionada para el varietal Viognier; mientras la cepa C14 para el varietal Chardonnay.

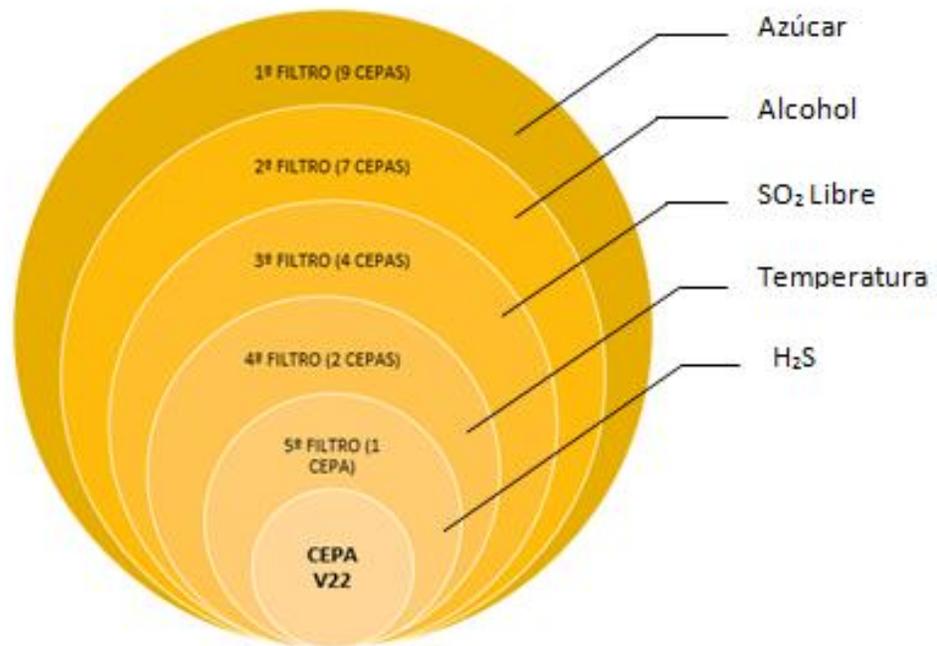


Figura 24 Selección de cepas de levaduras de Viognier por filtrado de características enológicas.

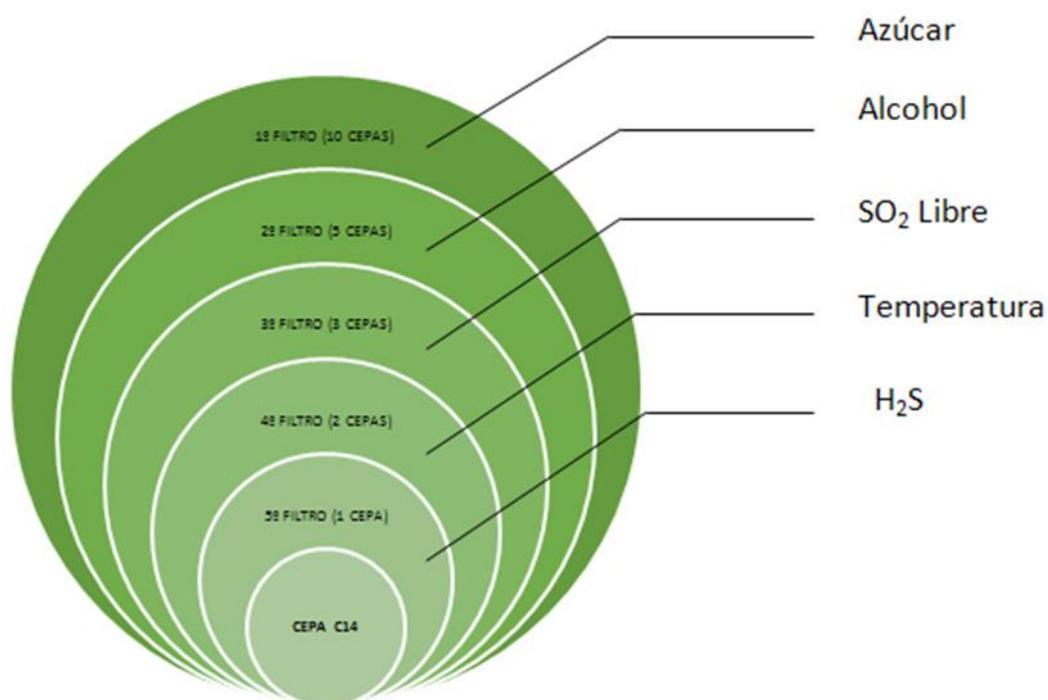


Figura 25 Selección de cepas de levaduras de Chardonnay por filtrado de características enológicas.

Las levaduras V22 y C14 obtuvieron el mejor puntaje en la caracterización enológica como así también sus perfiles genéticos no coincidían con otros aislamientos ni con la levadura comercial (Figura 26). Ambas levaduras presentan aptitudes tecnológicas muy buenas, capaces de fermentar altas concentraciones de azúcares iniciales (28°Bx), mostos/vinos con altos niveles de alcohol (14° v/v), bajas temperaturas (15°C), elevada resistencia a niveles altos de SO₂ L (200 mg/L) y que producen poco H₂S. Los vinos blancos son más delicados, y las condiciones de elaboración son diferentes a la de los vinos tintos. Las condiciones de fermentación alcohólica siempre la temperatura es <20°C, para favorecer la producción aromática del varietal, siempre se le agrega dosis elevadas de SO₂ para evitar la oxidación, y los contenidos de azúcar del mosto siempre superar los 24°Bx, con un alcohol a producir elevado, excepto que la vendimia sea para la elaboración de vinos bases de espumosos, que se cosecha antes de la madurez tecnológica para tener más acidez y menos azúcar para obtener baja graduación alcohólica.

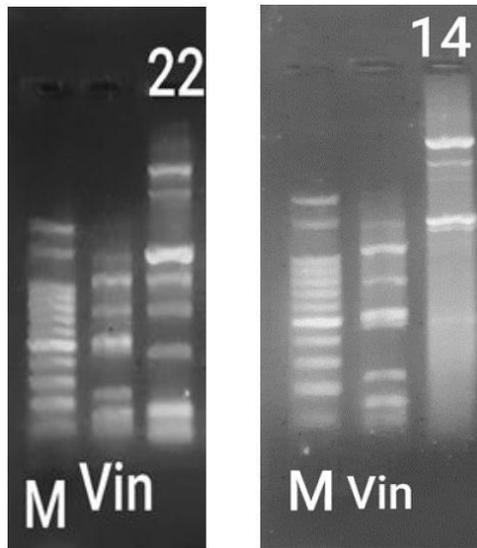


Figura 26 Comparación de los perfiles genéticos de las cepas nativas seleccionadas con la cepa comercial. M: marcador molecular, Vin: cepa comercial (Vin13), 22: cepa aislada de Viognier (V22) y 14: cepa aislada de Chardonnay (C14).

Vinificaciones a escala de laboratorio

Una vez seleccionadas las dos levaduras nativas V22 y C14 se realizaron microvinificaciones con sus respectivos mostos (Viognier y Chardonnay). Se empleó la levadura comercial Vin 13 como control. Los resultados de la cinética de fermentación se muestran en la figura 27.

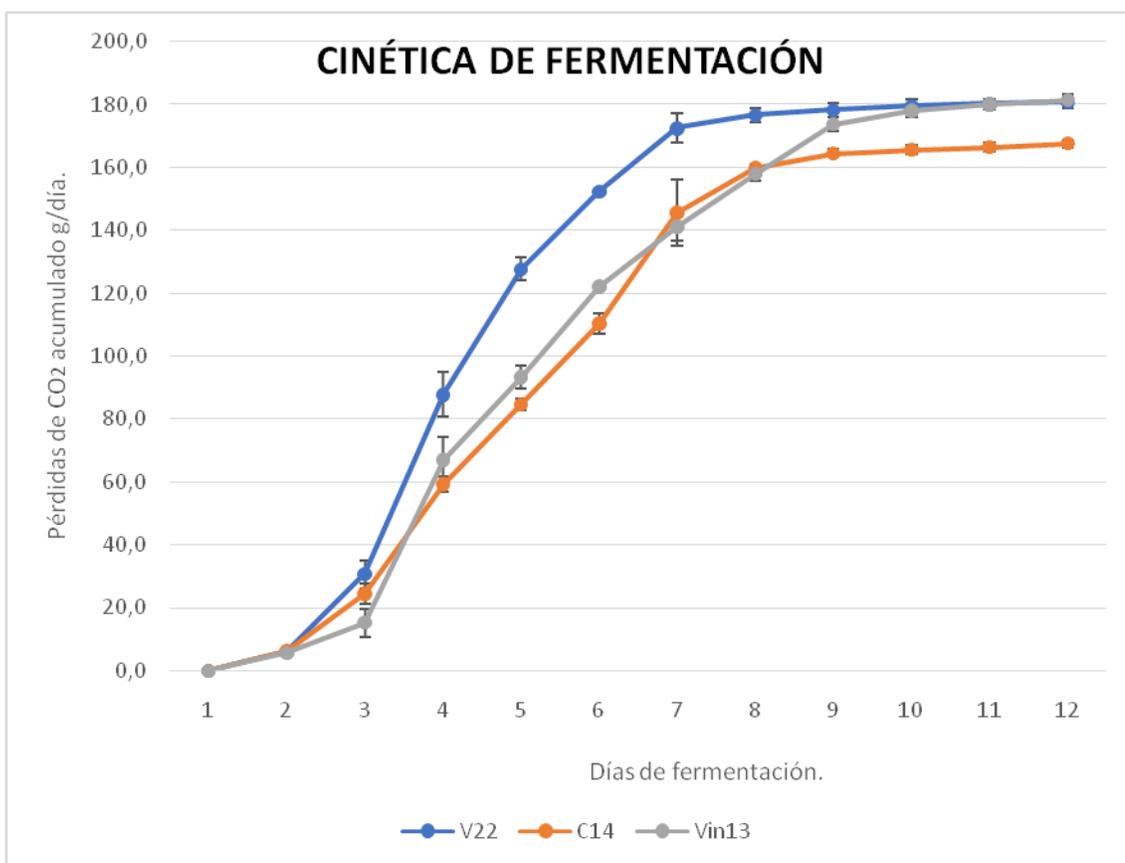


Figura 27 Cinéticas fermentativas de las levaduras V22, C14 y Vin 13, realizadas en vinificaciones en laboratorio utilizando mosto de Viognier y Chardonnay de donde se aislaron las levaduras.

Al comparar las cinéticas fermentativas que registraron las cepas V22, C14 y Vin13 durante el proceso de fermentación se observó que la cepa V22 presentó una fase lag más corta, la cepa C14 presenta una fase lag más larga, pero la fase final logra una menor producción de CO₂, por lo tanto, una menor producción de etanol y finalmente la cepa Vin13 presenta una fase lag más larga que las otras dos cepas y su fase final termina junto con la cepa V22.

En la tabla 9 se observan los datos analíticos de los vinos correspondientes a las micro vinificaciones con las levaduras V22, C14 y Vin13, todas llegaron a rastros de azúcar es decir a valores de azúcar residual en los vinos. Este parámetro nos indica que los vinos son "secos" (sin azúcares fermentables) y estables.

Tabla 9 Datos analíticos de los vinos obtenidos en las micro vinificaciones. Alcohol producido por las 3 cepas, azúcar residual de las fermentaciones, la acidez volátil (ácido acético) producida en las fermentaciones, anhídrido sulfuroso libre al terminar las fermentaciones, la acidez total (expresada en ácido tartárico) y el pH de los vinos terminados.

CEPAS	Alcohol Real %v/v	Azúcar g/L	Acidez Volátil g/L	SO ₂ Libre mg/L	Acidez Total g/L	pH
V22	13,40±0,07	1,80±0	0,22±0,01	26,5±2,12	6,01±0,08	3,52±0,04
C14	12,40±0	1,80±0	0,33±0,01	14,0±1,41	6,97±0,11	3,29±0,01
Vin13	13,55±0,07	1,80±0	0,28±0,01	20,5±0,71	7,13±0,11	3,48±0,04

Los datos representan la media de cada parámetro ± la desviación estándar.

El etanol es el principal producto de la fermentación alcohólica y el compuesto mayoritario en el vino después del agua. Claramente se observa que las levaduras V22 y Vin13 mostraron una tendencia a generar más alcohol que la levadura C14. Datos corroborados con los resultados del poder fermentativo (Tabla 10). Es importante destacar que en el rendimiento fermentativo de las cepas V22 y Vin13 consumen menos cantidad de azúcar para producir 1° de etanol, la cepa C14 consume más cantidad para la producción de 1° de etanol. El rendimiento promedio es de 16.83 g/L (Ribereau-Gayon *et al.*, 1989) (Tabla 10).

Con respecto a la acidez volátil, los valores encontrados son considerados bajos, es decir, valores aceptables, considerando que es un parámetro acumulativo durante la vida del vino. La pureza fermentativa determinada en base a la concentración de ácido acético y etanol arrojó que la cepa V22 presentó menor producción de acidez volátil respecto a las otras dos cepas. La cepa comercial Vin13 produjo menos acidez volátil que la cepa C14 y más que la cepa V22 (Tabla 10).

Dado que el mosto había sido suplementado con SO₂ en una dosis de 50 mg/L, los valores observados presentan una disminución. Teniendo en cuenta los límites máximos dispuestos por el I.N.V. en Res. INV 135/18 para vinos blancos de 180 mg/L, los valores obtenidos al final de las micro vinificaciones se encuentran dentro de los límites legales.

En cuanto a la acidez total los vinos presentan un leve aumento respecto a la acidez inicial. La acidez de los mostos fue corregida a 6 g/L con ácido tartárico. Es importante que las levaduras nativas seleccionadas aumenten la acidez total pero no la acidez volátil (las levaduras poseen una pureza fermentativa cercana a 0), es interesante en zonas cálidas donde la acidez de los mostos es baja debido al elevado grado de maduración con el que las uvas son cosechadas (Regodón, 1997), y la evolución del ácido tartárico durante la maduración del grano de uva sufre fluctuaciones debido a los factores climáticos, los veranos que se caracterizan por sequías y altas temperaturas el ácido tartárico disminuye por combustión (Ribereau-Gayon *et al.*, 1989) situación que se da en las zonas vitivinícolas de San Juan.

Tabla 10 Parámetros fermentativos elegidos para evaluar las especies de S. cerevisiae. Poder fermentativo (alcohol a producir), Consumo de azúcar (cantidad necesaria para producir el alcohol total), Rendimiento fermentativo (cantidad de azúcar consumido para producir 1º % v/v de alcohol) y Pureza fermentativa (relacionada con la producción de acidez volátil).

CEPAS	Poder Fermentativo	Consumo de Azúcar	Rendimiento Fermentativo	Pureza Fermentativa
V22	13,82±0,20	218,70±0	16,32±0,04	0,02±5E-4
C14	12,63±0,20	224,40±0	18,09±0,04	0,03±5E-4
Vin13	13,86±0,28	224,40±0	16,62±0,06	0,02±7,1E-4

Los datos representan la media de cada parámetro ± la desviación estándar.

Análisis sensorial

Con las valoraciones obtenidas en la cata de los vinos elaborados con las cepas de levaduras nativas seleccionadas y la cepa comercial, se llevó a cabo una reducción de datos mediante un análisis de componentes principales (ACP). (Figura 28) La CP1 explica el 63.4 % de la variabilidad de los datos a partir de esta componente se genera la separación de tratamientos de los vinos V22 con respecto de C14 y Vin13. Muestra los atributos relacionados a los vinos obtenidos (V22, C14 y Vin13). La componente principal 1 (CP1) describe el 63.4% de la variabilidad de los datos y la CP2 36.6 %.

Ambas componentes explican el 100 % de varianza total de todas las variables analizadas.

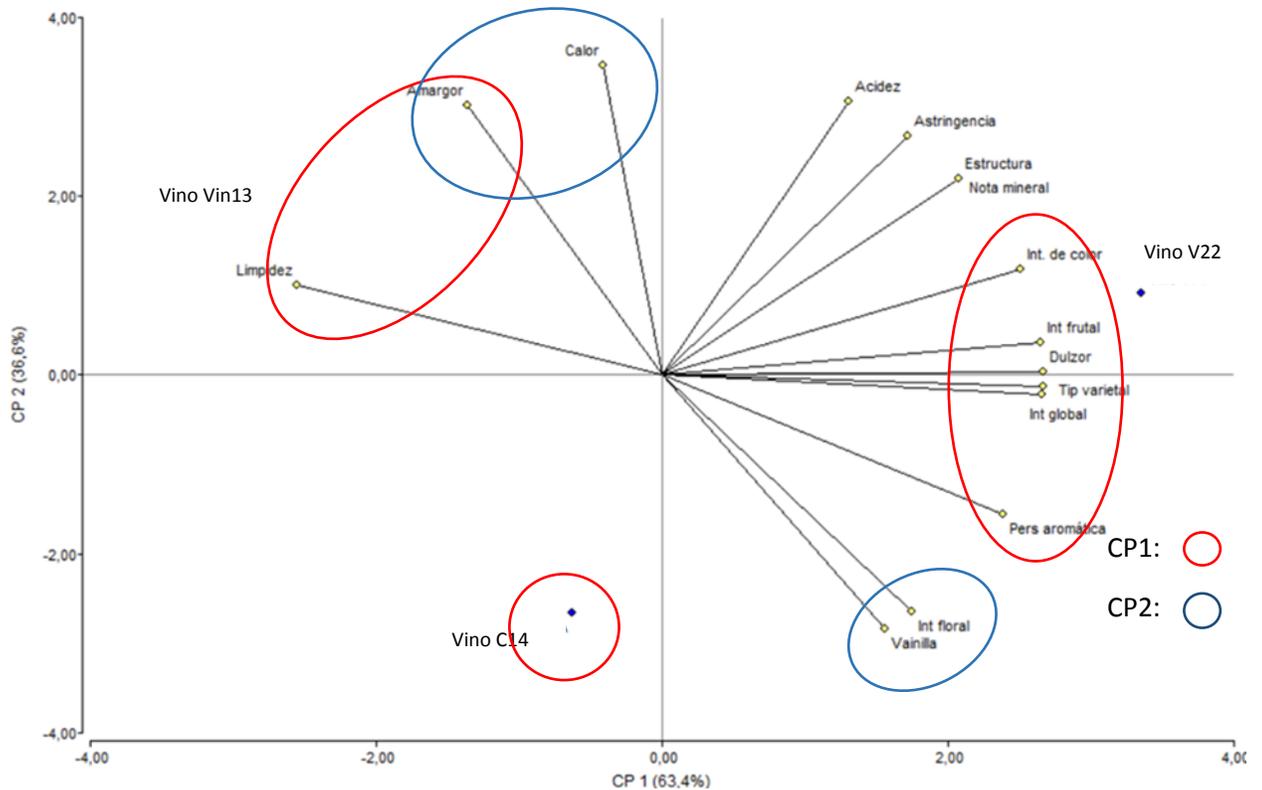


Figura 28 Análisis de Componentes principales (ACP) de los vinos elaborados en laboratorio con las cepas nativa y cepa comercial.

Los atributos destacados que describen la CP1 fueron: intensidad global (0.32), intensidad frutal (0.32), dulzor (0.32), tipicidad varietal (0.32), intensidad de color (0.30) persistencia aromática (0.29). Estos atributos permiten separar los tratamientos V22 del tratamiento C14 y Vin13.

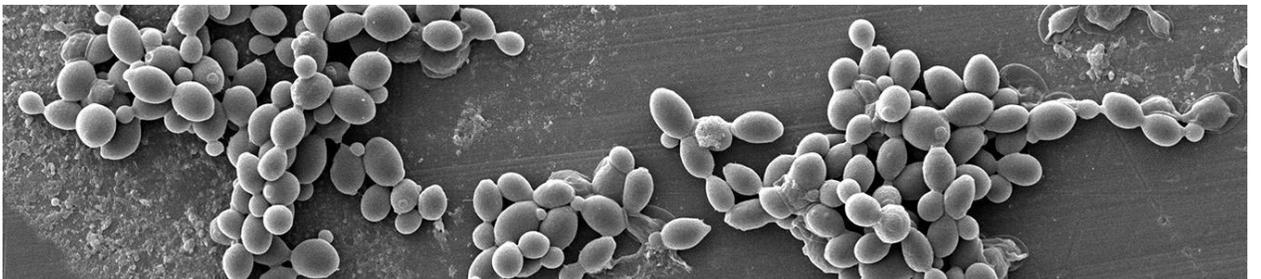
Sobre la base de la CP1, el vino C14 no se asoció a ningún atributo evaluado, mientras que el Vino Vin13 queda descrito por amargor a nivel gustativo y limpidez a nivel visual.

La CP2 se puede observar que, sobre la base de los descriptores astringencia (0.33), calor (0.42) y amargo (0.37), acidez intensidad floral (-0.32) y vainilla (-0.35), se separan

el tratamiento Vino Vin13 respecto del vino C14. Sobre la base de la CP2, el tratamiento Vino Vin13 queda asociado a los descriptores amargo y calor, mientras que el vino C14 queda descrito por la intensidad floral y vainilla.

El mundo sensorial del vino resulta subjetivo, por tal motivo, se recurrió a un panel de cata entrenado y se generaron diferentes descripciones de los vinos. El vino Viognier obtenido de la fermentación con la cepa V22 resultó con mejores características que los otros dos vinos en, intensidad de color, frutal, dulzor, tipicidad varietal, intensidad global, persistencia aromática y en menor medida intensidad floral y vainilla.

La cepa comercial fue descrita con los parámetros de limpidez y amargo y en menor medida calor. Lo que indica que en el ensayo de laboratorio tuvo mejor desempeño la levadura aislada del Viognier comparada con la cepa comercial.



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

El trabajo desarrollado durante esta tesis logró un estudio detallado en cuanto a las características tecnológicas y moleculares de los aislamientos de levaduras de mostos de Viognier y Chardonnay de los viñedos de Bodegas y Viñedos Casa Montes.

La técnica de amplificación mediante PCR del dominio $\delta 12$ y $\delta 21$ permitió identificar de manera confiable las levaduras *S. cerevisiae* de otras levaduras no-*Saccharomyces*.

Se encontró una amplia diversidad a nivel de cepa de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, con 13 patrones diferentes para el varietal Viognier y 12 para Chardonnay, a su vez esos patrones no eran iguales entre varietales.

Las cepas de levaduras nativas V22 y C14 se seleccionaron por sus aptitudes fermentativas para conducir fermentaciones.

De acuerdo a los patrones genéticos de cada cepa seleccionada, mostraron ser diferentes entre sí y diferentes de la cepa comercial.

Las levaduras nativas seleccionadas alcanzaron performances fermentativas óptimas logrando una rápida adaptación en el mosto en las fermentaciones de laboratorio.

Las fermentaciones conducidas por C14 lograron valores más reducidos en etanol.

Las levaduras seleccionadas para conformar los inóculos presentaron características deseables sobre la base de producción de etanol, consumo total de los azúcares (rastros) otorgando mayor estabilidad biológica y baja producción de acidez volátil (ácido acético) parámetro asociado a la vida futura del vino.

El análisis sensorial de los vinos mostró que las vinificaciones con V22 lograron mayor intensidad de color, frutal, dulzor, tipicidad varietal, intensidad global, persistencia aromática y en menor medida intensidad floral y vainilla.

HIPÓTESIS: Las levaduras nativas seleccionadas para vinificación de variedades blancas logran implantarse con éxito en el proceso fermentativo y producen vinos con un perfil organoléptico determinado.

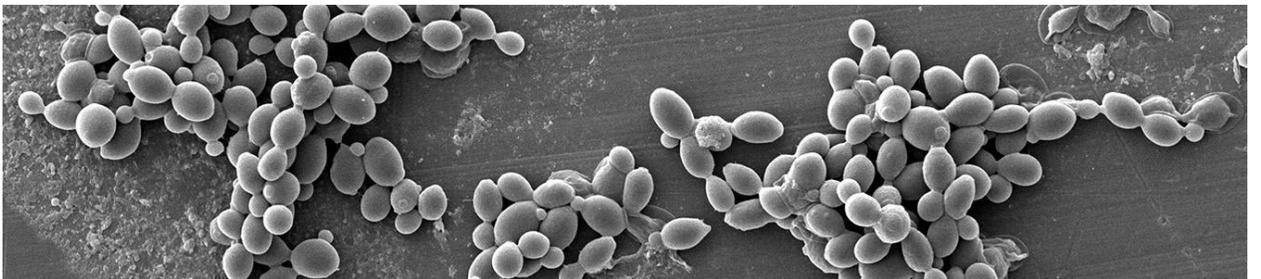
Se acepta la hipótesis, ya que las levaduras caracterizadas y seleccionadas tuvieron un rápido crecimiento en los mostos inoculados y performances fermentativas esperadas. Los vinos resultantes obtuvieron características organolépticas aceptables y sensorialmente con atributos notables.

PROYECCIÓN:

Realizar fermentaciones en Bodegas y Viñedos Casa Montes S.A. para comparar el comportamiento y los vinos obtenidos de las fermentaciones con la cepa V22 para elaborar vino Viognier, C14 para elaborar vino Chardonnay y la cepa comercial Vin13 (utilizada por la bodega Casa Montes S.A.).

“En la industria vitivinícola argentina se desconoce lo que es el vino. Aclaramos que éste conocimiento no se refiere a los conceptos de la definición técnica del producto ni al que se puede tener respecto de los procesos de su obtención. Nos referimos específicamente al conocimiento intrínseco de ese producto noble, mezcla de ciencia y arte, engendrado por la feliz combinación de suelos, clima y cepaje y que da luz merced a la labor casi artística del técnico enólogo, que, interpretando fielmente su origen, lo cría y lo conserva, haciendo uso de los elementos que la ciencia le brinda, hasta alcanzar su plenitud”

Lic. Ernesto Díaz Araujo.



ANEXOS

ANEXO I

Técnicas analíticas empleadas en los ensayos.

Determinaciones físico-químicas en mostos y vinos.

ALCOHOL	Medir 200mL de vino en matraz aforado. Verter el contenido en balón. Destilar hasta recibir las $\frac{3}{4}$ partes, enrasar con agua. Medir en probeta con alcoholómetro a 20°C.
ACIDEZ TOTAL	Medir 10 mL de vino en Erlenmeyer de 250 mL, añadir 5 gotas de Azul de bromotimol 0,4%. Titular con Hidróxido de Sodio N/20.
ACIDEZ VOLÁTIL	Medir 10 mL de vino, en borboteador, destilar y recibir 100 mL en una probeta. Titular con NaOH N/20 en presencia de Fenolftaleína al 1%. Agregar Almidón acidulado, titular con Iodo N/50.
AZUCARES REDUCTORES	Medir 90 mL de vino en una probeta, agregar 10 mL de acetato de Plomo al 25% y carbón. Filtrar. Titular en Erlenmeyer con 15 mL de licor de Fehling y 50 mL de agua. Calentar a ebullición, gotear desde una bureta el filtrado y agregar unas gotas de Azul de metileno hasta coloración amarilla.
ANH. SULFUROSO LIBRE	En un Erlenmeyer de 250 mL agregar 50 mL de vino, 5 mL de Ac. Sulfúrico 1:3 y 3 mL de Almidón. Titular con Iodo N/50 hasta coloración azul.
ANH. SULFUROSO TOTAL	En un Erlenmeyer de 250 mL agregar 25 mL de KOH N y 50 mL de vino. Dejar 15 minutos y añadir 10 mL de Ac. Sulfúrico 1:3 y 3 mL de Almidón. Titular con Iodo N/50.
PH	Se coloca muestra de vino en vaso de precipitados o Becker, se lleva al equipo agitador y se introduce el electrodo de del pH-achímetro y sonda de temperatura. Lectura directa.
AZUCARES TOTALES °Bx	Calibrar el refractómetro con agua destilada, luego agregar unas gotas de mosto y realizar la lectura.
NITROGENO (NPA)	Colocar 50 mL de vino en una probeta, agregar 50 mL de agua. Neutralizar con NaOH N. Llevar a pH 8,3 con NaOH N/20 medidos en pH-achímetro y con agitación. Agregar 30 mL de metanal y titular con NaOH N/20 hasta pH 8,3.

ANEXO II

Medios de cultivos empleados en los ensayos.

MEDIO DE CULTIVO	PREPARACION
WL	50 g / L de glucosa, 5 g / L de triptona, 4 g / L de extracto de levadura, 0,55 g / L de dihidrogenofosfato de potasio, 0,425 g / L de cloruro de potasio, 0.125 g / L de cloruro de calcio, 0.125 g / L de sulfato de magnesio, 0.0025 g / L de cloruro férrico, 0.0025 g / L de sulfato de manganeso, 0.022 g / L de verde de bromocresol y 20 g / L de agar
YEPD LIQUIDO	Extracto de levadura 10g/L; Peptona 20 g/L; Glucosa 20 g/L disolver todo en agua destilada.
YEPD SOLIDO	Extracto de levadura 10 g/L; Peptona 20 g/L; Glucosa 20 g/L y Agar 20 g/L disolver todo en agua destilada.

ANEXO III

Soluciones para extracción de ADN total de levaduras.

SOLUCIONES	PREPARACIÓN
Solución 1F	Triton X-100, 2%; SDS, 1%; NaCl, 100 mM; Tris HCl pH 8, 10mM; EDTA Na pH 8, 1mM. Colocar los volúmenes indicados en recipiente limpio y estéril, llevar a 100 mL con agua pura y estéril. No se autoclava.
Acetato de amonio 10 M	Se pesan 38,5 g de $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ para preparar 50mL de solución. Disolver y llevar a volumen final con agua pura estéril. Autoclavar.
Solución TE	Tris HCl pH 8, 10 mM; EDTA Na pH 8, 1mM. Colocar los volúmenes indicados en recipiente limpio y estéril. Llevar a 100 mL con agua pura estéril. Autoclavar.
Buffer TBE 0,5X	Ac. Bórico 0.9 Mm, Tris HCl 0.9 mM, EDTA Na pH 8 2 mM.

ANEXO IV

Preparación de los diferentes sustratos para la resistencia a medios estresantes.

- a) 4 mL de mosto de 24°Bx estéril y pH 3,6.
- b) 4 mL de mosto a 28°Bx estéril y el pH corregido a 3,6.
- c) 4 mL de una solución estéril conformada por 2% de fructosa, 1% de glucosa, 0,1% de extracto de levadura y 0,6 mL de alcohol de 96° para obtener una solución con 14%v/v y pH 3,6.
- d) 4 mL de mosto de 24°Bx estéril y pH 3,6. Se preparó una solución madre de Metabisulfito de Potasio concentrada (16 g/L) para agregar a cada tubo y obtener una concentración de 200 ppm libre.

El mosto para los ensayos de fermentación a baja temperatura, alta concentración de azúcares y niveles altos de SO₂ libre se obtuvo por dilución de mosto concentrado virgen de 68°Bx y las diluciones fueron esterilizadas a 110±1°C durante 10 minutos.

Preparación de material de vidrio y mostos para fermentaciones en laboratorio.

- Para el pre-inóculo se preparó mosto concentrado virgen a 16°Bx, se colocaron 300 mL en erlenmeyers (3) de 500 mL c/u y se esterizaron a 110±1°C durante 15 min.
- Los mostos se les corrigió la acidez total con ácido tartárico para aumentar la acidez a 6,00 g/L, se agregó metabisulfito de potasio para corregir el anhídrido sulfuroso libre en una dosis 50 mg/L.
- Se esterilizó el material para realizar las micro vinificaciones: erlenmeyers de 2000 mL (6), válvulas de Müller (6).

ANEXO V

Planilla de cata.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN JUAN FACULTAD DE INGENIERIA

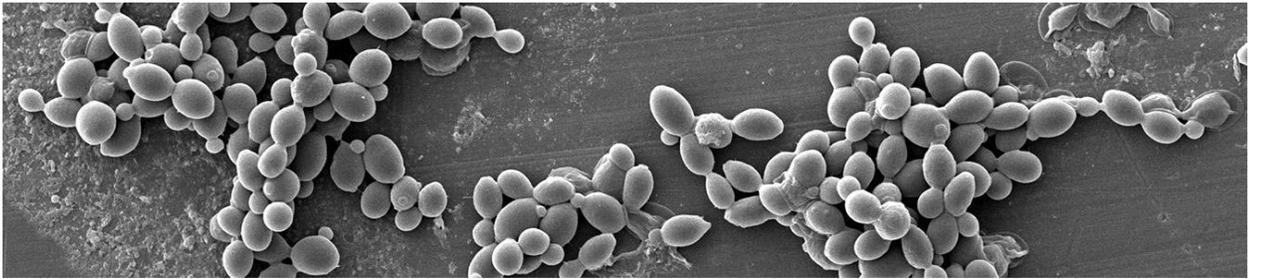


CATA A CIEGAS

VINOS FEREMETNADOS A ESCALA LABORATORIO

ESCALA ESTRUCTURADA DEL 1 AL 5

Panelista N°:		VINO 1 A (viognier)	VINO 2A (chardonnay)	VINO 3A (chardonnay)
fase visual	Limpidez			
	Intensidad de color			
	Nota mineral			
fase aromática	intensidad floral			
	intensidad frutal			
	Vainilla			
	Intensidad global			
fase gustativa	Acidez			
	Dulzor			
	Astringencia			
	Calor			
	Amargor			
	Estructura			
	Persistencia Aromática			
	Tipicidad Varietal			



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achigar, Rodrigo. (2017). Aislamiento, selección e identificación de levaduras nativas con propiedades enológicas en uvas tannat. Universidad ORT – Facultad de Ingeniería. Uruguay.
- Acosta Ovallos, Angy Karolina. (2019). Evaluación de técnicas de conservación para microorganismos de importancia en microbiología industrial en el Cepario de la Universidad de Santander.
- Alejos Velázquez, L.; Aragón Martínez, M.; Cornejo Romero, A. (2014). Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología: Aspectos teóricos y prácticos. Extracción y purificación de ADN. 1-25.
- Almanza, A., Palacios A., Morales, B., Zegarra, A. (2020). Selección de levaduras nativas para la producción de vinos – Una revisión. Revista Científica Scientia, Vol 1. Julio 2020. Lima, Perú.
- Almeida da Silva, G., Agustini, C., Ribeiro de Mello, L., Tonietto, J. (2016). Poblaciones autóctonas de levaduras de diferentes indicaciones geográficas brasileñas. 39º Congreso Mundial de la Vid y el vino. DOI: 10.1051/bioconf/20160702030.
- Atlas Socioeconómico de San Juan. U.N.S.J. (2014).
- Belda, I.; Navascues, E.; Alfonso, A.; Marquina, D. (2014). Microbiología del proceso de vinificación: selección de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* autóctonas con óptimas propiedades enológicas. Reduca (Biología). Serie Microbiología. 7 (1): 1-14, 2014.
- Bercedo Alonso, María. (2020). Influencia del uso de distintos tipos de depósitos de fermentación en la composición aromática de vinos blancos y rosados. Universitat Politècnica de Valencia.
- Bernardi, Analía Marcela. (2013). Selección de levaduras nativas provenientes de la provincia de Mendoza. Universidad Nacional de Cuyo – Facultad de Ciencias Agrarias. Mendoza.
- Bucolo, M. (2020). Incidencia de la composición nitrogenada y azúcares reductores del mosto sobre los aromas fermentativos de vinos cv malbec de tres zonas vitícolas de Mendoza. Facultad de Ciencias Agrarias. UnCuyo.

- Carbonell Bejerano, Pablo; Martínez Zapater, José miguel. (2014). Estructura y composición de la uva y su contribución al vino. Instituto de las ciencias de la vid y el vino. Universidad de La Rioja. Logroño. La Rioja – España.
- Carrascosa-Morelló, Arantxa. (2021). Efecto de la combinación de levaduras *Saccharomyces* y no *Saccharomyces* previamente seleccionadas con respecto a los parámetros generales y composición polifenólica de vinos tintos elaborados con merlot, cabernet sauvignon y garnacha. Universitat Politècnica de Valencia. España.
- Castrillo Cachón, D. (2018). Estudio de la diversidad de levaduras en uva de cultivo ecológico y convencional en Galicia: patrones biogeográficos e influencia en las características químicas y sensoriales del vino. Universidad de León, España.
- Checa Tapia, J. (2020). Estudio del perfil aromático de vinos obtenidos con levaduras seleccionadas *Saccharomyces* Y *no-Saccharomyces*. Universitat Politècnica de Valencia.
- Chimeno, Selva. (2015). Caracterización de un cepario de levaduras para uso enológico mediante técnicas moleculares. U.N.C. Facultad de Ciencias Agraria.
- Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2011). Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*, 28(5), 873–882.
- Corporación Vitivinícola Argentina (CoViAr) 2018. *Vino Argentino Bebida Nacional*.
- Di Giacomo, D. (2014). ¿Cómo empezó la vitivinicultura Argentina? De Vinos y Vides: portal especializado en el mundo del vino. Vitivinicultura, vinos, bodegas, noticias y material especial.
- Escribano Viana, R. (2021). Selección de levaduras no-*Saccharomyces* para la elaboración de vinos tintos de calidad. Universidad de La Rioja, España.
- Fleet, G. M. (1993). Yeasts-growth during fermentation. *Wine Microbiology & Biotechnology*, 27-54.

- Ferrer Piquer, M. (2018). Aislamiento, selección e identificación de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* nativas de Alboraya para la producción de cerveza. Universitat Politècnica de Valencia. España.
- Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavor. *Food Microbiol.* 86: 11-22. (2003).
- García López, María Dolores, Uruburu Fernández, Federico (2000). La conservación de cepas microbianas. Universitat de Valencia.
- Gutierrez Fernandez de Pirola, J. (2018). El papel de selección de levaduras en la elaboración de vinos. *CT10.* 169-198.
- Hoffman, C.S. y Winston, F.A. (1987). A ten-minute preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*, *Gene*, 57:267-272.
- Informe anual de superficie. I.N.V. Mendoza – Argentina (2019).
- Informe regional 2020. Relevamiento vitivinícola argentino I.N.V. – San Juan (2020).
- Jiménez-Martí, E.; Zuzuarregui, A.; Gomar-Alba, M.; Gutiérrez, D.; Gil, C.; del Olmo, M. (2010). Molecular response of *Saccharomyces cerevisiae* wine and laboratory strains to high sugar stress conditions. *International journal of food microbiology* 145 (1), 211-220. 2011
- Jiranek, V., Langridge, P., Henschke, P.A. (1995). Validation of bismuth-containing indicator media for predicting H₂S-producing potential of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts under enological conditions. *American Journal of Enology and Viticulture* 46 (2): 269-273.
- Kurtzman C. P., Fell JW y Boekhout T. (2011) *The Yeasts: a taxonomic study*. 5th ed. Cap. 1 “Definition, Classification and Nomenclature of the Yeasts”. Amsterdam: Elsevier.
- Legras, J.; Karst, F. 2003. Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterization. *FEMS Microbiology Letters* 221, 249–255.
- Ley General de Vinos, Ley N°14878. (1959).

- Loira, I; Morata, A.; Bañuelos M.; Suarez-Lepe, J. (2019). Isolation, selection, and identification techniques for non-*Saccharomyces* yeast of oenological interest. *Biotechnological Progress and Beverage Consumption*. Chapter 15. 467-521.
- López Pérez, J.; Boronat Gil, R. (2013). Estudio de la inhibición de la respiración/fermentación en células de levadura por fluoruro de sodio. *Revista Eureka*, vol. 10, núm. 1, pp 133-138.
- Massera A.F. (2010). Selección y caracterización de microorganismos nativos para la optimización de procesos fermentativos específicos y/o el incremento del perfil organoléptico de los vinos tintos. U.N.C.
- Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A., Leão, C. (2002). Survey of hydrogen sulphide production by wine yeasts. *Journal of Food Protection* 65 (6): 1033-1037.
- Merin, M.; Mendoza, L.; Farias, M.; Morata, V. (2011). Isolation and selection of yeasts from wine grape ecosystem secreting cold-active pectin lytic activity. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 147, Issue 2, 27 May 2011, Pages 144-148.
- Mestre Furlani, M. (2019). Obtención de vinos con reducida concentración de etanol mediante el uso de levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*. UNCuyo - Mendoza.
- Miño Valdez, J.; Herrera Garay, J.; Martos Actis, M. (2016). Vino blanco común elaborado a $18\pm 1^{\circ}\text{C}$ con uva chinche no vinífera y levaduras indígenas. *Revista Centro Azúcar*. Vol 44. Enero-marzo 2017. ISSN: 2223- 4861.
- Miralles Enrique, M. (2018). Estudio de las precepciones y actitudes del consumo moderado del vino sobre la salud desde la perspectiva de los médicos de la atención primaria en España. Universitat Politècnica de Valencia. España.
- Miranda-Castilleja, D.; Ortiz-Barrera, E.; Arvizu-Medrano, S.; Ramiro-Pacheco, J.; Aldrete-Tapia, J.; Martínez-Peniche, R. (2015). Isolation, selection and identification of native *Saccharomyces spp.* Yeasts from vineyards in Querétaro, México. *Agrociencia* 49:759-773. 2015.
- Muñoz-Bernal, E.; Deery, M.; Rodríguez, M.; Cantoral, J.; Howard, J.; Feret, R.; Natera, R.; Lilley. K.; Fernández-Acero, F. (2015). Analysis in the wine yeast

Saccharomyces bayanus var. uvarum. An oenological study of how the protein content influences wine quality. *Proteomics* 2015, 00, 1-19.

- Ness, F.; Lavallée, F.; Dubourdieu, D.; Aigle, M.; Dulau, L. (1993). Identification of Yeast strains using the Polymerase chain reaction. *Sci Food Agric*. 1993, 62, 89-94.
- Oreglia, F. (1978). *Enología Teórico-Práctica. Tomo 1*. Buenos Aires: Ediciones Instituto Salesiano de Artes Gráficas.
- Paladino, S; Sánchez, M.L; Maza, M. (2004). Nitrógeno prontamente asimilable: Efecto sobre la velocidad de fermentación del jugo de uva (*Vitis vinifera L.*), *Rev. FCA UNCuyo*. Tomo XXXVI. N°1. Año 2004. 79-86.
- Pandolfi, C.; Cuello, I. *Acenología – Revista de enología científica y profesional. Ciencia y tecnología*. “Reseña de la vitivinicultura Argentina”. (2005).
- Parga-Dans, E.; Alonso-Gonzalez, P. (2020). El vino natural: Alimento, Cultura, Tradición, Patrimonio y...Salud!.
- Pino Fuentes, Claudia Andrea. (2005). Determinación de urea en vinos comerciales chilenos. Facultad de Ciencias Agronómicas. Chile.
- Pretorius, IS (2000). Adaptación de la levadura de vino para el nuevo milenio: enfoques novedosos del antiguo arte de la elaboración del vino. *Levadura*, 16 (8), 675-729.
- Regodón Mateos, J. (1997). Obtención y caracterización de cepas autóctonas de levaduras para la elaboración estandarizadas de vinos de calidad. Universidad de Extremadura.
- Resolución C71/1992. Instituto Nacional de Vitivinicultura (I.N.V.).
- Resolución OIV-OENO 408-2011.
- Ribereau-Gayon, J., Peynaud, E., Ribereau-Gayon, P., & Sudraud, P. (1989). *Tratado de Enología - Ciencias y Técnicas del vino. Tomo II*. Buenos Aires: Hemisferio Sur S.A.
- Romano, P., Capece, A., Jespersen, L. (2006). Taxonomic and Ecological Diversity of Food and Beverage Yeasts: “The Yeast Handbook Volume 2: Yeasts

in Food and Beverages". Querol, A., Fleet, G. (Eds.). Springer-Verlag, Heidelberg, Alemania, pp. 13-54.

- Rosi, I.; Vinella, M.; Domizio, P. (1994). Characterization of β -glucosidase activity in yeasts of oenological origin. *Journal of Applied Bacteriology* 1994, 77, 519-527.
- Sanchez, P. (2021). Estudio del impacto de levaduras no-Saccharomyces para mejorar la calidad de vinos tintos. Universidad de Valladolid. Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias.
- Santana Trujillo, M. (2021). Evidencias científicas del aporte que el consumo de vino tiene sobre la salud. Universidad de La Laguna.
- Solari, C.; Portela, P. (2018). Levaduras: más que simples productoras de pizzas y cervezas. *Química viva*. Número 1. Año 17.
- Suarez Lepe, J.; Iñigo Leal, B. (2021). *Microbiología enológica, Fundamento de vinificación*. 3° Edición.
- Tello Najul, Farid. (2017). Evaluación enológica de levadura indígena de la provincia de Río Negro: estudios preliminares. Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales.
- Torija Martinez, M. (2002). *Ecología de levaduras: selección y adaptación a fermentaciones vínicas*. Universitat Rovira I Virgili. Tarragona.
- Vázquez C, J.; Ramírez Castrillón, M.; Monsalve F., Z. (2016). Actualización en caracterización molecular de levaduras de interés industrial. *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. XVIII, núm. 2, julio-diciembre, 2016, pp. 129-139. Universidad Nacional de Colombia.
- Vázquez, F., de Figueroa, L. I., & Toro, M. E. (2001). Enological characteristics of yeasts. In *Food Microbiology Protocols* (pp. 297-306).
- Vázquez, F.; Nally; M.C.; Maturano; Y.P.; Toro; M.E. (2004). Selección de cepas de levaduras autóctonas para vinificación. *El vino & su industria*. XVII: 32-39.
- Vázquez, H.; Dacosta, O. (2007). Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Ing. Investigación y Tecnología*. Vol.8, N°4, pp 249-259. ISSN 1405-7743.
- Vila, H.; Paladino, S.C.; Nazralla, J.J.B.; Lucero, C. (2010) *Manual de calidad de uva: guía práctica para conocer y evaluar la calidad de uva para vino*. Ed. INTA.

- Vilela, A. (2019). The Importance of Yeasts on Fermentation Quality and Human Health-Promoting Compounds. *Fermentation* 2019, 5, 46.
- www.argentina.gob.ar/ el consumo de vino tuvo en 2020 la mayor suba en cinco años. I.N.V. 2021.
- www.enolife.com.ar
- www.winesofargentina.org