

***SELECCIÓN DE LEVADURAS
VÍNICAS PROVENIENTES DE LA
PROVINCIA DE MENDOZA***

Autora: Brom. Analía Marcela Bernardi

Tesina de grado de Licenciatura en Bromatología

Universidad Nacional de Cuyo - Facultad de Ciencias Agrarias

Mendoza, Febrero de 2013

***SELECCIÓN DE LEVADURAS
VÍNICAS PROVENIENTES DE LA
PROVINCIA DE MENDOZA***

Autora: Brom. Analía Marcela Bernardi

Dirección postal: Rodríguez 8347, Carrodilla, Luján de Cuyo – Mendoza

Correo electrónico: abernardi@fca.uncu.edu.ar

Director: Mgter. Lic. Brom. María Laura Sánchez

Codirector: Brom. Elizabeth Sfreddo

Asesor Estadístico: Lic. Brom. Nora Martinengo

Comité evaluador:

Presidente: Dr. Ing. Agrónomo Juan Carlos Formento

Vocales: MSc. Ing. Agr. Hugo Galiotti

Ing. Agr. Cora Dediol

Suplente: Bioq. Silvina farrando

RESUMEN

El objetivo del siguiente trabajo fue seleccionar cepas de levaduras para uso enológico mediante métodos simples aplicables en laboratorios básicos de enología. Las Cátedras de Microbiología y Enología de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNCuyo, cuentan con un cepario de levaduras provenientes de viñedos de Departamentos vitícolas de la Provincia de Mendoza: Luján de Cuyo, Tupungato, Maipú y Junín. Se tomó una muestra representativa de 40 aislados. En cada levadura se evaluaron características tecnológicas que establecen la eficiencia de la misma en el proceso de fermentación (tolerancia al etanol, poder de fermentación, cinética de fermentación, resistencia al anhídrido sulfuroso, formación de sedimento, factor killer, preferencia de consumo de glucosa y fructosa, producción de espuma, formación de film o anillo) y cualitativas que ayudan a determinar la composición química y la participación en las cualidades sensoriales de los vinos (actividad β -glucosidasa, formación de ácido acético y producción de ácido sulfhídrico). Los ensayos se realizaron por triplicado. Los parámetros estadísticos fueron calculados en InfoStat, para el agrupamiento de datos se utilizó el programa NTSyS 2.0 mediante el coeficiente UPGMA. De la muestra de cepas utilizadas en este trabajo, pocas fueron las que presentaron todas las características enológicas deseadas para llevar a cabo una fermentación vínica, asimismo, no existe un criterio único de selección, en consecuencia se plantea una necesidad de evaluar levaduras en función de las características del mosto y del vino que se desea elaborar. Del análisis de los resultados se concluye que hay una cepa que cumple con los requerimientos enológicos propuestos para elaborar vinos blancos y puede ser usada también para fermentaciones lentas o detenidas, otra cepa óptima para vinificaciones tintas y al igual que el aislado anterior puede intervenir cuando es necesario reanudar fermentaciones o aumentar la velocidad de las mismas, se hallaron además 2 levaduras aptas para vinificaciones tintas. Por último, cabe destacar, que estos ensayos son suficientes para cumplir los objetivos planteados en este trabajo, pero si se desea trabajar a nivel comercial deben realizarse pruebas moleculares de identificación y ensayos de vinificación a mayor escala.

PALABRAS CLAVE

caracterización de levaduras – levaduras enológicas – selección de levaduras – levaduras de Mendoza – levaduras autóctonas

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, hermanos y sobrinos, a toda mi familia por su amor y apoyo.

A Juan Manuel, por su paciencia y compañía, por ser incondicional.

A M. Laura Sánchez, por su dedicación y generosidad, por creer en mí.

A Elizabeth Sfreddo y Nora Martinengo por brindarme sus conocimientos y ser parte de este proyecto.

A los integrantes de las cátedras de Microbiología y Enología I y II por ayudarme a cumplir este objetivo.

*Tus ojos veían todos mis días,
todos ya estaban escritos en tu libro...*

INDICE

CAPÍTULO I - INTRODUCCIÓN

I.1. Oferta mundial de vinos	1
I.1.1. Vitivinicultura en Argentina	2
I.1.2. Vitivinicultura en Mendoza	3
I.2. Las levaduras a lo largo de la historia	4
I.2.1. Taxonomía de las levaduras	5
I.2.2. Ecología y desarrollo de las levaduras	6
I.2.3. Las levaduras y la fermentación alcohólicas	8
I.2.4. Levaduras Seleccionadas	10
I.2.5. La selección de levaduras autóctonas	13
I.3. Hipótesis	21

CAPÍTULO II - OBJETIVOS

II.1. Objetivo general	22
II.2. Objetivos específicos	22

CAPÍTULO III - MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Procedencia de las cepas de levaduras	23
III.1.1. Determinación del tamaño de muestra	23
III.1.2. Designación de la muestra	24
III.2. Preparación de la colección de trabajo	26
III.2.1. Activación	26
III.2.2. Purificación, armado de la colección y mantenimiento	26
III.3. Metodología de ensayo	27
III.3.1. Caracterización de levaduras	28

CAPÍTULO IV - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. Resultados y discusión	33
----------------------------	----

CAPÍTULO V - CONCLUSIÓN

V. Conclusión	47
---------------	----

CAPÍTULO VI – BIBLIOGRAFÍA

VI. Bibliografía	48
------------------	----

ANEXO

I. Curvas de fermentación	55
---------------------------	----

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCION

I.1. Oferta mundial de vinos

La década del '90 fue testigo de un rotundo cambio en el escenario mundial de la vitivinicultura. Los tradicionales países europeos como Francia, Italia y España comenzaron a perder posiciones en los mercados debido a la competencia de los países denominados del "Nuevo Mundo"; entre ellos EEUU, Australia, Chile, Argentina, Sudáfrica y Nueva Zelanda que no contaban con tradición en el negocio, pero si con una estrategia de inserción comercial consolidada y eficiente (Calderón y col., 2005). En Argentina durante el año 2012 se incrementó levemente la facturación, las franjas de precios Ícono, Premium populares mostraron caídas tanto en valores como en volumen, mientras que los precios Premium, Súper premium presentaron crecimiento en sus exportaciones* (Winesur, 2013).

Los cambios de la oferta han provocado un incremento en la competencia internacional, donde los países del Nuevo Mundo vitivinícola han impuesto un modelo distinto de probada efectividad y mayor competitividad basado en cambios cualitativos en los viñedos, incorporación de tecnologías adecuadas, implementación de políticas rentables, armado de plan de acciones tendientes a expandir el mercado y estrategias de comunicación para transmitir cualidades de los vinos. Este nuevo escenario, derivado de profundos cambios en la estructura productiva de cada país, ha permitido que cada uno de los competidores logre una nueva posición en el mercado, colocando a la Argentina en el noveno lugar como país exportador luego de Francia, Italia, España, Australia, Chile, Estados Unidos, Alemania y Portugal. Aproximadamente el 70% de las exportaciones del país están dirigidas hacia la Unión Europea, Estados Unidos y Japón (Rodríguez, 2005).

Una vez logrado el posicionamiento en el mercado, los líderes del Nuevo Mundo apostaron nuevamente a la estrategia del terroir, Indicaciones Geográficas** (IG) y Denominaciones de Origen Controladas*** (DOC) como elemento distintivo y generador de valor agregado para sus vinos, focalizadas precisamente hacia la diferenciación que genera la estructura especial de un terreno delimitado (Calderón y col, 2005).

* La segmentación de calidades de los vinos realizada sobre la base del precio de caja de vino, en orden descendiente de precio, ícono costo mayor a 360 U\$\$, ultra premium entre 360-40 U\$\$, super premium entre 40-27 U\$\$, premium entre 27-20U\$\$, premium populares entre 20-13 U\$\$ y básicos menor a 13 U\$\$ (Winesur, 2012)

** LEY N° 25.163 CAPITULO III, ARTICULO 4: INDICACION GEOGRAFICA. A efectos de la presente ley, se entiende por Indicación Geográfica -IG- el nombre que identifica un producto originario de una región, una localidad o un área de producción delimitada del territorio nacional no mayor que la superficie de una provincia o de una zona interprovincial ya reconocida, la IG sólo se justificará cuando determinada calidad y las características del producto sea atribuible fundamentalmente a su origen geográfico. (INV, 2012)

*** LEY N° 25.163 CAPITULO IV, ARTICULO 13: DENOMINACION DE ORIGEN CONTROLADA. A los efectos de la presente ley, se entiende por Denominación de Origen Controlada -DOC- el nombre que identifica un producto originario de una región, de una localidad o de un área de producción delimitada del territorio nacional, cuyas cualidades o características particulares se deben exclusiva o esencialmente al medio geográfico, abarcando los factores naturales factores humanos. (INV, 2012)

I.1.1. Vitivinicultura en Argentina

Argentina, actualmente, posee una superficie cultivada con vid (*Vitis vinifera L.*) de 217.750 ha. La superficie implantada en Argentina constituye el 2,81 % de la superficie mundial (INV, 2013).

Si bien en un inicio el desarrollo de la vitivinicultura fue sostenido y el mercado interno tenía una importante demanda, entre los años 1982 y 1992 se produjo una significativa erradicación de viñedos de baja calidad enológica con exceso de rendimiento en la producción que representó un 36% de la superficie existente. En ese entonces, y a partir del año 1992, se inició un proceso de recuperación, implantándose cultivares con aptitudes organolépticas para el mercado internacional. Los cultivares (cv.) tintos más difundidos fueron Malbec, Cabernet Sauvignon, Merlot, Syrah y Sangiovese, con los cuales se elaboran vinos adecuados para guarda. Mientras que entre los blancos predominaron Semillón, Chardonnay y Sauvignon Blanc (Rodríguez y col., 2005).

Paralelamente, se observó una disminución del consumo de vino per cápita pasando de 80 litros en la década del '70 a menos de 29,23 litros en el año 2006; ocupando el sexto lugar luego de Francia, Italia, Estados Unidos, Alemania y España y el quinto lugar como productor de vinos precedido por Italia, Francia, España y Estados Unidos de América (Rodríguez y col., 2005; INV, 2013).

La disminución del consumo en el mercado interno generó en los últimos 10 años un sostenido incremento de las exportaciones de vinos, que fue acompañada con una mejora en la tecnología utilizada y se vio favorecida por el reconocimiento de las características cualitativas de los vinos argentinos en el exterior, posicionando a Argentina en el decimoprimer lugar con productos de excelente calidad.

Es por esto que, en el año 2006, la Argentina alcanzó una elaboración total de 21.786.785hL (vinos 15.396.350 hL - mostos 6.387.417 hL), de los cuales se exportaron 2.934.248 hL de vinos y 1.199.623 hL de mostos.

El incremento en las exportaciones fue un incentivo fundamental para el desarrollo de la industria vitivinícola y permitió compensar la disminución del consumo interno de vinos favoreciendo positivamente al sector en los últimos años.

En la actualidad, la producción total de uvas presentó una merma del 22% con respecto al año 2011, con bajas en la producción de todos los colores de uva siendo las tintas las que con una baja del 16% mostraron menos caída.

La elaboración de vinos en 2012 fue 24% menor que la de 2011, con un volumen total de 1.137 millones de litros (11.370.000 hL), de los cuales se exportaron 248.091 hL. La producción de mostos tuvo una caída del 21% (INV, 2013).

Selección de levaduras vínicas provenientes de la provincia de Mendoza

I.1.2. Vitivinicultura en Mendoza

La vitivinicultura constituye una de las principales actividades económicas de la provincia. En la actualidad hay 141.000 ha de viñedos que representan el 70% del total del país. En las últimas décadas ha alcanzado un alto grado de desarrollo, puesto de manifiesto en el mejoramiento de los cepajes y en el perfeccionamiento tecnológico.

La provincia se divide en cinco regiones de producción, próximas a los ríos de montaña más importantes y conformadas por los distintos oasis productivos indicadas en la Figura 1.

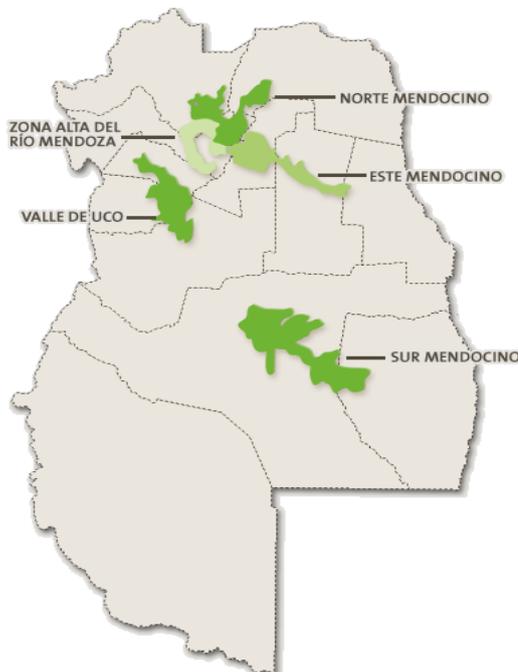


Figura 1. Regiones vitivinícolas de la provincia de Mendoza.

La Región del Norte de Mendoza (Las Heras, Lavalle), representa el 9,87% del total de la superficie vitícola de la provincia irrigada con aguas del río Mendoza. La Zona Alta del Río Mendoza o Región Centro (Godoy Cruz, Guaymallén, Luján de Cuyo, Maipú), históricamente conocida como «Primera Zona», comprende el 16,70% del total del área vitícola de Mendoza, irrigada también con aguas del río Mendoza. La Región del Este de Mendoza (Junín, La Paz, Rivadavia, San Martín, Santa Rosa) incluye el 48,07% del total cultivado en la provincia principalmente, está bañada por el curso inferior del río Tunuyán y Mendoza, completándose la demanda hídrica por agua subterránea captada por bombeo.

La Región del Valle de Uco (San Carlos, Tunuyán, Tupungato) comprende el 10,03% del total de viñedos de Mendoza que están regados por los ríos Tunuyán y Tupungato. La Región del Sur de Mendoza (General Alvear, San Rafael), incluye 15,34% de las viñas de la provincia de Mendoza y están irrigadas por los ríos Atuel y Diamante.

En la provincia predominan las variedades tintas como Malbec, Bonarda, Cabernet Sauvignon, Syrah, Merlot, Tempranillo y Pinot Noir, entre otras, con las que se elaboran vinos de una amplia gama de variedades. Entre las blancas se destacan las variedades Chardonnay, Pedro Giménez, Sauvignon blanc, Chenin, Torrontés Riojano, Ugni Blanc y Semillón. Las variedades rosadas son Criolla Grande, Cereza y Moscatel Rosado (Rodríguez y col., 2005).

I.2. Las levaduras a lo largo de la historia

El rol de las levaduras en la fermentación alcohólica solo fue claramente establecido recién a mediados del siglo XX. Los antiguos explicaban el fervor de la fermentación (del latín *fervere*, hervir) por acción del contacto de cuerpos que, al reaccionar durante el prensado de la uva, producían efervescencia.

Un mercader holandés, Antonie Van Leeuwenhoek, en 1680, gracias a un microscopio de su fabricación, llevó a cabo las primeras observaciones de levaduras a partir de un mosto de cerveza, pero no estableció ninguna relación entre esos corpúsculos y la fermentación alcohólica. A fines del siglo XVII, Lavoisier comenzó un estudio químico de la fermentación alcohólica, proseguido en el siglo siguiente por Gay-Lussac.

La primera demostración que la levadura fuera un organismo vivo, capaz de multiplicarse, perteneciente al reino Fungi, y cuya actividad vital se encontrase en el origen de la fermentación de líquidos dulces, fue llevada a cabo por un químico francés, Charles Cagnard de La Touren en 1837. Esta teoría fue confirmada por el naturalista alemán Schwann quien demostró además que la fermentación alcohólica es un proceso que puede ser detenido por el calor o por ciertos productos químicos. Llamó a la levadura de cerveza “zuckerpilz” es decir “hongo del azúcar”, nombre que dio origen al término *Saccharomyces* utilizado por primera vez por Meyen en 1838.

Esta concepción vitalista o biológica del rol de la levadura en la fermentación alcohólica, tardó mucho tiempo en imponerse, en particular por la opinión de algunos de los especialistas de la química orgánica, entre ellos Liebig, convencidos que las reacciones químicas, más que la actividad de células vivas, podrían explicar la fermentación de los azúcares.

Finalmente fue Louis Pasteur quien, en sus dos famosas obras, *Estudios sobre el vino* (1866) y *Estudios sobre la cerveza* (1876), acreditó definitivamente la tesis vitalista de la fermentación alcohólica. Pasteur demostró que las levaduras responsables de la fermentación espontánea de la vendimia prensada o del mosto, provienen de la superficie de la uva, y que de éstas existen muchas variedades y especies que pueden ser aisladas. Imaginó incluso que las características gustativas de los vinos pueden verse influenciadas por la naturaleza de las levaduras al efectuarse la fermentación alcohólica. Precisó el efecto del oxígeno en la asimilación de los azúcares por las levaduras y probó que éstas, además de alcohol y gas carbónico, forman otros productos, en menor cantidad, entre los cuales encontró glicerina (Ribéreau-Gayon, 1998).

En la actualidad, está confirmado que la mayoría de las levaduras utilizadas en la industria de alimentos para la producción de cerveza, vino, pan, etc., son clasificadas como

Saccharomyces cerevisiae. Sin embargo, no todas las cepas son aptas para los mismos procesos de fermentación. Es así que investigadores en biotecnología del vino continúan en una búsqueda constante de métodos que permitan diferenciar cepas industriales de la misma especie de *Saccharomyces cerevisiae*, principalmente por lo complejo de los ecosistemas enológicos, donde los mostos de fermentación no son estériles (Carrau y col., 2001).

I.2.1. Taxonomía de las levaduras

Las levaduras constituyen un grupo complejo y heterogéneo de microorganismos. Son definidas como hongos unicelulares que se multiplican por brotación o por fisión. Se clasifican por su modo de reproducción en: Basidiomicetos, Ascomicetos y Hongos Imperfectos (Deuteromicetos); las levaduras del vino pertenecen solamente a las dos últimas clases.

Según esta clasificación, las levaduras se distribuyen en 81 géneros a los cuales se relacionan 590 especies. Sin embargo, los géneros susceptibles de estar presentes en la uva y el vino son 16; es decir un número bastante limitado. En la Tabla 1 se resume la clasificación de las dos familias a las cuales pertenecen las levaduras enológicas: las *Saccharomycetaceae* en los Ascomicetos (esporógenas) y las *Cryptococcaceae* en los Deuteromicetos (asporógenas) con sus géneros asociados (Riberau-Gayon 1998).

Tabla 1: Clasificación de los géneros de levaduras esporógenas y asporógenas de la uva y del vino. (Kregger-Van Rij, 1984)

Familia de las <i>Saccharomycetaceae</i> (esporógenas)			Familia de las <i>Spermophtoraceae</i> (esporógena)	Familia de las <i>Cryptococcaceae</i> (asporógena)
Subfamilia	Subfamilia	Subfamilia		
<i>Schizosaccharomycetoideae</i>	<i>Nadsonioideae</i>	<i>Saccharomycetoideae</i>		
Género	Género	Género	Género	Género
<i>Schizosaccharomyces</i>	<i>Saccharomycodes</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Metschnikowia</i>	<i>Brettanomyces</i>
	<i>Hanseniaspora</i>	<i>Debaryomyces</i>		<i>Candida</i>
		<i>Dekkera</i>		<i>Kloeckera</i>
		<i>Hansenula</i>		<i>Rhoditorula</i>
		<i>Kluyveromyces</i>		
		<i>Pichia</i>		
		<i>Zygosaccharomyces</i>		
		<i>Torulaspota</i>		

La clasificación de levaduras propuesta por Barnett y col., 1990, se basa en los conocimientos de la genética y de la taxonomía molecular, en particular de las pruebas de reasociación ADN-ADN reportadas por Vaughan Martini y Martini (1987) y las experiencias de hibridación entre cepas de Naumov (1987) ha delimitado las especies del género *Saccharomyces* sólo a diez, distribuidas en tres grupos que se detallan en la siguiente tabla, donde solo las levaduras del grupo I presentan interés enológico.

Tabla 2: Clasificación de las especies de levaduras de género *Saccharomyces*. (Barnett y col., 1990)

Género - especie	Grupo
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces bayanus</i> <i>Saccharomyces paradoxus</i> <i>Saccharomyces pastorianus</i>	I Saccharomyces sensu stricto
<i>Saccharomyces dairensis</i> <i>Saccharomyces exiguus</i> <i>Saccharomyces servazzii</i> <i>Saccharomyces unisporus</i> <i>Saccharomyces castelli</i>	II Saccharomyces sensu lato
<i>Saccharomyces kluyveri</i>	III

I.2.2. Ecología y desarrollo de las levaduras

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 (Hidalgo Togores, 2003).

El número de levaduras encontradas en las bayas es bastante limitado, resultando en el orden de 10^3 a 10^5 células por grano de uva. Además, depende del estado sanitario de los racimos, de las condiciones climáticas del cultivo y del viñedo, y de los tratamientos fitosanitarios aplicados al mismo (Hidalgo Togores, 2003). Asimismo la concentración de estos microorganismos varían con el grado de maduración de la baya; próximo a iniciar el invierno disminuye la cantidad de levaduras ya que la planta entra en receso vegetativo, durante éstos meses, las levaduras encuentran refugio en las yemas, protegidas por la pubescencia y la cámara de aire debajo de las férulas (Formento y col., 2011; Lúquez y col., 2007).

En cuanto a las especies de levaduras, se encuentran principalmente, géneros de metabolismo oxidativo y forma apiculada como: *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Picchia* y *Hansenula*, y en mucha menor cantidad y raramente las del tipo fermentativo: *Saccharomyces*. Sin embargo estas últimas también se hallan en mayor número en las bodegas, sobre suelos, paredes, depósitos, conducciones y maquinaria de procesado, de tal forma que se considera a las instalaciones como parte de la ecología en las fermentaciones espontáneas (Hidalgo Togores, 2003).

Diversos trabajos coinciden en lo raro de encontrar *S. cerevisiae* y *S. bayanus* (ex *uvarum*) sobre el grano de uva. Sin embargo, esas levaduras no están ausentes. De hecho, es posible evidenciar su presencia colocando racimos en bolsas estériles, los cuales son prensados y vinificados en laboratorio en ausencia total de contaminación, la microflora produce una

fermentación espontánea y en la mayoría de los casos, a mitad de la fermentación, *Saccharomyces cerevisiae* representa la casi totalidad de las levaduras aisladas (Riberau-Gayon, 2003).

Cuando el mosto es inoculado de manera tal de lograr una población inicial de 10^6 células/mL, el proceso fermentativo comienza rápidamente, tras un corto período de latencia.

Contrariamente, sin la adición del cultivo iniciador o pie de cuba, este período es mayor ya que se produce una multiplicación de la microflora que espontáneamente contiene la vendimia, conocida como levaduras indígenas. Luego de la fase de latencia, se inicia el ciclo de crecimiento típico de *Saccharomyces spp* en las fermentaciones, el cual consta de tres etapas: La primera de ellas es una **fase de crecimiento exponencial** que dura entre dos y cinco días donde debido a la presencia de algunos factores selectivos como la anaerobiosis, el sulfitado, la elevada concentración de azúcares, y la presencia de etanol; aparecen cepas de levaduras del género *Saccharomyces* especialmente adaptadas al proceso fermentativo que, multiplicándose hasta poblaciones de 10^7 a 10^8 células viables/mL, realizan casi la totalidad del metabolismo de los azúcares, presentando velocidades de fermentación máxima. Continúa la **fase estacionaria** que dura aproximadamente ocho días y, a pesar de que el número de células no aumenta, la velocidad de fermentación sigue manteniéndose en su valor máximo debido a que las levaduras son metabólicamente activas. Finalmente el cultivo entra en una **fase de muerte** de hasta varias semanas donde decrece el número de células viables hasta 10^5 células/mL aproximadamente, lo cual va acompañado de una disminución en la velocidad de fermentación favorecida también por los efectos tóxicos del etanol y el agotamiento de nutrientes.

Durante esta de declinación, pueden aparecer otros géneros de levaduras consideradas como indeseables, generalmente de carácter oxidativo, como *Brettanomyces*, *Picchia*, *Candida*, etc. que se desarrollan en la superficie del vino, debiendo tomar medidas oportunas para evitar que esto suceda (Hidalgo Togo, 2003, Riberau Gayon, 2003). En la Figura 2 se muestran las poblaciones de levaduras para una fermentación espontánea de un mosto Malbec de Mendoza.

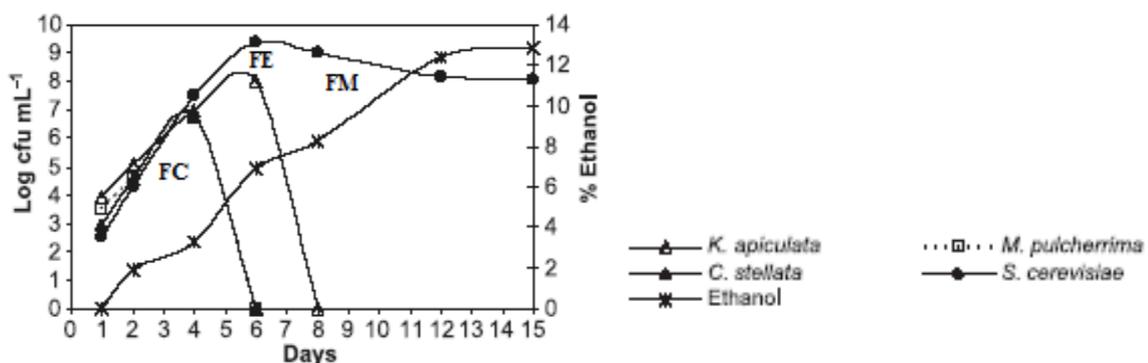


Figura 2. Fermentación alcohólica espontánea característica. Sobre la curva correspondiente a *S. cerevisiae* se indican las fases FC, fase de crecimiento; FE, fase estacionaria; FM, fase de muerte. (Combina y col. 2005)

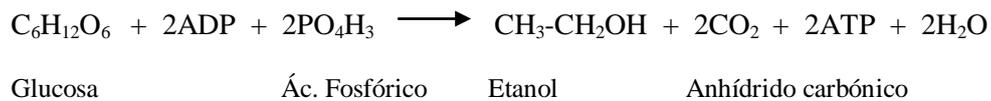
La población inicial de *S. cerevisiae* es superior a 10^2 ufc/mL, alcanzando al inicio de la fase estacionaria 10^9 ufc/mL, luego continua la fase de muerte con la declinación de la población. En esta misma figura se muestran además, las curvas de crecimiento observadas para otras especies involucradas en la fermentación espontánea como *Kloeckera apiculata*, *Candida stellata* y *Metschnikowia pulcherrima* (Combina y col., 2005).

I.2.3. Las levaduras y la fermentación alcohólica.

Las levaduras necesitan de un sustrato para desarrollar sus funciones vitales y para ello utilizan los azúcares fermentables del mosto, en el zumo hay desde 140 a 260 g/L según grado de madurez entre glucosa y fructosa en cantidades equivalentes en un medio netamente ácido (pH de 3,2 a 4,2 en nuestra región).

La *glicólisis o vía de Embden-Meyerhof* es el conjunto de reacciones bioquímicas que permite, a las células vivas, la transformación de glucosa y fructosa, en ácido pirúvico. Estas reacciones se producen tanto en aerobiosis en la respiración como también en anaerobiosis en las fermentaciones alcohólica o láctica, siendo un paso común en ambas vías.

La fermentación alcohólica puede resumirse según la siguiente ecuación:



La fermentación del mosto conduce a la producción de 8 a 15% (v/v) de etanol, obteniéndose un rendimiento alcohólico de un 1% v/v de alcohol por cada 17 gramos de azúcar fermentado. El etanol no se acumula en el citoplasma de la levadura, sino que por simple difusión lo abandona hacia el exterior, gracias a la gran permeabilidad que presentan las membranas celulares frente a las moléculas hidrófilas como el etanol. Durante este proceso se forman, además, ácidos orgánicos tales como ácido acético (0,1 - 0,4 g/L), y en menores cantidades ácido succínico, ácido pirúvico, ácido láctico, acetoína, diacetilo, 2,3-butanodiol, ácido citramálico, ácido dimetilglicérico, ácidos grasos y sus ésteres, alcoholes superiores y ésteres (Flanzy, 2003). La producción de anhídrido carbónico es de 56 litros por cada litro de mosto con un contenido en azúcares de aproximadamente 210 g/L (Hidalgo Togores, 2003).

La Figura 3 describe los pasos de la fermentación alcohólica, las enzimas implicadas en proceso, y los principales productos obtenidos.

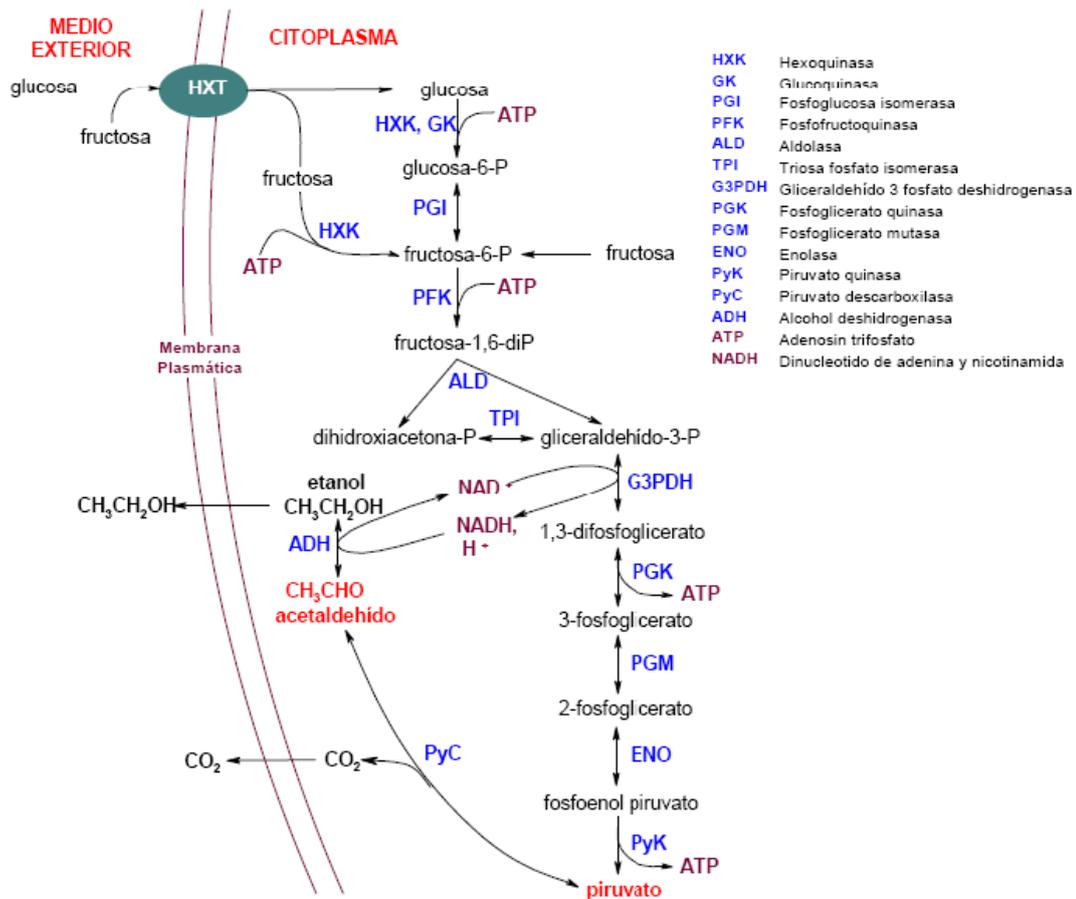
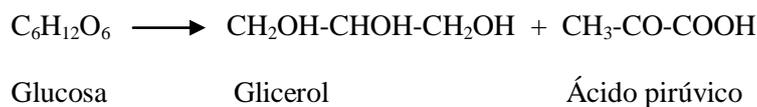
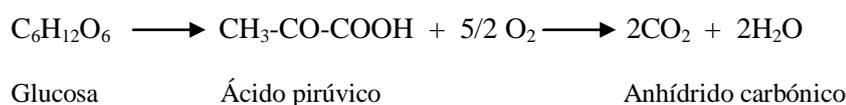


Figura 3. Metabolismo glicolítico de los azúcares por *Saccharomyces cerevisiae* y sistemas enzimáticos implicados (Abad Arranz, 2006).

Durante la fermentación alcohólica no todas las moléculas de azúcar se transforman en ácido pirúvico sino que algunas pueden convertirse en glicerina (6-11 g/L), en un proceso conocido como fermentación gliceropirúvica, de acuerdo con la siguiente ecuación resumida de Neuberg:



En la *respiración*, el ácido pirúvico formado por la glicólisis a partir del azúcar, se oxida por el *ciclo de Krebs* en anhídrido carbónico y agua, consumiéndose oxígeno y formándose una gran cantidad de compuestos, donde destacan: ácido cítrico, ácido α -cetoglutárico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido málico, ácido oxalacético, etc. La respiración puede expresarse del siguiente modo:



El transporte de los azúcares del mosto a través de la membrana plasmática, se produce por un complejo sistema de transportadores proteicos, produciéndose la glicólisis en el citosol

de la célula mientras que la respiración se produce en las mitocondrias. La actividad de transporte de los azúcares esta regulada por la actividad de síntesis de proteínas en la célula y también por la disponibilidad de nitrógeno asimilable que posee el medio; de tal modo que cuando la actividad de síntesis proteica decrece, la actividad de transporte de azúcares también lo hace.

En la fermentación alcohólica la formación de proteínas disminuye antes de que se alcance al máximo de población, entonces entre el 60 - 70 % de la fermentación se lleva a cabo con células en fase estacionaria. La adición de compuestos nitrogenados asimilables para las levaduras en esta fase, permite reiniciar la síntesis de proteínas y por lo tanto activar la fermentación por aumentar la actividad de transporte de los azúcares.

Por otra parte, se ha comentado que la aireación provoca un aumento de la biomasa o población de las levaduras, debido a una mayor disponibilidad de energía por las levaduras, que se traduce en una disminución de la producción de etanol, por reducirse la fermentación a favor de la respiración, siendo conocido este fenómeno por el “efecto Pasteur”. Sin embargo, cuando la concentración de azúcares es elevada, las levaduras los metabolizan exclusivamente por la vía de la fermentación alcohólica, aún en presencia de oxígeno, siendo conocido este fenómeno por el “efecto Crabtree”, que se manifiesta en las levaduras a partir de una concentración de azúcares de 9 gramos por cada litro de mosto (Hidalgo Togores, 2003; Ribéreau-Gayon, 2003).

I.2.4. Levaduras seleccionadas

La transformación del mosto de uva en vino constituye un complejo proceso fermentativo llevado a cabo por numerosos microorganismos. El conocimiento de la flora microbiana ha progresado desde que, en 1876, Pasteur afirmase que ... “*El gusto, las cualidades del vino, dependen en gran parte de la naturaleza especial de las levaduras que se desarrollan durante la fermentación de la uva. Pensamos que si sometemos a un mismo vino a la acción de levaduras distintas, obtendremos vinos de diversos tipos*”..., por este motivo es de vital importancia conocer la naturaleza específica de dichos microorganismos.

Los agentes físico-químicos del jugo de uva influyen en la producción y funcionalidad de las enzimas microbianas. Por lo tanto el curso y resultado final de cada fermentación puede ser diferente según las características fisiológicas de la levadura y las condiciones ambientales en que se realice (Suárez Lepe, 1997).

Durante las primeras fases de las fermentaciones espontáneas pueden crecer diferentes géneros de levaduras como *Kloeckera*, *Hanseniasspora*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Candida* y *Pichia*, procedentes de la uva o de los tanques de fermentación. En estos procesos naturales las especies de *Saccharomyces* acaban sustituyendo al resto de los microorganismos en el caldo de cultivo y son las que completan la fermentación (Zuzuarregui Miró, A. 2005), esto se debe a que

las características físico-químicas del mosto como su alto contenido de azúcar, pH bajo y la presencia de SO₂ ejercen una presión positiva y selectiva sobre esta especie, haciendo posible que domine la fermentación (Mercado y col., 2007).

Uno de los avances tecnológicos mas significativos en la industria vitivinícola ha sido el control microbiológico del proceso fermentativo por inoculación del jugo con cultivos seleccionados de *Saccharomyces cerevisie* (Fleet y Heard, 1988), cuando el mosto es inoculado masivamente con levaduras seleccionadas, el desarrollo de la fermentación prácticamente se realiza en pureza de la misma, obteniéndose un vino de características predecibles, garantizando un buen comienzo de la fermentación alcohólica y también su normal conclusión (Regodón Mateos, 2004; Hidalgo Togores, 2003; Esteve-Zarzozo, 2000; Fleet y Heard, 1988).

Las investigaciones actuales confirman que las levaduras no solo conducen a la fermentación en lo que respecta a la producción de etanol y dióxido de carbono , sino que tienen influencia decisiva sobre la calidad general del vino y en particular sobre sus características aromáticas relacionadas con la génesis de productos volátiles (Rainieri y col., 2000). Por lo tanto cada cepa otorga diferencias características en cuanto a tipicidad de un producto.

Durante años, las levaduras han sido objeto de estudio y selección en función de criterios de mejora de la calidad del vino o de tecnologías para conseguir productos tipificados por regiones.

Las investigaciones relacionadas a la selección de levaduras se basan en conocer el comportamiento de las mismas, evaluar si se ajustan a las necesidades tecnológicas de vinificación, y brindar un proceso predecible y seguro. En consecuencia, el uso de aislados seleccionados disminuye la variabilidad en la calidad de los vinos año tras año (Mas y col.; 2006).

La utilización de levaduras vínicas seleccionadas permite ejercer un control relativo sobre la fermentación y dirigirla en un determinado sentido. Los intereses económicos y comerciales de la bodega son los que señalan y orientan la utilización de estas y otras técnicas con las que se pretende controlar y corregir las diferencias. Como resultado de la utilización de levaduras seleccionadas se alcanza un alto grado de regularidad en la calidad de los vinos, contrarrestando incluso la heterogeneidad que aportan los mostos de cosechas de distinta procedencia. Además, pueden evitar las paradas fermentativas, fermentaciones incompletas o languidecientes (Llanos, 2003).

Tradicionalmente se han seleccionado levaduras provenientes de la microflora de la uva, debido a las relaciones existentes entre el binomio viñedo-levadura. Este concepto, preconizado por Ventre en las regiones de los grandes “cru”, coincide con el fundamento ecológico propuesto por Íñigo en 1964 (Suarez Lepe, 1997). Ambos señalan la necesidad de

seleccionar cepas autóctonas de las propias regiones donde se fueran a emplear. Apuntan al concepto de levadura local seleccionada; hoy en día hay una tendencia a seleccionar levaduras que van a ser utilizadas en la misma zona de producción. Numerosos autores coinciden con esta definición, entre ellos Capece y col., 2010; Abad Arranz, 2006; Mas y col., 2006; Nikolaou y col., 2006; Torija Martínez, 2002; Esteve-Zarzoso y col., 2000; Suárez Lepe, 1997.

En enología, independientemente de otros factores, las levaduras desempeñan un papel relevante en las características del producto final y existe la convicción de que para obtener vinos con determinadas cualidades se requiere, entre otros aspectos tecnológicos, la elección de una cepa de levadura adecuada; de modo que la calidad de los vinos es influenciada directamente por la evolución de la flora microbiana durante la fermentación (Barrajón Simancas y col., 2007).

La inoculación sistemática con levaduras secas activas (LSA) que se encuentran en el comercio, es una práctica enológica comúnmente utilizada en muchas bodegas. Sin embargo, en ocasiones a esta operación se le ha atribuido un efecto negativo sobre la biodiversidad de las levaduras naturales presentes en las bodegas, dado que utilizadas en gran cantidad, las levaduras comerciales podrían competir y eliminar las cepas autóctonas existentes en las bodegas (Santamaría y col., 2007; Combina y col., 2005).

La selección de una cepa de levadura NATIVA asegura el mantenimiento de las propiedades sensoriales típicas de los vinos producidos en una región dada. Su utilización como microorganismos iniciadores minimiza fluctuaciones en la calidad del producto final debido a factores ambientales que condicionan la microbiota levaduriana presente en la uva. Es por esto que la inoculación resulta ser una valiosa herramienta para la diferenciación y preservación del vino, a la vez que protege a la biodiversidad microbiana propia de cada ecosistema vitícola (Combina y col., 2005).

La elección de utilizar levaduras enológicas específicas implica que éstas pueden implantarse correctamente en el mosto. Esto supone una perfecta adaptación a la materia prima, tanto por sus características fermentativas como por la expresión de la especificidad de los caracteres para los cuales ha sido seleccionada (Mas y col., 2006; Trione, 1989); la práctica recomienda recurrir a levaduras autóctonas, las cuales están mejor aclimatadas a las condiciones de producción locales (Llanos, 2003).

Santamaría y col., 2007, estudiaron la participación en fermentaciones espontáneas de diferentes levaduras comerciales utilizadas durante varios años. La inoculación repetida de las mismas cepas comerciales año tras año, podría haber provocado una significativa presencia de estas levaduras tanto en el ecosistema de la bodega como en las fermentaciones espontáneas realizadas en ellas. Este dominio de las levaduras comerciales evidentemente supondría la

eliminación de las levaduras autóctonas, tanto *Saccharomyces* como No- *Saccharomyces*. Los resultados de su estudio revelaron que en los años posteriores a su empleo, estas cepas no participaban en fermentaciones espontáneas, y eran generalmente las autóctonas las que controlaban el proceso. La mínima presencia de cultivos comerciales, tanto en instalaciones como en fermentaciones espontáneas, podría deberse a que las levaduras comerciales utilizadas como inóculo no se han adaptado a las condiciones de las bodegas donde se han adicionado, y por ello han sido superadas por las cepas autóctonas, su conclusión coincide con la planteada por Cocolin y col., 2004 y Beltrán y col., 2002.

En resumen, el uso de cultivos de levaduras que proceden de la misma zona de vinificación, se las supone más eficaces debido a que:

- Son específicas del área y se adecuan mejor a las condiciones agroclimáticas de la zona, como la temperatura, humedad relativa, prácticas culturales, resultando así más competitivas.

- Están totalmente adaptadas a la materia prima, es decir a las características del mosto a fermentar como el contenido en azúcares reductores, acidez y pH.

- Son responsables, al menos parcialmente, de las propiedades de los vinos obtenidos, manteniendo las cualidades sensoriales típicas de los vinos producidos en la región dada.

Por estas razones, podrían dominar mejor la fermentación y se convertirían en el agente biológico más importante responsable de la vinificación (Mas y col., 2006; Torija Martinez, 2002; Esteve-Zarzoso y col., 2000).

Diversos autores coinciden en que las levaduras autóctonas seleccionadas deben tener ciertas características tecnológicas que las hagan convenientes para la elaboración de vino otorgando características de tipicidad (Abad Arranz, 2006; Mas y col., 2006; Cocolin y col., 2004; Nikolau y col., 2004; Esteve-Zarzoso y col., 2000; Rainieri y col., 2000; Regodon, 1997; Caridi y col., 1991) permitiendo lograr un producto de calidad homogénea y predecible (Barrajón Simancas y col., 2007).

I.2.5. La selección de levaduras autóctonas

Las cátedras de Microbiología, Enología I y Enología II, de la FCA, cuentan con una colección de levaduras vínicas con más de 400 cepas. Estudios anteriores permitieron el armado de una colección mediante el aislamiento, selección y multiplicación de individuos provenientes de diversos viñedos de Departamentos vitivinícolas importantes de la Provincia de Mendoza (Formento, y col., 2011; Sánchez, 2010; Formento, y col., 2009; Díaz Peralta y col., 2007; Formento y col., 2006; Diaz Peralta, 2002; Flores, 1999; Frigerio y col. 1999; Mathey, 1999).

Para llevar a cabo el proceso de selección, es necesario en primer lugar saber cuáles son los microorganismos presentes, es decir, se deben identificar a nivel de género y especie los aislados.

El uso de métodos de la biología molecular basados en análisis genéticos y de la taxonomía molecular permite la rápida y precisa identificación a nivel de especies o cepas, pero requiere instrumental específico, costoso y personal altamente especializado.

La realidad nos indica que en las bodegas de nuestra región es difícil encontrar laboratorios equipados con tecnología adecuada para esa identificación. Además, existen métodos microbiológicos que permiten conocer al microorganismo de manera suficiente para los fines tecnológicos. Este trabajo propone una identificación de los aislados factible de realizar en laboratorios enológicos, con equipamiento básico y mediante técnicas simples. Los criterios de selección aplicados fueron descritos por Pretorius (2000) y Zambonelli (1998) quienes los dividen en: TECNOLÓGICOS, los que establecen la eficiencia del proceso de fermentación y CUALITATIVOS que ayudan a determinar la composición química y la participación en las cualidades sensoriales de los vinos (Tabla 3).

Tabla 3: características de las levaduras vínicas según Pretorius (2000) Zambonelli (1998)

CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LEVADURAS ENOLÓGICAS	
CARACTERÍSTICAS DE DIFERENCIACIÓN	
Características macro y microscópicas	
Crecimiento sobre lisina	
Esporulación	
CARACTERÍSTICAS TECNOLÓGICAS	
FAVORABLES	DESFAVORABLES
Tolerancia al etanol	Formación de espuma
Poder de fermentación	Formación de película, anillo
Cinética de fermentación	
Resistencia al anhídrido sulfuroso	
Formación de sedimento	
Factor killer	
Fermentación de azúcares glucosa y fructosa	
CARACTERÍSTICAS CUALITATIVAS	
Actividad β -glucosidasa	Formación de ácido a partir de glucosa
	Producción de ácido sulfhídrico

El concepto de características enológicas favorables y desfavorables también fue propuesto por otros autores como Nikolau y col., 2006; Vincenzini y col., 2005; Suárez Lepe, 2004; Mas y col., 2006; Torija Martínez, 2002; Esteve-Zarzoso y col., 2000.

Este trabajo comienza con las CARACTERÍSTICAS DE DIFERENCIACIÓN, entre ellas se incluyen las *características macroscópicas* que describen a las colonias *Saccharomyces spp.* de coloración blanca a crema, consistencia butirosa, cremosa, de forma circular cuando son sembradas en agar nutritivo (Barnett y col., 1990). Bajo el aumento de un microscopio, se observan las *características microscópicas* de un cultivo joven y preparado en fresco, se

observan células esféricas, globosas u ovoides y presentan una brotación multilateral (Kurtzman y col., 1998; Barnett y col., 1990)

Para discriminar entre cepas *Saccharomyces spp.* y *no-Saccharomyces spp.* la bibliografía recomienda el uso de un *medio selectivo con L-lisina* como única fuente de nitrógeno. Por este método sólo dos especies del género *Saccharomyces* (*S. kluyveri* y *S. unisporus*) son capaces de crecer pero ellas no se encuentran en entornos enológicos, (Ribéreau-Gayon, 2003), el resto de las cepas del género no logran desarrollarse en un medio que contiene dicho aminoácido como única fuente de nitrógeno, las cepas *no-Saccharomyces*, en cambio colonizan en este medio sin mayores dificultades (Santamaría y col., 2007; Valero y col., 2004; Mas y col., 2006; Kurtzman y col., 1998; Barnett y col., 1990).

La capacidad de un microorganismo de *formación esporas* tiene valor taxonómico ya que determina la clasificación de la levadura en esporógena o no esporógena. Las ascosporas formadas por varias levaduras exhiben una amplia diversidad de formas, marcas superficiales, tamaño, color, número de esporas por asco y presencia de cuerpos de inclusión. Generalmente la mayoría de estas características son constantes para cada especie. *Saccharomyces spp* presenta esporas esféricas u ovals cortas (globosas), lisas y con un número entre una o cuatro esporas por asco (Kurtzman y col., 1998; Barnett y col., 1990).

A continuación se describen las CARACTERÍSTICAS TECNOLÓGICAS.

Con respecto a la *tolerancia al etanol*, también llamada *resistencia al estrés fermentativo*, se sabe que existe un gran número de sustancias, antisépticos químicos y antibióticos antifúngicos, que limitan a la multiplicación de las levaduras (Ribéreau-Gayon, 1998). El etanol producido por la fermentación disminuye la asimilación nitrogenada y paraliza el metabolismo de las levaduras modificando los sistemas de transporte activo a través de la membrana celular (Jiranek y col., 1995). El principal cambio producido por el etanol en la composición lipídica de las células es un aumento tanto de la proporción de ácidos grasos insaturados como de la longitud media de cadena, conduciendo a una mayor fluidez de membrana (Torija Martínez, 2002) pero la cantidad de alcohol que bloquea la fermentación depende de numerosos factores como son la cepa de levadura, la temperatura o la aireación. Una parada fermentativa supondría la presencia de azúcares residuales en el vino y por tanto los efectos negativos que esto conlleva. De aquí la importancia de evaluar la tolerancia al etanol de cada cepa.

La actividad de la levadura puede proseguir según aumente la concentración de etanol, o, al menos mientras la actividad inhibitoria del mismo no resulte excesiva. Generalmente, el primer efecto inhibitor (a partir de 12% v/v) es la imposibilidad de crecimiento y/o gemación,

así como la reducción de la viabilidad, mientras que la capacidad para seguir fermentando resiste niveles mayores de este compuesto hasta 15 % v/v (Abad Arranz, 2006).

La elección de la cepa depende de su tolerancia al etanol; resulta interesante recurrir a una levadura resistente a este compuesto. En ese sentido podrían recomendarse aquellas identificadas como *S. bayanus*, pero es observable que, poseen predisposición para formar elevada acidez volátil. Por esta razón, se prefiere utilizar una cepa de *S. cerevisiae* seleccionada por su resistencia al etanol (Ribéreau-Gayon, 2003).

Se entiende por *poder de fermentación* o *poder alcoholígeno* la capacidad que tienen las levaduras para producir el máximo porcentaje de etanol al fermentar un mosto estéril con contenido de azúcares, igual o superior a 212 g/L de azúcar (12° Bè). En general, cuanto más alcoholizado está el vino más cuerpo tiene y más elevado es su extracto. La proporción de alcohol del vino está relacionado directamente con el estado de madurez de la uva; los porcentajes altos se alcanzan sólo en ciertos años favorables y en determinadas condiciones de cultivo, pero sin duda también influyen de forma notable las levaduras que llevarán a cabo esa fermentación del mosto (Abad Arranz, 2006).

La Ley 14.878 en su Artículo 17 especifica valores mínimos de alcohol potencial según el tipo de vino. Siguiendo este criterio se han clasificado a las levaduras en dos categorías, una agrupa a las cepas de las cuales se obtienen valores de alcohol potencial entre 12-14,99 % v/v y otra a las que producen cantidades de alcohol mayores o iguales a 15% v/v.

La *cinética de fermentación* está directamente ligada al ciclo de crecimiento microbiano; ésta puede seguirse mediante diferentes formas, entre ellas, dosificando la cantidad de azúcares reductores consumidos, determinando la concentración de alcohol producido o valorando los gramos de gas carbónico liberado. Conocer previamente el comportamiento de la cepa durante la fermentación alcohólica permite minimizar riesgos, en particular el de paralización de la fermentación (Ribéreau-Gayon, 2003).

La correcta cinética fermentativa asegura un inicio de la fermentación con mínima fase de latencia, disminuye las posibilidades de ataques bacterianos u oxidaciones, garantiza la ausencia de problemas de acabado asegurando que la cepa pueda terminar correctamente la fermentación sin que en el vino permanezcan restos de azúcares (Abad Arranz, 2006).

Existen levaduras que pueden ser seleccionadas en base a la *capacidad de resistir diferentes concentraciones de SO₂*. Las múltiples propiedades que presenta el SO₂ en la elaboración de los vinos han supuesto que en la actualidad no exista ninguna otra sustancia o tratamiento alguno capaz de sustituirlo. Las propiedades positivas del dióxido de azufre superan ampliamente las negativas, siendo hoy en día un instrumento indispensable en la tecnología de elaboración y conservación de vinos. Dentro de las primeras cabe destacar los efectos

antioxidantes, sus propiedades antimicrobianas selectivas especialmente frente a bacterias lácticas, el retardo en el arranque de la fermentación alcohólica que posibilita el desborde de los mostos blancos en combinación con bajas temperaturas, la intensa acción degradante sobre los hollejos que permite una mayor maceración en las vinificaciones en tinto, entre otros (Ribéreau-Gayon, 2003).

En cuanto a la acción selectiva del SO₂ sobre la microflora presente en los mostos, bacterias y mohos son más sensibles que las levaduras, siendo las apiculadas más sensibles que las del género *Saccharomyces*. Dicha resistencia varía con el género, la especie y la cepa (Zuzuarregi, 2005; Rainieri y col., 2000).

Durante la fermentación alcohólica, la liberación de gas carbónico puede acompañarse por la *formación de espuma*. Esto puede provocar desbordes, por lo que una baja producción evita este problema y a la vez mejora el aprovechamiento del volumen al quedar menos espacios de cabeza (Valade, 2004) a la vez que facilita las posteriores tareas de higiene de tanques y piletas de fermentación. Entre los factores que afectan ese carácter interviene ciertamente la constitución nitrogenada de los racimos, en particular su riqueza en proteína, la temperatura de fermentación y la naturaleza de la cepa de levadura. Las tentativas hechas para definir las condiciones de fermentación con el fin de eliminar este incidente, por ejemplo eliminación de proteínas mediante bentonita, no han desembocado en resultados satisfactorios (Ribéreau-Gayon, 2003). Durante los últimos años también aumentó la tendencia a utilizar levaduras seleccionadas para llevar a cabo la fermentación secundaria en la producción de vinos espumantes, en este caso particular de elaboración de estos vinos se presentan como características importantes la producción de espuma (Martínez Rodríguez y col., 2001), ya que una elevada formación de la misma genera inconvenientes durante la fermentación tanto en su elaboración por método champenoise como charmat.

En paralelo a la producción de espuma es importante evaluar la formación de sustancias adherentes tales como *película o anillo* en los recipientes de fermentación y de contención, bajo la forma de película o anillo; para el caso de elaboración de vinos espumosos se trata también de una característica no deseada ya que es la misma botella en donde se produce la fermentación secundaria y en ella se comercializa el producto (Martínez Rodríguez y col., 2001), asimismo representa un problema durante la elaboración de vino en grandes recipientes ya que dificulta las operaciones de higiene.

La formación de película podría ser un indicio de levaduras oxidativas *no Saccharomyces* que pueden enturbiar o formar velos en los vinos o adherirse a las paredes de los fermentadores.

Contrariamente, es importante que la levadura presente *formación de sedimento* en forma natural al finalizar el proceso de fermentación, (Mas y col., 2006; Torija Martinez, 2002) así, ayuda a las posteriores tareas de clarificación y limpieza, facilitando su separación del vino por trasegado, con la posibilidad de reincorporarlas nuevamente al mismo en caso de ser necesario o desecharlas completamente según el tipo de vino que se esté elaborando (Epifanio, 2005). Esta característica es relevante sobre todo en la elaboración de vinos espumosos (Zuzuarregui, 2005; Suarez Lepe 1993).

El *factor killer* parece ser un fenómeno importante en fermentaciones. En la elaboración de vino existe una preocupación acerca de las consecuencias que esa toxina tiene en otras levaduras durante la fermentación. Las cepas killer han sido encontradas en vinos de diferentes regiones del mundo (Hidalgo y col., 1994).

Las levaduras, llamadas asesinas o killer, cuyo genotipo es (K+, R+), secretan al medio toxinas proteicas capaces de matar a otras cepas denominadas sensibles (K-, R-). Por otra parte, las cepas llamadas neutras (K-, R+), no producen toxinas, pero son resistentes a éstas (Ribereau- Gayon 2003). Estas proteínas tóxicas son secretadas al medio y posteriormente son adsorbidas por receptores situados en la pared celular de levaduras sensibles, produciendo un cambio en la permeabilidad de la membrana plasmática. El factor killer, fue descubierto en *S. cerevisiae* aunque también existe en otros géneros de levaduras (Hidalgo y col., 1994). Si situamos a la levadura en un entorno competitivo podremos decir que la cepa killer o neutra tendrá mayores posibilidades de sobrevivir que una cepa sensible.

Debido a la posibilidad de una fermentación detenida cuando es realizada con una cepa sensible a causa del efecto killer, parece útil integrar la resistencia a la toxina killer entre los criterios de selección de las cepas enológicas (Ribereau- Gayon 2003, Higo y col., 1994).

Por otro lado, el uso de levaduras killer seleccionadas puede ofrecer, en principio, tres ventajas. En primer lugar, se las puede utilizar para eliminar del medio a levaduras sensibles que produzcan características enológicas no deseadas. También pueden ser escogidas en favor de su inmunidad a las toxinas de este tipo, ya que las cepas con carácter killer resisten la acción de su proteína tóxica. Por último, también pueden ser seleccionadas para producir toxinas killer estables que protegerán al vino de infecciones futuras por parte de levaduras contaminantes (Maturano y col., 2009).

En cuanto a la *fermentación de azúcares*, en el mosto sin fermentar contiene cantidades aproximadamente iguales de las dos hexosas glucosa y fructosa, *Saccharomyces cerevisiae* tiene preferencia por la glucosa (Dumont y col., 2008; Berthels, 2004). Aunque utilice la fructosa concomitante con glucosa, esta última se agota primero del medio, dando lugar a una

discrepancia entre la cantidad de glucosa y fructosa remanentes en el producto terminado (Berthels y col., 2004)

Al fermentar un mosto las levaduras presentan fuerte afinidad por el consumo de glucosa, por ello obtendremos un vino que contiene generalmente más fructosa que glucosa. Puesto que la fructosa es aproximadamente dos veces más dulce que la glucosa, su presencia como azúcar residual tiene un efecto mucho más fuerte sobre el dulzor final del vino. Finalmente, se ha divulgado que las fermentaciones detenidas o lentas están con frecuencia asociadas a una elevada concentración de fructosa residual (Berthels y col., 2004). El nivel de glucosa residual en vinos con paradas de fermentación es 10 veces menor que las concentraciones de fructosa, lo cual explica que cuando las fermentaciones se paran, los azúcares que quedan están constituidos principalmente por fructosa. La frecuencia de las paradas de fermentación con fructosa residual plantea la necesidad del estudio de la capacidad de la levadura por consumir esta hexosa (Dumont, 2008; Berthels y col., 2004).

En cuanto a las CARACTERÍSTICAS CUALITATIVAS existen algunas muy importantes que deben considerarse en un proceso de selección.

El enólogo debe conocer no solo el comportamiento fermentativo de las levaduras que utiliza, sino también su incidencia sobre la tipicidad de los diferentes vinos que elabora. La composición de la uva en precursores de aromas es el origen de la riqueza aromática del vino. El rol de la levadura es transformar ese aroma potencial de la uva en aroma libre. Una adecuada cepa de levadura es la que permite expresar la fineza y la complejidad del carácter aromático de la uva.

La *actividad β -glucosidasa* de las levaduras produce la hidrólisis enzimática de los precursores del aroma: los heterósidos terpénicos (unión de un compuesto no glucídico llamado aglicona sobre la función semiacetálica de otra glucídica) no odorantes presentes en la uva madura, la hidrólisis enzimática de dichos compuestos aumenta la intensidad aromática de los mostos por revelación de los terpenos libres aromáticos (Hidalgo Togores, 2003; Ribereau-Gayon, 2003).

Los terpenos pueden encontrarse en la uva en forma aromática libre en cantidades inferiores a los terpenos combinados no aromáticos, generalmente en forma de glicósidos con la glucosa, arabinosa, ramnosa y apiosa. La parte aglicona de estos compuestos, son principalmente el linalol, el nerol y el geraniol.

Las levaduras que expresan la actividad mencionada son preferibles a las cepas que no logran expresarla. (Arevalo Villena y col., 2006; Mas y col., 2006; Suarez Lepe, 2004; Hernandez y col., 2003; Torija, 2002; Lemaesquier y col., 1995).

Se evalúa la *formación de ácido* por parte de las cepas. El ácido acético es el principal ácido volátil del vino y es siempre formado por la levadura durante la fermentación alcohólica. Se han sugerido las siguientes reacciones enzimáticas como responsables de la formación de ácido acético:

- Formación reversible a partir de Acetil-CoA y acetil adenilato mediante la enzima Acetil-CoA sintetasa.
- Rotura del citrato mediante la enzima citrato liasa.
- Producción a partir de piruvato mediante la enzima piruvato deshidrogenasa.
- Formación reversible a partir de acetil fosfato mediante la enzima acetil kinasa
- Oxidación del acetaldehído por la enzima acetaldehído deshidrogenasa.

También se produce durante las alteraciones microbianas. Mas allá de cierto tenor, que es variable según los vinos, la incidencia organoléptica de dicho compuesto en la calidad de los mismos es negativa y por lo tanto no deseada (Abad Arranz, 2006; Mas y col., 2006; Morata y col., 2005; Suarez Lepe, 2004; Torija, 2002; Lemaresquier y col., 1995). En los mostos de uvas sanas con tenor de azúcares reductores menores a de 220 g/l *S. cerevisiae* produce cantidades relativamente bajas (100 a 300 mg/l), pero variables según la cepa. Sin embargo en algunas condiciones de vinificación y fuera de toda contaminación bacteriana, la producción de ácido acético por la levadura puede ser anormalmente elevada y preocupar al vinificador (Ribereau-Gayon, 2003). De allí la necesidad de incluirlo dentro de los criterios de selección.

El ácido sulfhídrico y los compuestos azufrados son los causantes de defectos en el aroma. Presentan un umbral de percepción bajo, con olor a huevo podrido, cebolla podrida, plásticos, neumáticos. La *formación de compuestos sulfurados* a cargo de levaduras está bajo el control de las enzimas implicadas en la reducción de sulfatos y la biosíntesis de aminoácidos azufrados, especialmente metionina, aunque pueden existir otros precursores como sulfitos, polipéptidos azufrados y azufre elemental micronizado en el caso de viñas tratadas frente a ataques criptogámicos (Suarez Lepe, 2004; Ribereau-Gayon, 2003). En consecuencia, no es recomendable la selección de cepas que presenten elevada producción de estos compuestos (Swiegers, 2007; Mas y col., 2006; Torija 2002; Esteve-Zarzoso 2000; Caridi y col., 1991).

En resumen, las características deseadas para seleccionar levaduras son: adecuado arranque y correcta cinética de fermentación, baja producción de espuma rápida formación de sedimento para dar vinos límpidos y ausencia de formación de película/anillo. Debe resistir altas concentraciones de etanol para asegurar que la cepa finalice la fermentación, elevado poder de fermentación para dar vinos de graduaciones alcohólicas altas, que sea resistente al SO₂,

produzca trazas de acidez volátil y cantidades mínimas de compuestos sulfurados que puedan interferir en la expresión aromática del vino. (Suarez Lepe, 2003; Regodon, 1997).

Las características citadas anteriormente se adecuan para fermentación de vinos tintos y blancos, para estos últimos, es importante que además de las características señaladas, presente capacidad de producción de toxina killer, de manera de inhibir la microflora indígena en corto tiempo (Di Carlo, 1999) y que presente actividad enzimática para resaltar aromas (Suarez Lepe, 2003).

Finalmente, una particularidad a tener en cuenta al momento de seleccionar una levadura para reanudar fermentaciones detenidas es que deben ser capaces de cumplir con las mismas características que se exigen añadiendo actividad metabólica ligada a la capacidad de asimilación de la fructosa (Dumont, 2008; Berthels y col., 2004).

I.3. Hipótesis

Dentro del cepario de levaduras vínicas de las Cátedras de Microbiología y Enología I y II de la FCA existen cepas autóctonas de la provincia de Mendoza que presentan características tanto tecnológicas y/o cualitativas para ser seleccionadas con fines específicos de vinificación.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

II.1. Objetivo general

- Seleccionar levaduras para uso enológico con adecuadas características para la vinificación.

II.2. Objetivos específicos

- Identificar las levaduras que corresponden al género *Saccharomyces spp.*
- Evaluar las características tecnológicas y cualitativas de cada una de las cepas *Saccharomyces spp.*
- Agrupar cepas con características semejantes.
- Individualizar aquellas cepas que presenten propiedades tecnológicas y cualitativas que favorezcan el proceso de vinificación.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Procedencia de las cepas de levaduras

Las levaduras utilizadas para este trabajo fueron proporcionadas por las Cátedras de Microbiología y Enología de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNCuyo). Desde el año 1998, se desarrollaron investigaciones basadas en el aislamiento de levaduras vínicas provenientes de departamentos vitivinícolas de la Provincia de Mendoza, los cuales se realizaron a partir de muestras de uvas de diferentes viñedos. Como resultado de estos trabajos se conformó una colección que cuenta al año 2009 con un total de 414 levaduras nativas de los departamentos de Luján de Cuyo, Tupungato, Maipú y Junín; las cuales se encuentran bajo condiciones de mantenimiento.

Del total de las cepas, 23 pertenecen al departamento de Luján de Cuyo, 49 a Tupungato, 170 a Maipú y 172 a Junín.

III.1.1. Determinación del tamaño de muestra

Para determinar el número de unidades de análisis a extraer de la población se utilizó la técnica de muestreo estratificado proporcional, que consiste en la división previa de la población de estudio en grupos homogéneos denominados estrato o subpoblación y corresponden a cada uno de los departamentos. A cada estrato se le asignó en forma proporcional un número que determinó la cantidad de miembros del mismo que componen la muestra; es decir, el tamaño de la muestra dentro de cada estrato es proporcional al tamaño del estrato dentro de la población.

Con los resultados obtenidos se evaluará solo el comportamiento de cada individuo sin realizar inferencias sobre la población. Asimismo, el muestreo se realiza con la finalidad de tomar de manera representativa y al azar una cantidad de individuos proporcional al total de cada uno de los departamentos.

El número de levaduras calculado por estrato o departamento se determinó utilizando la siguiente ecuación de proporción:

$$n_i = n.N_i/N$$

Donde:

n_i : tamaño de muestra proporcional a la subpoblación o estrato de la población

n : número de individuos de la población total que forman parte de la muestra
(40 individuos que corresponden al 10% del total de la población)

N_i : subpoblación o estrato de tamaño conocido

N : población de N individuos (414)

A continuación se indica el número proporcional de levaduras a seleccionar por departamento.

Tabla 4: Proporción de levaduras muestreadas de cada departamento

DEPARTAMENTO	ESTRATO	N_i	n_i
LUJÁN DE CUYO	1	23	$n_i = 40.23/414 = 2.2 = \mathbf{2}$
TUPUNGATO	2	49	$n_i = 40.49/414 = 4.7 = \mathbf{5}$
MAIPU	3	170	$n_i = 40.170/414 = 16.42 = \mathbf{16}$
JUNIN	4	172	$n_i = 40.172/414 = 16.61 = \mathbf{17}$

III.1.2. Designación de la muestra

Para determinar las levaduras que conformaron la muestra se utilizó la técnica de muestreo aleatorio *Simple*, se extrajeron de cada uno de ellos, por sorteo, las unidades indicadas n_i (tamaño de muestra) en la tabla 4.

A las levaduras de cada uno de los estratos se les asignaron números correlativos (tabla 5) comenzando por el uno.

Tabla 5: Números asignados a las levaduras del cepario FCA para el muestreo aleatorio simple

LUJAN		TUPUNGATO					
Codigo	N°	Codigo	N°	Codigo	N°	Codigo	N°
FCA	asignado	FCA	asignado	FCA	asignado	FCA	asignado
1	1	1.1	1	9.5	24	17.5	47
2	2	1.2	2	10.1	25	MLB1	48
3	3	1.3	3	10.2	26	MLB2	49
4	4	2.1	4	11.1	27		
5	5	2.2	5	11.2	28		
6	6	2.3	6	12.1	29		
7	7	2.4	7	12.2	30		
8	8	2.5	8	13.1	31		
9	9	3.1	9	13.2	32		
10	10	4.1	10	14.1	33		
11	11	4.2	11	14.2	34		
12	12	5.1	12	15.1	35		
13	13	5.2	13	15.2	36		
14	14	6.2	14	15.3	37		
15	15	7.1	15	15.4	38		
16	16	7.2	16	15.5	39		
17	17	8.1	17	16.1	40		
18	18	8.2	18	16.2	41		
19	19	8.3	19	16.3	42		
20	20	8.4	20	17.1	43		
21	21	8.5	21	17.2	44		
22	22	9.1	22	17.3	45		
32	23	9.2	23	17.4	46		

MAIPÚ															
Codigo	N°														
FCA	asignado														
202.1	1	206.4	24	212.2	47	216.4	70	222.1	93	226.4	116	231.3	139	303.5	162
202.2	2	206.5	25	212.3	48	216.5	71	222.2	94	226.5	117	231.4	140	304.1	163
203.3	3	207.1	26	212.4	49	217.1	72	222.3	95	227.1	118	231.5	141	304.2	164
202.4	4	207.2	27	212.5	50	217.2	73	222.4	96	227.2	119	232.1	142	304.3	165
202.5	5	207.3	28	213.1	51	217.3	74	222.5	97	227.3	120	232.2	143	304.4	166
203.1	6	207.4	29	213.2	52	217.4	75	223.1	98	227.4	121	232.3	144	304.5	167
203.2	7	207.5	30	213.3	53	217.5	76	223.2	99	227.5	122	232.4	145	305.3	168
203.3	8	209.1	31	213.4	54	218.1	77	223.3	100	228.1	123	235.2	146	305.4	169
203.4	9	209.2	32	213.5	55	218.2	78	223.4	101	228.2	124	235.3	147	305.5	170
203.5	10	209.3	33	214.1	56	218.3	79	223.5	102	228.3	125	235.4	148		
204.1	11	209.4	34	214.2	57	218.4	80	224.1	103	228.5	126	235.5	149		
204.2	12	209.5	35	214.3	58	219.4	81	224.2	104	229.1	127	301.1	150		
204.3	13	210.1	36	214.4	59	219.5	82	224.3	105	229.2	128	301.2	151		
204.4	14	210.2	37	214.5	60	220.1	83	224.4	106	229.3	129	301.3	152		
204.5	15	210.3	38	214.6	61	220.2	84	224.5	107	229.4	130	301.4	153		
205.1	16	210.4	39	215.1	62	220.3	85	225.1	108	229.5	131	301.5	154		
205.2	17	210.5	40	215.2	63	220.4	86	225.2	109	230.1	132	302.3	155		
205.3	18	211.1	41	215.3	64	220.5	87	225.3	110	230.2	133	302.4	156		
205.4	19	211.2	42	215.4	65	221.1	88	225.4	111	230.3	134	302.5	157		
205.5	20	211.3	43	215.5	66	221.2	89	225.5	112	230.4	135	303.1	158		
206.1	21	211.4	44	216.1	67	221.3	90	226.1	113	230.5	136	303.2	159		
206.2	22	211.5	45	216.2	68	221.4	91	226.2	114	231.1	137	303.3	160		
206.3	23	212.1	46	216.3	69	221.5	92	226.3	115	231.2	138	303.4	161		

JUNIN															
Codigo	N°														
FCA	asignado														
501.1	1	506.1	24	510.3	47	514.5	70	519.3	93	524.1	116	528.4	139	503.b	162
501.2	2	506.2	25	510.4	48	515.1	71	519.4	94	524.1	117	528.5	140	503.c	163
501.3	3	506.3	26	510.5	49	515.2	72	519.5	95	524.1	118	529.1	141	503.d	164
501.4	4	506.4	27	510.6	50	515.3	73	520.1	96	524.1	119	529.2	142	503.e	165
501.5	5	506.5	28	511.1	51	515.4	74	520.2	97	524.1	120	529.3	143	504	166
501.6	6	507.1	29	511.2	52	515.5	75	520.3	98	525.1	121	529.4	144	505	167
502.1	7	507.2	30	511.3	53	516.1	76	520.4	99	525.2	122	529.5	145	506	168
502.2	8	507.3	31	511.4	54	516.2	77	520.5	100	525.3	123	530.1	146	507.a	169
502.3	9	507.4	32	511.5	55	516.3	78	521.1	101	525.4	124	530.2	147	507.b	170
502.4	10	507.5	33	512.1	56	516.4	79	521.2	102	525.5	125	530.3	148	507.c	171
502.5	11	507.6	34	512.2	57	516.5	80	521.3	103	526.1	126	530.4	149	507.d	172
502.6	12	508.1	35	512.3	58	517.1	81	521.4	104	526.2	127	530.5	150		
503	13	508.2	36	512.4	59	517.2	82	521.5	105	526.3	128	501.a	151		
504.1	14	508.3	37	512.5	60	517.3	83	522.1	106	526.4	129	501.b	152		
504.2	15	508.4	38	513.1	61	517.4	84	522.2	107	526.5	130	501.c	153		
504.3	16	508.5	39	513.2	62	517.5	85	522.3	108	527.1	131	501.d	154		
504.4	17	509.1	40	513.3	63	518.1	86	522.4	109	527.2	132	501.e	155		
504.5	18	509.2	41	513.4	64	518.2	87	522.5	110	527.3	133	502.a	156		
505.1	19	509.3	42	513.5	65	518.3	88	523.1	111	527.4	134	502.b	157		
505.2	20	509.4	43	514.1	66	518.4	89	523.2	112	527.5	135	502.c	158		
505.3	21	509.5	44	514.2	67	518.5	90	523.3	113	528.1	136	502.d	159		
505.4	22	510.1	45	514.3	68	519.1	91	523.4	114	528.2	137	502.e	160		
505.5	23	510.2	46	514.4	69	519.2	92	523.5	115	528.3	138	503.a	161		

En la tabla 6 se indica el número de levadura por departamento que fue seleccionada por el sorteo para conformar la muestra y la codificación asignada a cada una de ellas para facilitar la identificación de las mismas durante la investigación.

Tabla 6: Codificación asignada a las levaduras seleccionadas para la muestra por departamento

LUJAN		TUPUNGATO		MAIPU		JUNIN	
Código FCA	N° Asignado						
32	1	19	3	211.1	8	523.4	24
17	2	9.1	4	212.4	9	524.5	25
		9.2	5	213.1	10	525.4	26
		16.1	6	216.2	11	526.5	27
		6.2	7	217.3	12	510.1	28
				218.5	13	529.5	29
				230.3	14	512.4	30
				205.3	15	518.4	31
				214.3	16	522.4	32
				220.1	17	514.3	33
				222.1	18	522.5	34
				224.4	19	523.5	35
				225.2	20	524.4	36
				232.4	21	527.3	37
				232.3	22	529.4	38
				305.1	23	529.3	39
						527.4	40

III.2. Preparación de la colección de trabajo

III.2.1. Activación

Las levaduras provenientes del cepario se encontraban bajo condiciones de mantenimiento a -18°C en tubos eppendorf con glicerol al 20%.

Para la activación de cada cepa se tomó una alícuota del tubo de mantenimiento y se sembró en tubos con 2 mL de medio líquido YEPD (extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2%). Se incubó en estufa durante 24 hs. a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$. Se determinó el crecimiento positivo de las levaduras cuando se observó turbidez y formación de espuma, características propias de la actividad de las levaduras que indican la fase de crecimiento exponencial.

III.2.2. Purificación, armado de la colección y mantenimiento

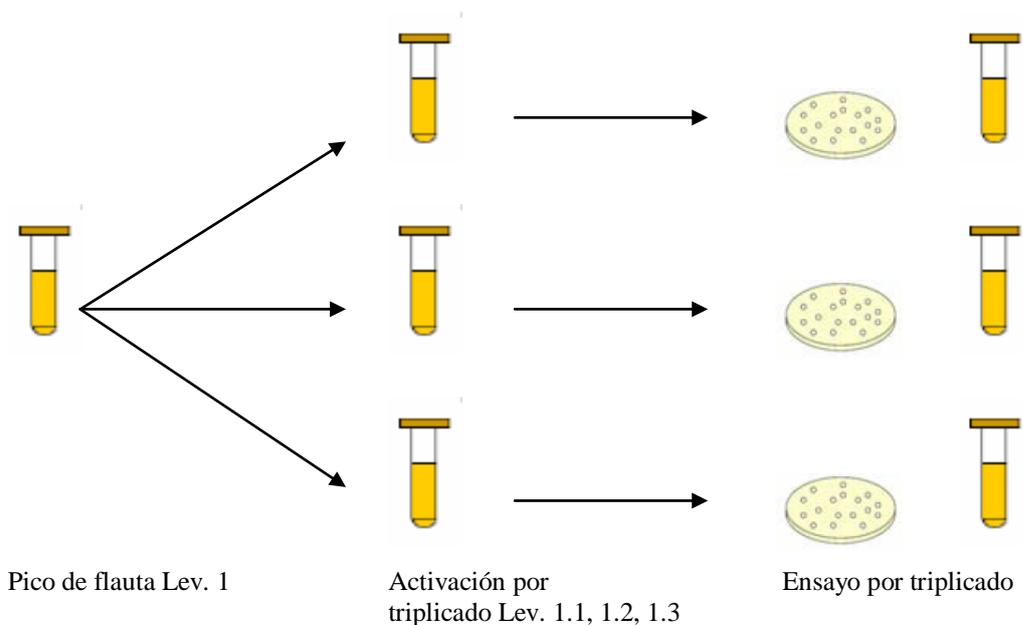
Para confirmar la pureza de la cepa luego de la activación, se realizó una observación microscópica en fresco bajo un objetivo de 40x entre porta y cubreobjetos. Se estirió el material en agar YEPD (agar 1,4%) se incubó durante 48 hs a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$. Se confirmó la pureza de los cultivos microscópicamente verificando la homogeneidad de los microorganismos, y macroscópicamente observando que todas las colonias resultaran iguales.

Una vez confirmada la pureza, se procedió a colocar la cepa en tubos con agar levadura glucosado (agar 1,4%, glucosa 2%, extracto de levadura 0,5%) inclinado y por duplicado; una serie conformó la colección de trabajo que fue utilizada para tomar el material celular necesario para realizar la activación de cada ensayo y la serie duplicada se conservó como colección stock o de mantenimiento.

III.3. Metodología de ensayo

Para realizar los ensayos que definen los criterios de selección de las levaduras se utilizó un cultivo en fase de crecimiento exponencial. Se tomó material celular del pico de flauta y se activó en tubos de hemólisis con caldo YEPD incubados en estufa durante 24 hs a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$; el cultivo se utilizó dentro de las 24 de haber sido activado y de esta forma se aseguró que las levaduras utilizadas se encontraban en dicha fase.

Se activaron las levaduras por triplicado, los ensayos fueron también realizados por triplicado respondiendo al siguiente esquema:



En la figura 4 se observa el ensayo de tolerancia al etanol, en el ejemplo, al 10%, v/v, realizada para las 40 cepas de la muestra por triplicado.



Figura 4: Tolerancia al etanol al 10% v/v

III.3.1 Caracterización de las levaduras

III.3.1.a. Características de diferenciación

- *Características macroscópicas:* Las levaduras fueron estriadas en Placas de Petri con agar YEPD, e incubadas durante 48 hs en estufa a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$. Se evaluó la homogeneidad y pureza de las colonias crecidas.

- *Características microscópicas:* Para cada levadura en estudio se realizó el montaje negativo con nigrosina, se observó morfología y pureza del cultivo al microscopio óptico con objetivo de inmersión (100x) utilizando aceite de cedro.

- *Crecimiento sobre lisina:* Una alícuota de 5 μl de levaduras activas se sembró en 3 placas con tres medios diferentes: 1- Medio con lisina como fuente de nitrógeno (glucosa 2%, fosfato diácido de potasio 0,1%, sulfato de magnesio hepta hidratado 0,05%, agar 2%, lisina 0,056%); 2- Medio con extracto de levadura como fuente de nitrógeno (glucosa 2%, fosfato diácido de potasio 0,1%, sulfato de magnesio hepta hidratado 0,05%, agar 2%, extracto de levadura 0,056%) y 3- Medio reemplazando la lisina por amonio. Se incubaron a durante 48 hs $28\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Las levaduras *Saccharomyces spp* no son capaces de utilizar la lisina como fuente de nitrógeno; para la diferenciación de género se aplicaron los siguientes criterios: levaduras *Saccharomyces* demuestran un crecimiento positivo en el medio número 2, con extracto de levadura como fuente de nitrógeno y negativo en los medios 1 y 3; mientras que las levaduras no-*Saccharomyces* presentan crecimiento positivo en el medio número 1 y 3 y negativo en el medio número 2.

Esporulación: Se sembraron las levaduras activas en picos de flauta con agar acetato (bactotriptosa 0,25%; glucosa 0,062%; cloruro de sodio 0,062%; acetato de sodio 3 H_2O 0,5%; agar 2,0%; pH óptimo 6-7) este medio es específico para inducir la esporulación de levaduras debido a que presenta una fuente de carbono difícil de fermentar: los tubos fueron incubados en estufa a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$. El tiempo requerido para la esporulación varía con las especies, y aún con las cepas de cada levadura. Por esta razón, las levaduras sembradas en el medio de esporulación deben estudiarse a intervalos frecuentes y regulares. Las esporas, una vez formadas, pueden germinar muy bien en ese mismo medio, por eso se realizaron observaciones periódicas del material entre portaobjetos y cubreobjetos en microscopio óptico. La esporulación es un método para diferenciar las especies de levaduras debido a que cada una de ellas presenta formas características.

III.3.1.b. Características tecnológicas

Tolerancia al etanol: Por cada cepa en estudio se sembró una alícuota de suspensión de levaduras activas en una serie de tres tubos con diferentes concentraciones de mosto alcoholizado (10 – 12 – 15 % v/v). Luego se sellaron con tapón de VAS-PAR (vaselina – parafina 50%) y se incubaron en estufa a $28\pm 2^\circ\text{C}$ durante 7 días. El desplazamiento del tapón indica que la levadura fermentó y produjo CO_2 resistiendo la concentración de etanol del medio. Si no hay movimiento, significa que el aislado no resistió la concentración propuesta.

Poder de fermentación: El poder fermentativo de las levaduras fue determinado mediante microvinificaciones realizadas para la cinética de fermentación. El poder fermentativo fue calculado gravimétricamente (Abad Arranz, 2006; Kurtzman y col., 1998) evaluando la pérdida de peso por liberación de CO_2 entre el inicio y el final de la fermentación de 30 mL de mosto:

$$\text{PF (\% v/v Etanol)} = [\text{P final (g)} - \text{P inicial (g)}] * 1,5$$

Cinética de fermentación: Se sembraron 2×10^5 células/mL, realizando el recuento en cámara de Neubauer (Figura 5), en erlenmeyers con que contenían 30 mL de mosto estéril, tapados con tapón de goma provistos con tubo de vidrio con algodón (Figura 6) para facilitar el desprendimiento de CO_2 , fueron incubados durante 12 días en estufa a $28\pm 2^\circ\text{C}$. La pérdida de peso fue registrada diariamente para graficar las curvas de fermentación.



Figura. 5: cámara de Neubauer
goma



Figura 6: Erlenmeyer con tapón de
goma

En la Figura 7 se muestran modelos de las diferentes cinéticas fermentativas que pueden presentar las levaduras durante el proceso de fermentación.

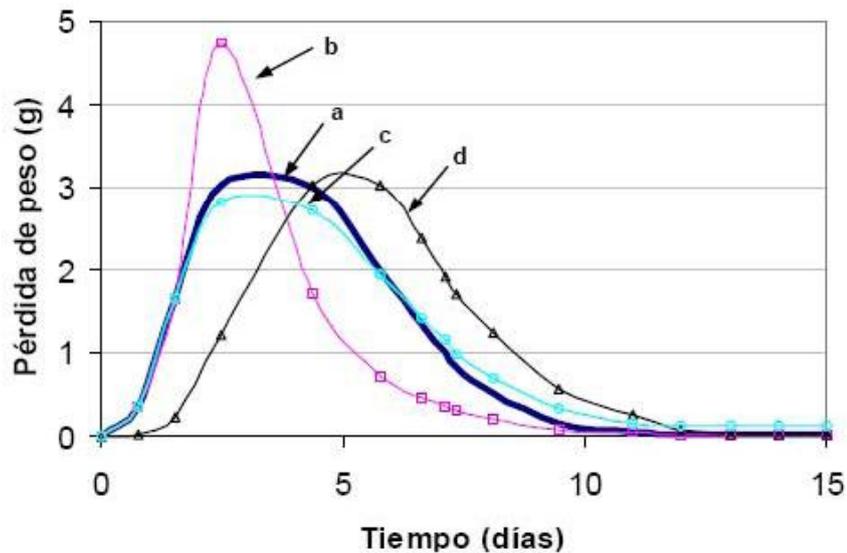


Figura 7. Diferentes cinéticas fermentativas. a) Correcta, b) Rápida, c) Con problemas de finalización, d) Con problemas de arranque (Abad Arranz, 2006).

Resistencia al anhídrido sulfuroso: Se sembraron 50 μ l de suspensión de levaduras activas en tubos estériles con 3 mL de mosto estéril en tres series para cada concentración del antiséptico

- 1- 50 ppm de anhídrido sulfuroso
- 2- 100 ppm de anhídrido sulfuroso
- 3- 200 ppm de anhídrido sulfuroso

Los tubos fueron sellados con tapón de VAS-PAR para poner en evidencia el crecimiento de las levaduras e incubados en estufa a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24-48 hs. Las cepas resistentes a la concentración de anhídrido sulfuroso en estudio logran desplazar el mencionado tapón.

Formación de espuma: Una alícuota de la suspensión de levaduras activas se inoculó en tubos de ensayo (16 mm x 160 mm) con 10 mL de mosto estéril y se incubó en estufa a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Se midió la altura de la espuma producida durante 10 días. Para la clasificación se tuvo en cuenta la altura máxima formada.

Las levaduras fueron clasificadas según Nikolaou (2004) y Regodón (1997) en tres categorías basadas en la altura máxima alcanzada por la espuma: F0 (menor a 2 milímetros), F1 (entre 2 y 4 milímetros) y F2 (mayor de 4 milímetros).

Formación de sustancias adherentes: Las levaduras activas fueron sembradas en tubos con 2 mL de mosto estéril, se incubaron durante 48-72 hs. en estufa a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, transcurrido ese lapso se observó la formación de película o anillo (Rainieri, 2000).

Formación de sedimento: Se realizó junto con el ensayo anterior, utilizando el mismo material, observando a las 72 horas la formación de sedimento.

Factor Killer: Para determinar si las cepas en estudio presentaban actividad killer se utilizó el método descrito por Suárez Lepe (1997).

El método consistió en sembrar cada levadura en fase de crecimiento exponencial en sendas Placas de Petri conteniendo un césped de cepas killer y sensibles. Se incubó a 23° durante 72 horas y se observó el crecimiento de los microorganismos interpretando los resultados de la siguiente manera:

- Cepas matadoras: Crecen en las dos placas y forman halo de inhibición en el césped de la placa sensible
- Cepas neutras: Crecen sobre los dos céspedes de cepas control, matadoras y sensibles
- Cepas sensibles: Solo crecen sobre el césped sensible y mueren sobre el césped matador

Fermentación de azúcares: glucosa y fructosa: Para esta determinación se utilizaron erlenmeyers provistos de tapón de goma con tubo de desprendimiento de vidrio, adicionados con 30 mL de caldo glucosa con extracto de levadura (extracto de levadura 0,5%, glucosa 10%). Por cada cepa en estudio se sembraron 2×10^5 células/mL, el recuento celular previo a la siembra se realizó en cámara de Neubauer. Los erlenmeyers se incubaron durante 12 días en estufa a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. La pérdida de peso fue registrada diariamente para valorar los gramos de CO_2 liberados.

El mismo procedimiento se realizó para determinar la fermentación de la fructosa, utilizando caldo fructosa con extracto de levadura (extracto de levadura 0,5%, fructosa 10%)

IV.3.1.c. Características cualitativas

Actividad β -glucosidasa: En Placas de Petri con medio específico para evidenciar la actividad β -glucosidasa (Extracto de levadura 1%; peptona 2%; glucosa 2%; citrato de Hierro Amonio 0,02%; esculina 0,5%; agar 2%) se sembraron ocho cepas de levaduras a razón de una gota de 5 μl de cada una. Las placas se incubaron durante 24 hs. a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ (Hernández y col., 2003).

La actividad β -glucosidasa se evidencia por la formación de un halo negro alrededor de la colonia que se forma por reacción entre la esculina hidrolizada que se transforma en esculetina por la actividad enzimática de la β -glucosidasa y la sal férrica soluble.

Formación de ácido a partir de glucosa: Se sembraron 5 μl de suspensión de levaduras activas en Placas de Petri con agar levadura glucosado adicionado con creta (extracto de levadura 0,5%, glucosa 2%, carbonato de calcio 1%, agar 2,5%). Las cajas fueron incubadas en estufa a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 48 hs.

La producción de ácido a partir de la glucosa se evidencia por la formación de un halo transparente alrededor de la colonia debido a la disolución del carbonato de calcio por la producción de ácido, la cual se cuantificó de la siguiente manera:

- +++++ halo de disolución mayor a 3mm / alta formación de ácido
- +++ halo de disolución entre 2-3mm / baja formación de ácido
- ++ halo de disolución entre 1-2mm / leve formación de ácido
- +/- halo de disolución menor a 1mm / trazas de ácido

Producción de ácido sulfhídrico: el cultivo en fase exponencial fue estriado sobre agar Biggy (Nikolaou y col., 2004) un medio de cultivo comercial preparado bajo las condiciones de fabricante (Oxoid) que pone de manifiesto la producción de ácido sulfhídrico. El medio de cultivo tiene sulfito de bismuto, siendo el sulfito el principal precursor de la producción excesiva de H₂S.

Las colonias se desarrollan de color chocolate al beige, de intensidad proporcional a la producción del sulfuro. El fabricante indica que la intensidad de coloración en este medio es una indicación de la máxima actividad de la enzima sulfito reductasa de una cepa dada determinada genéticamente. Debe tenerse en cuenta que otros parámetros de fermentación especialmente el contenido de nitrógeno y azufre del mosto, influyen en la producción de H₂S (Jiranek y col., 1995). A continuación se observa la intensidad de coloración observada y los resultados asociados.

- +++++ chocolate / alta formación de H₂S
- +++ beige-marrón / media formación de H₂S
- ++ beige / baja formación de H₂S
- +/- beige claro / trazas de H₂S

Cada una de las placas se sembró con cuatro levaduras activas diferentes y se incubó 28±2°C a durante 24 hs.

Con los resultados obtenidos, de las características descriptivas, tecnológicas y cualitativas, se procedió a agrupar las cepas por su semejanza a fin de facilitar su posterior análisis, utilizando el programa NTSyS 2.0 mediante el coeficiente UPGMA.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos de los ensayos tecnológicos y cualitativos realizados a las cuarenta cepas vínicas (tabla 6 Cap. IV – Materiales y Métodos), que fueron seleccionadas a partir de una colección de 414 individuos que pertenecen a las cátedras de Enología y Microbiología de la F.C.A., los mismos provienen de cuatro departamentos vitícolas de la Provincia de Mendoza: Luján de Cuyo, Maipú, Tupungato y Junín.

Para comenzar con la caracterización de género de los individuos se realizaron determinaciones para clasificar a las cepas; se tuvieron en cuenta sus características macroscópicas y microscópicas.

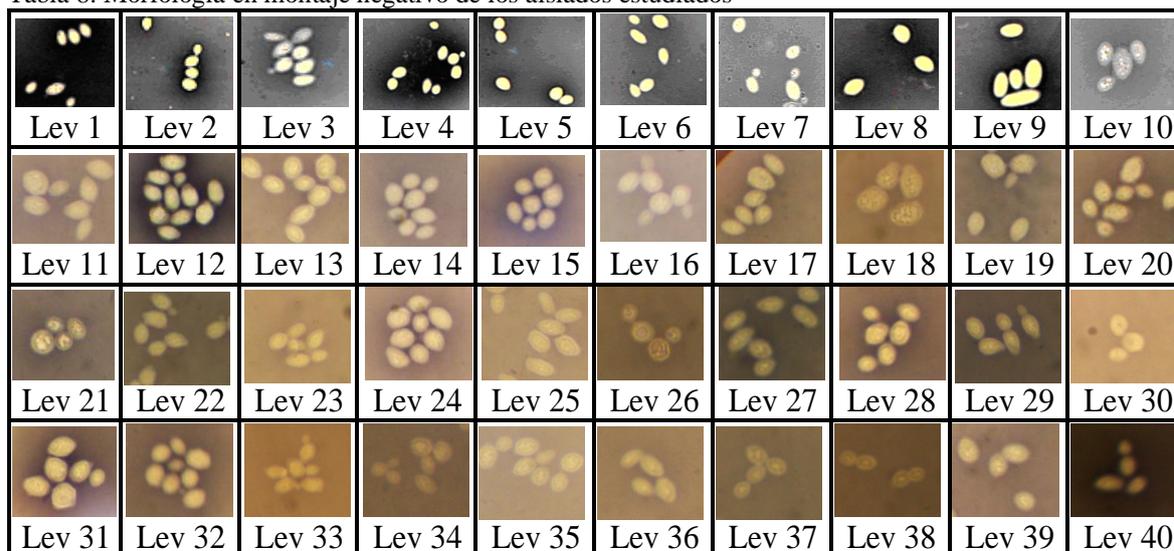
Las observación de los individuos que se muestra en las Tablas 7 y 8, indicó que todos corresponden al género *Saccharomyces spp*, debido a que coinciden con la descripción de las características macroscópicas y microscópicas descritas por Kurtzman (1998) y Barnett (1990). El género también se confirmó en medio selectivo con L-lisina como única fuente de nitrógeno en el cual no es capaz de crecer y/o desarrollarse (Santamaría, 2007; Valero, 2004; Ribéreau-Gayon, 2003; Mas, 2002; Kurtzman, 1998; Kenneth, 1997; Barnett, 1990).

Tabla 7: Características macroscópicas de las cepas en estudio

ASPECTO	COLOR	FORMA	TAMAÑO	CONSISTENCIA	ELEVACION	BORDES	N° DE CEPA
Lisa	Blanca	Circular	3-4 mm	Creмоса	Redonda	Lisos	1-2-3-4-5-6-17-18-20-24-25-29-30-31-34-32
Lisa	Blanca	Circular	2-3 mm	Creмоса	Pico	Lisos	7-8-10-11-12-21-23-28
Lisa	Blanca	Circular	1 mm	Creмоса	Pico	Lisos	9-16-27-33-39-40
Lisa	Blanca	Circular	3-4 mm	Creмоса	Chata	Lisos	37-38
Rugosa	Blanca	Circular	3-4 mm	Creмоса	Pico, elevada	Lisos	13-19-26
Rugosa	Blanca	Circular	2-3 mm	Creмоса	Chata	Lisos	14-15-35
Rugosa	Blanca	Circular	1-2 mm	Creмоса	Redonda	Lisos	36
Rugosa	Blanca	Ovoide	5 mm	Creмоса	Pico, aplastada	Lisos	22

En la Tabla 8 que se muestra a continuación, se observan las características morfológicas de las células de cada una de los aislados.

Tabla 8: Morfología en montaje negativo de los aislados estudiados



Por medio de la siembra en medios estresantes para la esporulación, se logró inducir este proceso en cada uno de los individuos. Se observaron esporas globosas o elipsoidales, con una pared lisa, conteniendo entre 1 a 4 esporas por asco, que concuerdan con las descritas para *Saccharomyces cerevisiae* por Suarez Lepe (2004) Kurtzman (1998) y Barnett (1990).

Diversos autores (Esteve - Zarzoso y col., 2000; Martín and Vaughan, 1990; Fleet y col., 1988) demostraron en sus investigaciones que los principales agentes de la fermentación alcohólica son cepas de la especie *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 (Barrajón Simancas, 2007; Esteve-Zarzoso, 2000), corroborando esta información con nuestros resultados podemos decir que las cepas que hemos estudiado pertenecen al género citado anteriormente.

Características tecnológicas

Tolerancia al etanol: El 80% de los aislados toleró las mayores concentraciones de etanol evaluadas (15% v/v), el 20% restante logró crecer sólo con 12% de alcohol. En la Figura 8 se muestra el ensayo de tolerancia al etanol a las tres concentraciones establecidas, para una repetición de cada cepa de la muestra. Se observa el desprendimiento del tapón de vas-par, debido a la presión de CO₂ generado durante la fermentación alcohólica, lo que indica que la cepa fue capaz de crecer en el medio alcoholizado.

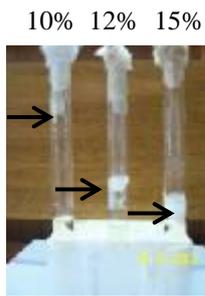


Figura 8: Desprendimiento del tapón de vaspar, como consecuencia de poder crecer en mosto con concentraciones crecientes de etanol (% v/v)

El 100% de los individuos provenientes del departamento de Luján de Cuyo y Tupungato mostraron tolerancia a la máxima concentración de etanol propuesta, los aislados de los departamentos de Junín y Maipú presentaron diferencias, el 17% de las cepas del primero no logró crecer a la más elevada concentración de alcohol, mientras que para el segundo el porcentaje fue del 37%.

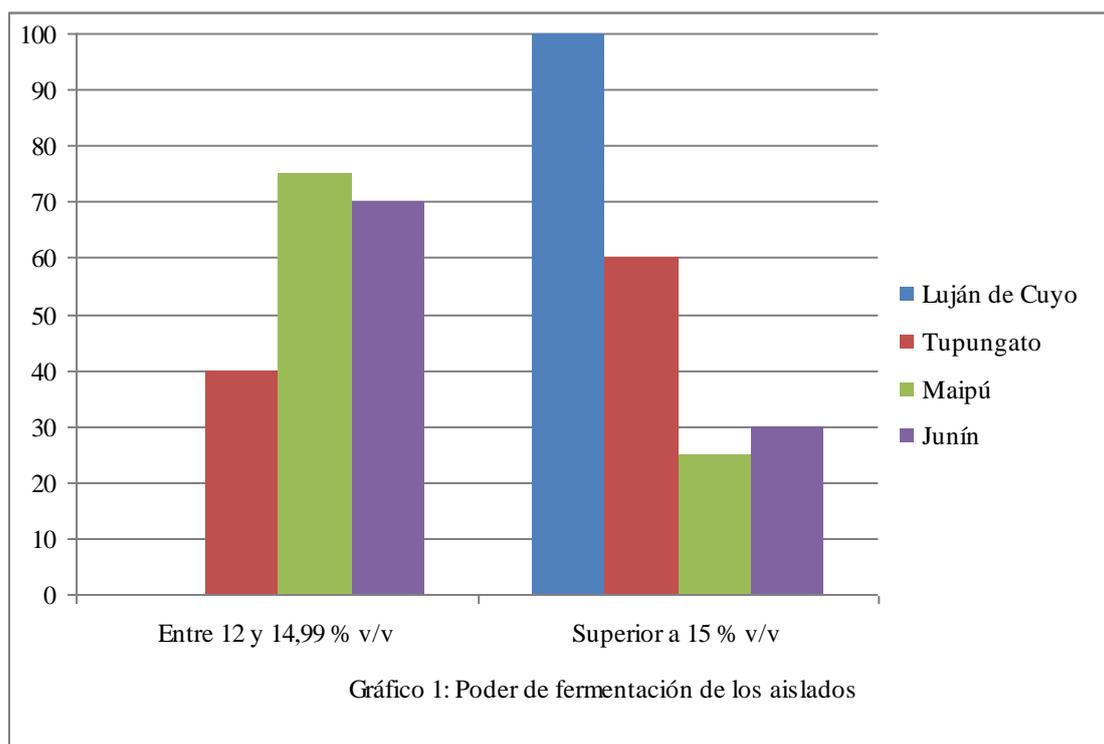
Esta determinación es importante debido a que el etanol es un compuesto tóxico para los microorganismos, el incremento de su concentración a medida que transcurre el proceso de fermentación podría ser una causa de su detención debido a la incapacidad de la cepa de tolerarlo (Abad Arranz, 2006).

Poder de fermentación: Expresa la capacidad que tienen las levaduras para producir vinos de elevado grado alcohólico, por tanto, corresponde al máximo porcentaje de etanol que una levadura es capaz de producir (Abad Arranz, 2006); es decir, indica la graduación alcohólica que se obtendrá en el vino obtenido.

El 60% de las levaduras presentaron un poder alcoholígeno entre 12-14,99% v/v, mientras que el 40% restante fue mayor o igual a 15%. La importancia de este análisis radica en que en un vino con mayor graduación alcohólica tendría un extracto más elevado a la vez se obtendrían vinos secos o con concentraciones de azúcares residuales mínimas (Arranz, 2006)

El Gráfico 1 representa el alcohol potencial de los aislados de las cepas de levaduras de los departamentos muestreados. Se observó que el 75% de los aislados del departamento de Maipú presentaron bajo poder de fermentación, mientras que con respecto a las cepas de Junín y Tupungato los resultados fueron del 70 y 40% respectivamente.

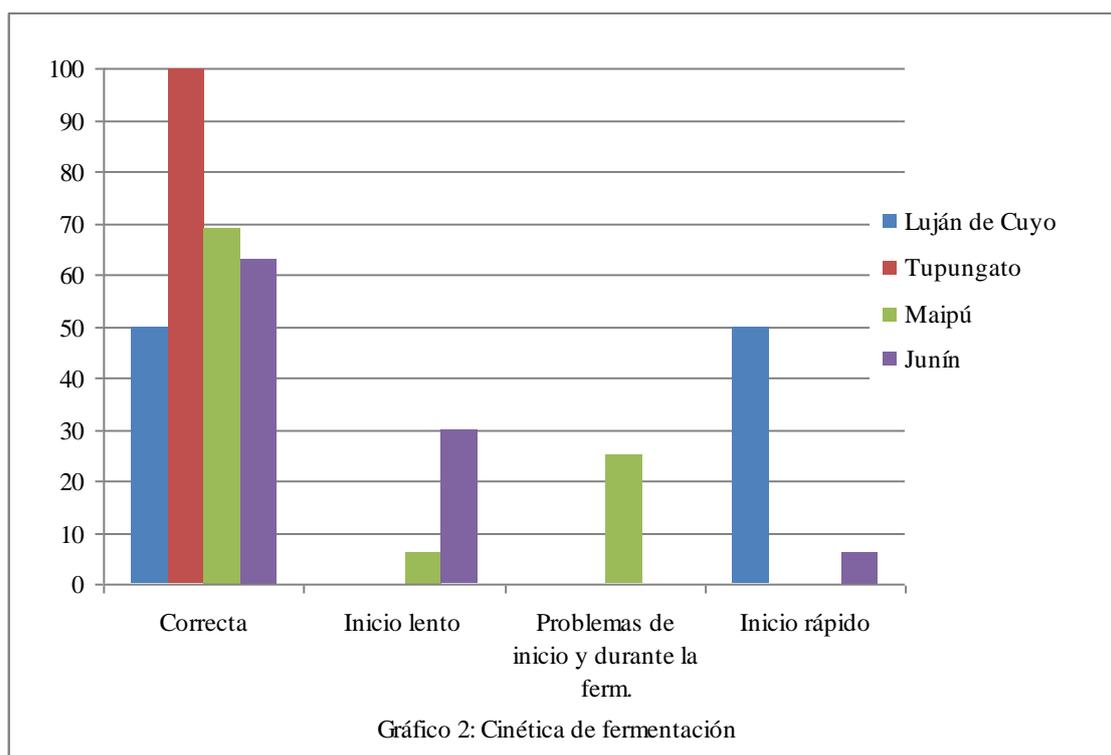
En cuanto a las cepas de la muestra que presentaron poder de fermentación superior a 15% se encuentran las del departamento de Luján de Cuyo, el 60% de Tupungato, el 25% de Maipú y el 30% de Junín.



Cinética de fermentación: Durante los 12 días de fermentación el 60% de los individuos desprendieron entre 8 y 9,99 g de CO₂, el resto desprendió de 10 a 15,5 g de CO₂. Se dispuso como valor de referencia un desprendimiento de CO₂ mayor o igual a 10 g, ya que ese resultado asegura un valor de alcohol potencial de 15% v/v.

Al comparar las curvas de fermentación obtenidas (Anexo I) con los modelos de las diferentes cinéticas fermentativas que pueden presentar las levaduras durante el proceso de fermentación (Fig. 8, Cap. IV - Materiales y Métodos), se observó que el 67,5% de las cepas presentaron una correcta cinética de fermentación, un 15% presentó problemas de arranque, pero luego fermentaron normalmente, igual porcentaje mostró problemas durante la fermentación y de finalización y por último un 2,5% mostró un arranque excesivamente rápido de la fermentación, alcanzando en tiempo breve la fase de crecimiento exponencial.

El comportamiento de las cepas según la cinética de fermentación (por departamento) puede visualizarse en el Gráfico 2, en él se destaca que el 100% de las que pertenecen a Tupungato, el 69% de Maipú, el 64% de Junín y el 60% de Luján de Cuyo presentan correcta cinética de fermentación.

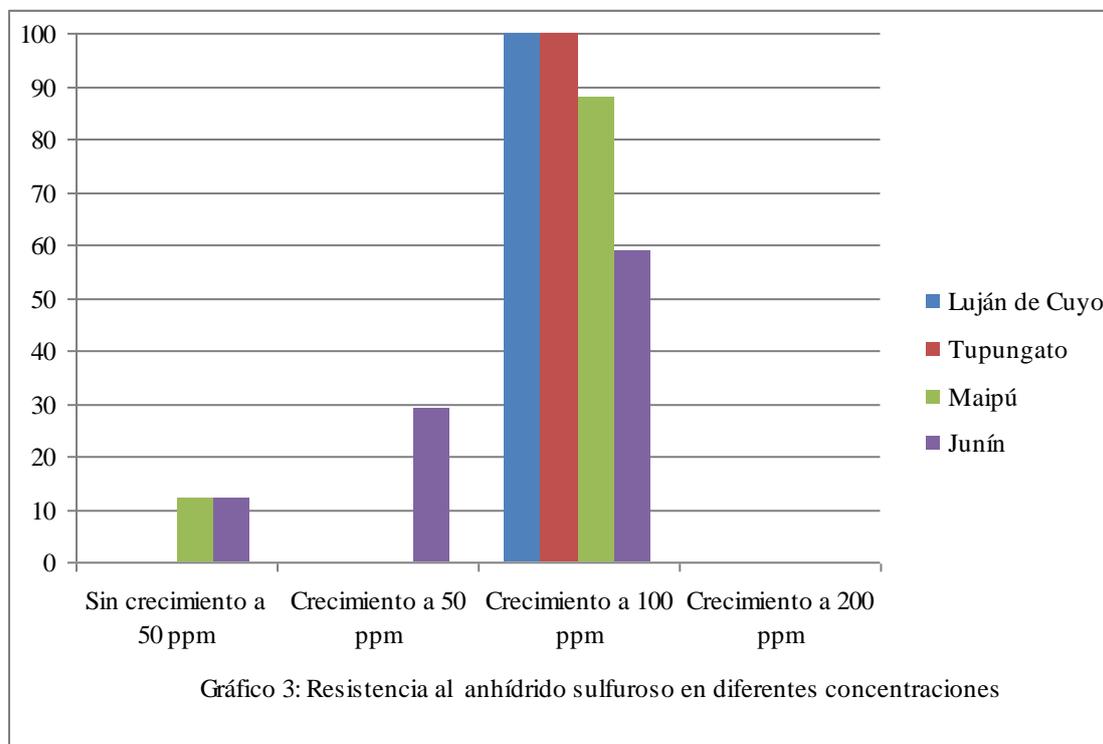


Una correcta cinética de fermentación garantiza la ausencia de desprendimientos calóricos bruscos, en consecuencia evitará elevaciones excesivas de temperatura que puedan provocar pérdidas aromáticas y disminución en la calidad del vino e incluso paradas fermentativas por muerte térmica de las levaduras. Además, permite reducir gastos innecesarios de energía en función de la refrigeración y garantizar que la cepa pueda finalizar correctamente la fermentación sin que en el vino permanezcan azúcares residuales.

Resistencia al anhídrido sulfuroso: En el presente trabajo se evaluó la resistencia de las levaduras a tres concentraciones de SO_2 aplicadas a mosto estéril (50-100-200 ppm). En los resultados se observó que sólo el 10% de las cepas no lograron crecer en presencia de SO_2 , mientras que el 12,5% toleró la presencia de 50 ppm, el 77,5% restante pudo desarrollar con 100 ppm, pero ningún aislado sobrevivió en concentraciones de 200 ppm de anhídrido sulfuroso. El sulfitado produce una esterilización parcial del mosto, permitiendo el control de microorganismos indeseables favoreciendo el desarrollo de cepas de *Sacchromyces cerevisiae* que son resistentes, 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 legales ya que su contenido 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 blanco y rosado abocado y dulce 210 mg/l, Resolución I.N.V, N° C-143/94).

Para cada una de las concentraciones propuestas, cepas provenientes de diferentes

departamentos mostraron los comportamientos que se detallan en el Gráfico 3. Los departamentos de Luján de Cuyo y Tupungato presentaron uniformidad en los resultados ya que el 100% de las unidades muestreadas para cada uno de ellos resistió a 100 ppm, seguidos por el 88% de Maipú y el 59% de Junín.



Formación de espuma: La elevada formación de espuma durante el proceso de fermentación puede provocar el desborde de las piletas, en consecuencia su mínima producción facilita las posteriores tareas de higiene. El valor ideal para la selección de una levadura es que presente una altura menor a 2 mm (F0), pero en caso de que la cepa demuestre otras cualidades se podría tolerar un aumento de este valor hasta 4 mm (F1). En este trabajo, el 22,5% de las cepas presentaron altura de espuma F0 (menor a 2 mm); el resto de los aislados midieron F1 (entre 2-4 mm), ninguna levadura presentó longitud F2 (superior a 4 mm).

El 80% de los individuos pertenecientes al departamento de Tupungato arrojaron alturas entre 2-4 mm y el 20% menor a 2mm. Para el resto de los departamentos el resultado de altura de espuma entre 2-4 mm fue superior al 94% y el porcentaje restante fue menor a 2 mm.

Formación de sustancias adherentes: La formación de estas sustancias en forma de anillo o película es una característica no deseada debido a que pueden enturbiar o formar velos en los vinos o adherirse a las paredes de los tanques o piletas. En los resultados se observa que el 17,5 % del total de las cepas formaron anillo en las paredes del tubo durante la fermentación, mientras que el 82,5% restante no produjeron sustancias adherentes.

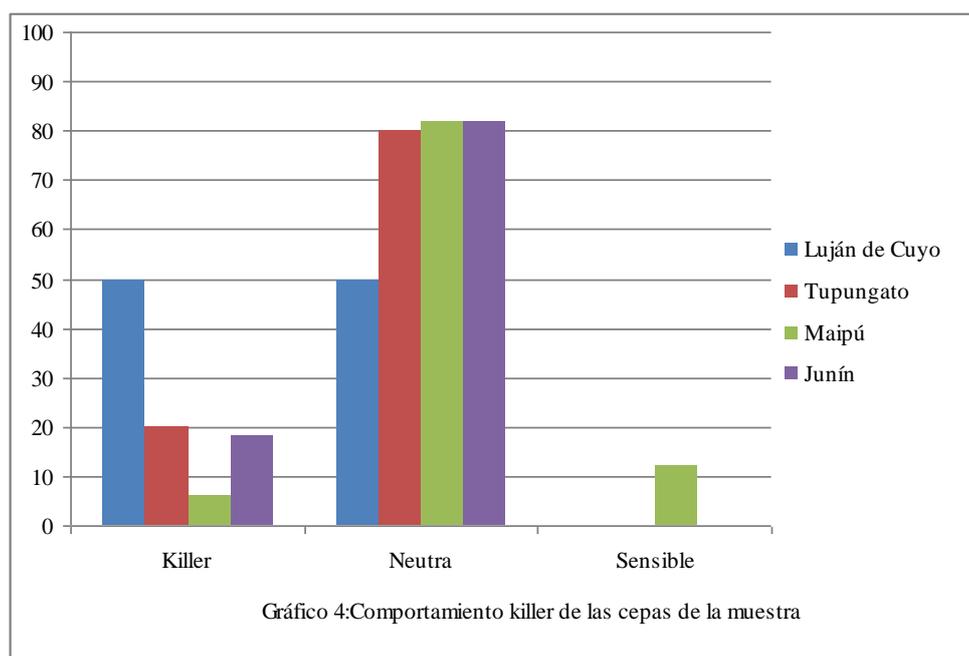
En cuanto al análisis por departamentos, Junín mostró que el 29% de las cepas formaron anillo, mientras que en Maipú el 12%.

Formación de sedimento: Una característica importante de la selección de levaduras es que luego de fermentar las células se depositen en el fondo del recipiente de manera de facilitar las posteriores tareas de separación. En este trabajo se observó que el 100 % de las levaduras en estudio presentaron sedimento a partir de las 24 hs de activación.

Factor Killer: El 15 % de las cepas presentaron actividad Killer, el 5 % se mostraron sensibles a la toxina y el 80 % restante se manifestaron neutras a la actividad tóxica. Tal como se describió el factor killer resulta una característica importante al momento de seleccionar cepas enológicas (Ribereau- Gayon 2003).

Según la bibliografía, el carácter “matador” está extensamente representado en la flora nativa de levaduras encontradas en la elaboración de vinos (Hidalgo 1994), pero cabe destacar la diferencia encontrada por Cocolin y col. (2004) que en su investigación reportaron un mayor porcentaje de incidencia de levaduras killer encontradas en nichos específicos como bodegas nuevas, ello resulta de una presión selectiva de la microflora residente, en nuestro estudio los aislados provenían de la naturaleza, por lo que la mayoría se observó como neutra.

Dentro de las levaduras de la muestra se hallaron cepas con actividad killer distribuidas dentro de los departamentos en estudio en diferentes porcentajes, tal como se observa en el Gráfico 4. Las cepas seleccionadas del departamento de Maipú fueron las únicas que presentaron individuos sensibles con el 12%. En cuanto al carácter killer Luján de Cuyo fue el que presentó mayor presencia de toxina con el 50 %, en cuanto a las neutras Tupungato, Maipú y Junín presentaron % similares entre 80 y 82%.



Fermentación de azúcares: glucosa y fructosa: Las levaduras *Saccharomyces* presentan una mayor afinidad en el consumo de glucosa. Los resultados obtenidos mostraron que el 25% de las cepas presentaron mayor afinidad en el consumo de fructosa, lo que se evidenció por un mayor desprendimiento de CO₂ en el medio conteniendo este azúcar como única fuente de carbono. Un 30% de las cepas no presentaron diferencias en el consumo entre uno y otro; mientras que el 45% restante presentó afinidad por la glucosa.

Las levaduras que presentaron cinéticas de consumo de fructosa semejante al consumo de glucosa, demostraron el carácter fructofílico y, por lo tanto, podrían comportarse mejor en situaciones de estrés; por ejemplo, en fermentaciones detenidas con niveles elevados de fructosa (Dumont, 2008). Debido a la importancia que radica esta determinación, y en función de las recomendaciones bibliográficas, se plantea la necesidad de evaluar el comportamiento de las levaduras en un medio que contenga ambos azúcares en iguales concentraciones, y realizando la determinación de las concentraciones mediante el uso de kits enzimáticos.

La mayoría de las cepas testeadas utilizaron la glucosa más rápidamente que la fructosa lo que confirma el carácter glucofilico de las cepas *Saccharomyces spp.* El resultado obtenido coincide con el de Berthels y col. (2004) quienes también demostraron que comenzado el proceso de fermentación con cantidades iguales de los dos azúcares observaron la preferencia por la glucosa, en consecuencia las levaduras parecen ser glucofilicas y es la causa de los elevados niveles de fructosa que quedan en los vinos con fermentaciones detenidas. Contar con levaduras con preferencia en el consumo de fructosa evitaría fermentaciones lentas o detenidas. El Grafico 5 demuestra el comportamiento de los aislados en cuanto al consumo de fructosa, en él observamos que el 50% de las cepas muestreadas del departamento de Luján de Cuyo presentan afinidad por el consumo de fructosa.

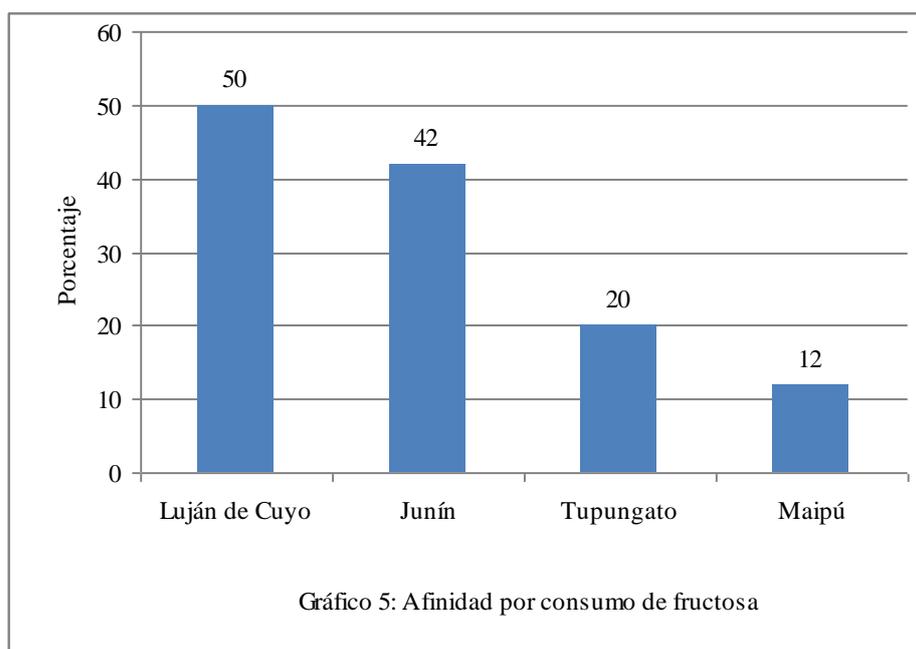


Gráfico 5: Afinidad por consumo de fructosa

Características cualitativas

Actividad β -glucosidasa: La totalidad de las cepas en este estudio expresaron actividad enzimática en el medio específico donde se produce la hidrólisis de precursores del aroma durante la fermentación. Si bien esta actividad es muy importante, cabe aclarar que los valores de pH del mosto de uva y del vino oscilan entre 2,8 – 3,5; la actividad enzimática disminuye aproximadamente un 33% en el mencionado rango. En consecuencia, es de esperar que esta actividad decaiga durante la vinificación (Hernández 2003). En la Figura 9 se observa el ensayo realizado a diferentes levaduras de la muestra acompañadas de un control negativo (levadura que no presenta actividad β -glucosidasa).

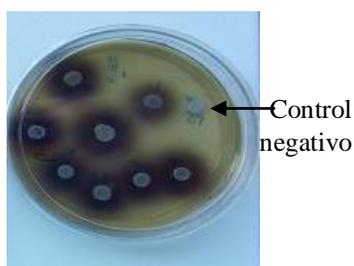


Figura 9: Actividad β -glucosidasa de las levaduras de la muestra

Formación de ácido a partir de glucosa: El 62% de las levaduras produjeron entre escasa y leve concentración de ácido, el 30% presentó baja formación y el 8% restante alta producción. Las cepas *Saccharomyces spp* durante la fermentación siempre producen cantidades relativamente bajas de este ácido (Figura 10); las mismas pueden variar según la cepa, las concentraciones de azúcar en el mosto, la temperatura de fermentación, por ello es importante la elección de un individuo con baja producción de este compuesto, ya que lo contrario podría afectar las características sensoriales del vino. La producción excesiva de este compuesto podría traer consecuencias en la comercialización ya que es un constituyente de la acidez volátil que tiene límites legales de 0,8g/L expresados en ácido acético. (Resolución INV, N° 633/81)

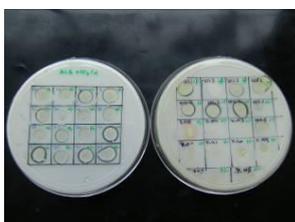


Figura 10: Visualización de halos transparentes debido a la disolución del carbonato de calcio.

De los aislados que formaron cantidades elevadas (más de 3 mm de halo de disolución) de ácido a partir de glucosa el 20% pertenecen al departamento de Tupungato y a Junín un 12%. El resto de los departamentos no presentaron cepas con esta característica.

Producción de ácido sulfhídrico: La capacidad de sintetizar estos compuestos depende de la cepa. 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 correspondiente. 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.

De los resultados obtenidos, el 42,5% de los aislados produjeron este compuesto en cantidades trazas o bajas, un 32,5% presentaron concentraciones medias, y el 25% restante mostraron alta producción del compuesto sulfurado. Estos resultados coinciden con los de Caridi (1991) quien también encontró que la mayoría de sus cepas estudiadas producían mínimas concentraciones de estos compuestos sulfurados y tampoco encontraron cepas no productoras. En la Figura 11 se observan las colonias coloreadas de acuerdo a la formación del compuesto.



Figura 11: Producción de H₂S

El 43% de las cepas que integran la muestra correspondiente a Maipú presentaron alta formación de compuestos sulfurados y el 17% de las cepas analizadas de Junín mostraron el mismo comportamiento. En el resto de los departamentos no se hallaron levaduras que demuestren excesiva formación de ácido sulfhídrico.

A continuación se muestra la Tabla 9 que resume los resultados de las determinaciones realizadas a cada uno de los aislados.

Tabla 9: Tabla resumen, resultados de las características de las cepas de la muestra

LEVADURA	CARACTERÍSTICAS DE DIFERENCIACIÓN		CARACTERÍSTICAS TECNOLÓGICAS											CARACTERÍSTICAS CUALITATIVAS					
	CRECIMIENTO SOBRE LISINA	ESPORULACIÓN	RESISTENCIA AL ALCOHOL			PODER DE FERMENTACIÓN	CINÉTICA DE FERMENTACIÓN gr CO ₂ / 30 ml	RESISTENCIA AL SO ₂			FORMACIÓN DE ESPUMA	FORMACIÓN DE PELÍCULA, ANILLO	FORMACIÓN DE SEDIMENTO	FACTOR KILLER	FERMENTACIÓN DE GLUCOSA gr CO ₂ / 30 ml	FERMENTACIÓN DE FRUCTOSA gr CO ₂ / 30 ml	ACTIVIDAD β-GLUCOSIDASA	FORMACIÓN DE ÁCIDO ACÉTICO	PRODUCCIÓN DE H ₂ S
			10%	12%	15%			50 ppm	100 ppm	200 ppm									
1	-	+	+	+	+	16,59	11,06	+	+	F1	-	+	N	6,63	6,28	+	+++	+++	
2	-	+	+	+	+	15,48	10,32	+	+	F0	-	+	K	6,65	7,92	+	+	++	
3	-	+	+	+	+	15,91	10,61	+	+	F1	-	+	K	7,55	6,52	+	+++	+++	
4	-	+	+	+	+	19,62	13,08	+	+	F0	-	+	N	7,59	6,2	+	+	++	
5	-	+	+	+	+	14,74	9,83	+	+	F1	-	+	N	6,69	5,66	+	+++	++	
6	-	+	+	+	+	19,27	12,85	+	+	F0	-	+	N	6,67	6,17	+	+	++	
7	-	+	+	+	+	14,91	9,94	+	+	F1	-	+	N	6,69	5,66	+	++++	++	
8	-	+	+	+	+	12,91	8,61	+	+	F1	-	+	S	6,49	6,35	+	+++	+++	
9	-	+	+	+	+	12,13	8,09	+	+	F1	-	+	N	5,83	4,96	+	+++	++++	
10	-	+	+	+	+	13,54	9,03	+	+	F1	-	+	N	6,64	5,75	+	+++	++++	
11	-	+	+	+	+	13,17	8,78	+	+	F1	-	+	K	7,05	6,03	+	++	++++	
12	-	+	+	+	+	14,45	9,63	+	+	F1	-	+	N	6,6	4,84	+	+	++++	
13	-	+	+	+	+	12,79	8,53	+	+	F1	-	+	N	9,78	6,61	+	++	++++	
14	-	+	+	+	+	18,16	12,11	+	+	F1	-	+	N	5,56	6,44	+	++	++++	
15	-	+	+	+	+	12,45	8,3	+	+	F1	-	+	N	7,79	5,84	+	+	++	
16	-	+	+	+	+	15,34	10,23	+	+	F0	-	+	N	10,51	14,68	+	++	+++	
17	-	+	+	+	+	12,87	8,58	+	+	F1	-	+	N	6,46	5,34	+	+	+++	
18	-	+	+	+	+	14,07	9,38	+	+	F1	-	+	S	6,55	6,45	+	+	++++	
19	-	+	+	+	+	12,4	8,27	+	+	F1	-	+	N	7,24	6,46	+	+	++	
20	-	+	+	+	+	13,56	9,04	+	+	F1	-	+	N	7,43	6,89	+	+	+++	
21	-	+	+	+	+	15,99	10,66	+	+	F1	-	+	N	8,43	7,24	+	+	+++	
22	-	+	+	+	+	12,06	8,04	+	+	F1	-	+	N	9,92	7,7	+	+	+++	
23	-	+	+	+	+	13,06	8,71	+	+	F1	-	+	N	10,33	8,18	+	+	+++	
24	-	+	+	+	+	22,56	15,04	+	+	F1	-	+	N	8,01	5,97	+	+	++	
25	-	+	+	+	+	15,16	10,11	+	+	F1	-	+	N	10,49	6,45	+	+	+++	
26	-	+	+	+	+	20,89	13,93	+	+	F1	-	+	N	7,85	10,75	+	+	++++	
27	-	+	+	+	+	13,63	9,09	+	+	F0	-	+	N	7,67	7,58	+	+++	++++	
28	-	+	+	+	+	13,33	8,89	+	+	F1	-	+	N	6,41	6,57	+	+++	+++	
29	-	+	+	+	+	12,57	8,38	+	+	F0	-	+	K	7,96	6,04	+	++	++	
30	-	+	+	+	+	16,29	10,86	+	+	F0	-	+	K	7,62	6,13	+	+++	++	
31	-	+	+	+	+	15,78	10,52	+	+	F0	-	+	N	6,38	6,76	+	+++	++	
32	-	+	+	+	+	21,46	14,31	+	+	F1	-	+	N	7,11	7,06	+	++	+++	
33	-	+	+	+	+	14,64	9,76	+	+	F1	-	+	N	6,64	6,47	+	+++	++	
34	-	+	+	+	+	13,84	9,23	+	+	F1	-	+	N	7,22	6,34	+	+++	++	
35	-	+	+	+	+	12,21	8,14	+	+	F1	-	+	N	8,14	5,63	+	+++	++	
36	-	+	+	+	+	13,83	9,22	+	+	F1	-	+	N	7,36	9,17	+	+	+++	
37	-	+	+	+	+	13,5	9	+	+	F1	-	+	N	8,93	5,56	+	++++	+++	
38	-	+	+	+	+	15,39	10,26	+	+	F0	-	+	N	6,07	6,28	+	+++	++	
39	-	+	+	+	+	13,68	9,12	+	+	F0	-	+	K	6,08	8,35	+	+++	++	
40	-	+	+	+	+	17,5	11,67	+	+	F0	-	+	N	6,28	7,29	+	+	++	

Selección de levaduras vínicas provenientes de la provincia de Mendoza

Con el fin de agrupar las cepas según su semejanza y facilitar el análisis de los resultados, se elaboró una matriz de similitud, a partir de la cual se obtuvo el dendograma correspondiente (Figura 12).

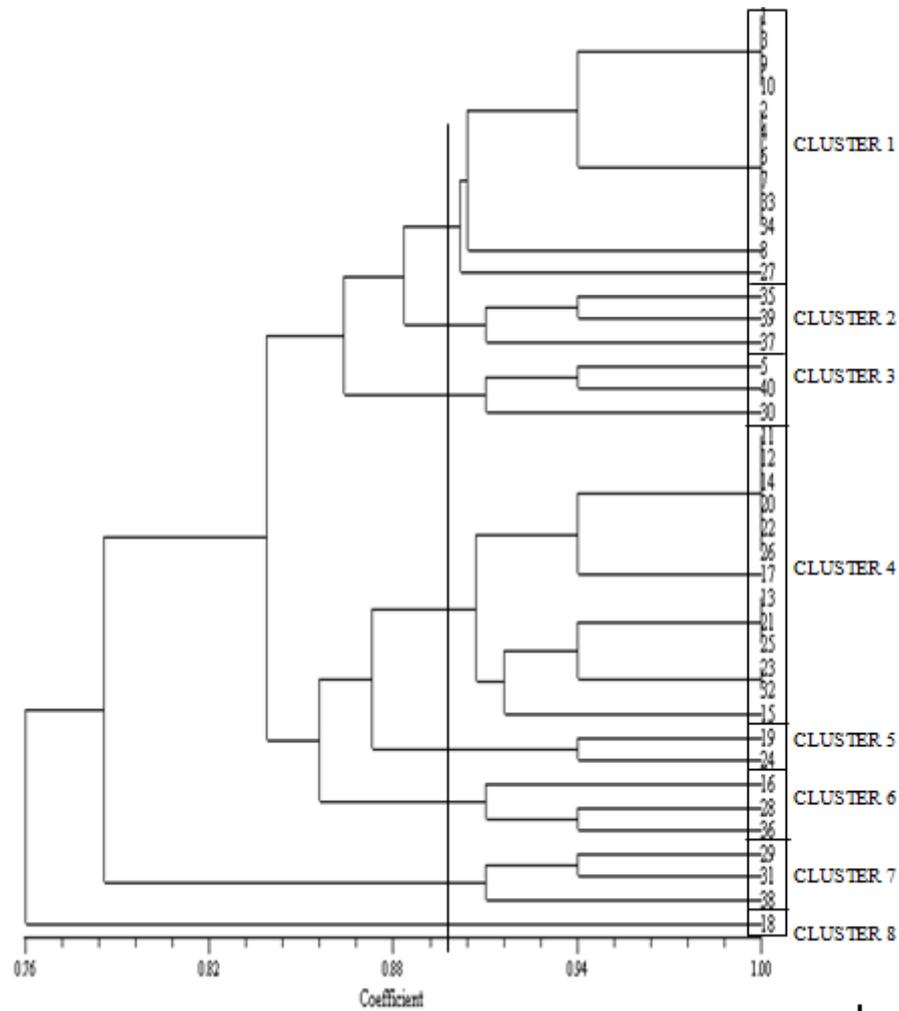


Figura 12: Dendograma obtenido con el programa NTSyS 2.0

En el análisis y para un nivel de similitud del 90% fue posible concentrar las cepas en ocho grupos con características tecnológicas y cualitativas similares. Posteriormente se realizó un análisis de cada uno de los cluster para buscar aquellas cepas que resulten adecuadas para vinificar.

Con respecto al primero de los clusters, una de las características más importantes que presentaron las cepas que lo conforman es que arrojaron valores de alcohol potencial superiores a 15 %v/v. Además, estas levaduras resistieron las más elevadas concentraciones de alcohol probadas, por lo que podrían ser seleccionadas para vendimias con importantes concentraciones de azúcar.

Asimismo, dentro de este grupo se presentan levaduras con retrasos al inicio de fermentación y otras que fueron sensibles a la toxina killer; las cepas 2, 4 y 6 fueron las que respondieron mejor a las características cualitativas para su posible selección.

La cepa número 2, pertenece al departamento de Luján de Cuyo, y la 4 y 6 son del departamento de Tupungato. Por sus características resultarían aptas para fermentar mostos, dado que presentan correcta cinética de fermentación, baja producción de espuma, sedimentan y no forman películas adherentes. Además resisten elevadas concentraciones de etanol, poder de fermentación superior a 15%v/v, resisten 100 ppm de SO₂, producen trazas de acidez volátil y de compuestos sulfurados. La cepa 2 podría también utilizarse en blancos por demostrar actividad glucosidasa para resaltar aromas y sería posible utilizarla en fermentaciones detenidas por su afinidad para consumir fructosa.

En el cluster 2 la similitud radica en que los aislados no toleran concentraciones superiores a 50 ppm de SO₂, antiséptico ampliamente usado en la industria vitivinícola, en consecuencia, ninguno de estos aislamientos sería factible de ser seleccionado, aunque cabe destacar que dentro de este grupo la cepa 39 presentó carácter killer y afinidad por el consumo de fructosa.

Los integrantes del cluster 3 tienen en común que pueden crecer a elevadas concentraciones de etanol, e inclusive con 100 ppm de SO₂, además producen mínimas cantidades de compuestos sulfurados. Las cepas 5 y 30 formaron de media a elevada concentración de ácido a partir de glucosa, este rasgo favorece el aumento en los valores de acidez volátil de los vinos producidos. Si bien la cepa 5 presentó problemas en relación al inicio de la fermentación logró finalizarla en forma adecuada y la 30 formó sustancias adherentes a las paredes del recipiente, lo que impide su selección ya que dificulta las operaciones de limpieza y desinfección. Dentro de este grupo encontramos la cepa 40 que reúne condiciones óptimas para reanudar fermentaciones lentas o detenidas debido a que presenta afinidad para fermentar medios con contenidos de fructosa y para elaborar vinos tintos.

Las cepas pertenecientes al cuarto cluster, no formaron película o anillo, además produjeron trazas o leve formación de ácido a partir de glucosa, como característica negativa presentaron espuma F1 y media a elevada producción de H₂S. Se observaron cinco de ellas poseen elevada resistencia al etanol, una que presentó carácter killer y otra elevado poder de fermentación, pero todas las cepas del cluster presentaron la característica negativa de formar de media a elevada concentración de compuestos sulfurados, además tres de ellas, 22, 23 y 25, presentaron problemas en el arranque de la fermentación y durante la misma. Por estas razones, tampoco son seleccionables para ser utilizadas como iniciadoras.

En el cluster cinco se concentran levaduras cuyas características positivas son que lograron resistir elevadas concentraciones de etanol y 100 ppm de SO₂, formaron trazas de compuestos sulfurados y baja formación de ácido a partir de glucosa, además son neutras a la toxina killer. Pero la cepa 19 presentó bajo poder de fermentación y la 24 formó anillo y película adherente, ambas características negativas para la selección.

Los individuos del cluster 6 demostraron elevada resistencia al estrés fermentativo, formaron anillo y película adherente y presentaron media formación de compuestos sulfurados, favoreciendo la presencia de defectos en el vino por aromas a reducido. Asimismo, cabe rescatar las cepas 16 y 36 que presentaron afinidad por el consumo de fructosa y la 16 demostró, además, elevado poder de fermentación.

Los aislados del cluster 7 formaron espuma F0, leve producción de ácido, baja producción de compuestos sulfurados. La cepa 29 no toleró concentraciones superiores a 50 ppm de SO₂, además presentó problemas de arranque de fermentación y la 31 formó anillo/película. Dentro de este grupo se destacan los individuos 31 y 38 por presentar elevado poder de fermentación.

La cepa 18, única integrante del cluster 8, presentó un desprendimiento de CO₂ menor a 9,99 gramos, además produjo anillo/película. Con respecto a la actividad killer es sensible y se observó una elevada formación de compuestos sulfurados.

En el presente trabajo se confirmaron los aislamientos como *Saccharomyces spp*, debido a su incapacidad para crecer en medios con lisina como única fuente de nitrógeno. En cuanto a las características tecnológicas fue posible encontrar individuos con adecuado poder de fermentación, producción de mínimas cantidades de espuma, con presencia de factor killer y con elevadas resistencias al etanol y dióxido de azufre.

Si bien no fue posible encontrar una cepa que responda a todas las características adecuadas, existen levaduras dentro de la colección con ciertas particularidades para ser seleccionadas con el fin de poder utilizarla como cultivos iniciadores. Se halló una cepa que cumple con los requerimientos enológicos propuestos para elaborar vinos blancos y puede ser usada también para fermentaciones lentas o detenidas, otra cepa óptima para vinificaciones tintas y al igual que el aislado anterior puede intervenir cuando es necesario reanudar fermentaciones o aumentar la velocidad de las mismas, se hallaron además dos levaduras aptas para vinificaciones tintas, estos resultados invitan a profundizar los estudios en ensayos con mayores volúmenes de mosto.

V. CONCLUSIÓN

V. CONCLUSIÓN

El trabajo desarrollado durante esta tesis permitió lograr un estudio acabado en cuanto a las características tecnológicas y cualitativas de una muestra representativa de levaduras que conforman la colección de cepas de la Facultad de Ciencias Agrarias y que se comparte entre las Cátedras de Microbiología y Enología.

Los individuos aislados se lograron identificar, al menos a nivel de género. Las cepas estudiadas presentaron en su mayoría adecuadas características tecnológicas como la capacidad de sedimentar luego de fermentar, mínima producción de espuma y neutralidad de la toxina killer. Con respecto a las cualitativas, se observó una mayor diversidad en las respuestas, corroborando que este tipo de determinaciones son cepa – dependiente. La mayoría de las cepas fueron glucofílicas, mostraron actividad β – glucosidasa y diversidad en la formación de ácido a partir de la glucosa. Se corroboró la biodiversidad dada la variación en la respuesta de cada cepa.

De la muestra de cepas utilizadas en este trabajo, pocas fueron las que presentaron todas las características enológicas deseadas para llevar a cabo una fermentación vínica.

Cabe destacar que las cepas seleccionadas deberían ser sometidas a pruebas moleculares para confirmar los ensayos de identificación. También sería adecuado conocer su comportamiento en fermentaciones a mayor escala y evaluar las características tecnológicas y cualitativas durante este proceso y una vez finalizado el mismo. Para fines comerciales, además de lo citado anteriormente, es importante que se estudiaran en procesos de multiplicación masiva y desecación, ya que este proceso es un punto crítico para la selección de levaduras.

Finalmente, las levaduras seleccionadas a partir de una determinada zona de producción, podrían ser una buena solución para mantener las características propias de los vinos de una región vitivinícola, minimizando la pérdida de tipicidad de los vinos inoculados, aportando una característica económicamente competitiva y ayudando también en la conservación de la biodiversidad.

VI. BIBLIOGRAFÍA

VI. BIBLIOGRAFIA

- ABAD ARRANZ, Elena. 2006. Selección de levaduras autóctonas para la elaboración de vinos tintos para bodegas y viñedos de Trujillo S.L. Universidad Politécnica de Madrid. Escuela Superior de Ingenieros Agrónomos. Madrid, España 115 p.
- ARÉVALO VILLENA, M.; et al. 2006. β -Glucosidase activity in wine yeasts: Application in enology. *Food microbiology*. N° 40, p 420-425.
- BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. 1990. Yeast: characteristics and identification. 2nd edition. Cambridge. Cambridge University Press. 1002 p.
- BARRAJÓN SIMANCAS, Nuria; MARTIN DE VIDALES CALVO, R.; ALONSO INFANTE, S.; BRIONES PEREZ; A. I. 2007. Éxitos y fracasos en la inoculación de levaduras seco activas en bodegas de Castilla La Mancha. Cuadernos de estudios manchegos, Universidad de Castilla La Mancha. I.S.S.N.: 0526-2623. 17 p.
- BERTHELS, N. J.; CORDERO OTERO, R. R.; BAUER, F. F.; THEVELEIN, J. M.; PRETORIUS, I. S. 2004. Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *FEMS Yeast Research*. N°4, p. 683–689.
- CALDERON, Mónica; BLANCO, Lorena. Análisis multivariado aplicado al mercado mundial de vinos .2005. [en línea] UNCu, <http://www.aaep.org.ar/anales/works/works2005/calderon-blanco.pdf> [consulta: 15 de febrero de 2013]
- CAPECE, Angela; ROMANIELLO, Rossana; SIESTO, Gabriella; PIETRAFESA, Rocchina; MASSARI, Carmela; POETA, Cinzia; ROMANO, Patrizia. 2010. Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for Nero d'Avola wine and evaluation of selected starter implantation in pilot fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. N° 144, p. 187–192.
- CARIDI, Andrea; TINI, Vincenzo; 1991. Studio e selezione di lieviti per enologia. *Vignevini*. N° 12, p 62-66.
- CARRAU, Francisco M.; DELLACASSA, Eduardo; HENSCHKE, Paul A.; Et Al. 2001. Caracterización de *Saccharomyces cerevisiae* en relación a su habilidad para utilizar nitrógeno - un nuevo concepto biotecnológico en la industria del vino. En actas del *VIII Viticulture and Enology Latin American Congress*, Montevideo, Uruguay.
- CERDÁN, T.; et al. 2005. Fermentación con cepas de levaduras indígenas. *El vino y su industria*. Año 4, N°. 38, p 53-62.

- COCOLIN, Luca; PEPE, Vincenzo; COMITINI, Francesca; COMI, Giuseppe; CIANI, Mauricio. 2004. Enological and genetic traits of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from former and modern wineries. *FEMS Yeast Research*. N° 5, p. 237-245.
- COMBINA, M.; ELIA, A.; MERCADO L.; CATANIA, C.; GANGAC, A.; MARTINEZ, C. 2005. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *International Journal of Food Microbiology*. N° 99, p 237– 243.
- DI CARLO, B.; VAZQUEZ, F.; TORO, M.E.; FIGUEROA, L. 1999. Levaduras Killer en la Elaboración de Vinos Variedad Torrontés. Vinandino '99. IV Concurso Internacional de Vinos. VII Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología. pp127-129.
- DÍAZ PERALTA, EDUARDO; ERCOLI, E.; FORMENTO, J.; NAZRALA, J.; GALIOTTI, H.; SFREDDO, E. PALADINO, S. ; SÁNCHEZ, M.L.; MAZA, M. Y BENVENUTTI, M. 2002. Aislamiento, selección y multiplicación comercial de levaduras vínicas autóctonas de las regiones vitivinícolas de la provincia de Mendoza. 1° etapa: departamento Maipú. Proyecto de investigación evaluado, aprobado y subsidiado por SECYT-UNC. según consta en resolución 987/02-R(17/12/02).
- DÍAZ PERALTA, E.; FRIGERIO, H.; SFREDDO, E.; FLORES, E.; SÁNCHEZ, M.L.; PALADINO, S.; RIVEROS, R. Y GENOVART, J. Selección de levaduras autóctonas de Tupungato, Mendoza. Departamento de Ciencias Enológicas y Agroalimentarias. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo. Actas del XXIX Congreso Mundial de la Viña y el Vino. Organización Internacional del Vino. Sección 2.2 Enología. Logroño, España, 25 al 30 de junio de 2006.
- DUMONT, Ann; RAYNAL, Celine; RAGINEL, Françoise; ORTIZ-JULIEN, Anne; SUAREZ, Carlos; HERAS, Jose Maria. 2008. [en línea] http://www.enoreports.com/pdf/caracter_fructofilo.pdf
<http://www.lallemandwine.com/spip.php?article410&lang=es> [consulta: 12 de febrero de 2013]
- EPIFANIO FERNANDEZ, Sara Isabel, 2005. Influencia de la tecnología de vinificación en la microbiología y el desarrollo de la fermentación alcohólica. Tesis Doctoral. Universidad de La Rioja. 237 p [en línea] <http://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=350> [consulta 12 de febrero 2013]
- ESTEVE-ZARZOSO, B; GOSTINCAR, A.; BOBET, R.; URUBURU, F.; QUEROL, A. 2000. Selection and molecular characterization of wine yeasts isolated from the El Penedès area (Spain). *Food Microbiology*. N° 17, p 553-562.
- FLEET, Graham H.; HEARD, Gillian. 1988. Growth of Natural Yeast Flora during Fermentation of Inoculated Wines. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 50, N° 3, p 727-728.

- FLANZY, Claude. 2003 Enología: Fundamentos Científicos y tecnológicos. 1° Edición. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. España. 783 p.
- FLORES, Eduardo. 1999. Las levaduras vínicas de la denominación de origen Luján de Cuyo, técnicas de fermentaciones asociadas. Proyecto presentado a SECyT en 1999 (06/A116).
- FORMENTO, J. C.; LÚQUEZ, C.; SÁNCHEZ, L.; GALIOTTI, H.; SFREDDO, E; NAZRALA, F.; BERNARDI, M.; GENOVART, J.; RIVEROS, R.; FIGUEROA, C. 2011. Selección de Levaduras Enológicas Autóctonas de las Regiones Vitivinícolas de Mendoza. Nuevo Procedimiento de Búsqueda y Selección en las Yemas de Vid. *III Jornadas Nacionales de Biología y Biotecnología de Levaduras*, Mendoza, 30 junio-1 julio de 2011 / compilado por Mariana Combina. - a ed. - Buenos Aires : Ediciones INTA. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - INTA Mendoza., 2011. CD-ROM. ISBN 978-987-679-024-6. 1. Biotecnología. 2. Vid. I. Combina, Mariana, comp. CDD 630
- FORMENTO, JUAN CARLOS; ERCOLI, E.; DIAZ PERALTA, E.; NAZRALA, J.; GALIOTTI, H.; SFREDDO, E. PALADINO, S. ; SÁNCHEZ, M.L.; MAZA, M. Y BENVENUTTI, M. 2009. Aislamiento, selección y multiplicación comercial de levaduras vínicas autóctonas de las regiones vitivinícolas de la provincia de Mendoza. 3° etapa: departamento Rivadavia. Subsidio: Evaluado, aprobado y subsidiado por SECYT- UNC: 882/07-R 2007-2009
- FORMENTO, Juan Carlos; ERCOLI, E.; DIAZ-PERALTA, E. 2006. Aislamiento, selección y multiplicación comercial de levaduras vínicas autóctonas, de las regiones vitivinícolas de la provincia de Mendoza. 2ª Etapa: Departamento de Junín. Secretaría de Ciencia, Técnica y Posgrado. Resúmenes XX Jornadas de Investigación y II de Posgrado de la Universidad Nacional de Cuyo. Tomo I, p 62.
- FRIGERIO, H.; *et al.* (1999). Las levaduras de la Denominación de Origen Luján de Cuyo. Libro de Resúmenes de las XVIII Jornadas de Investigación de la UNCuyo
- HERNANDEZ, L.F.; ESPINOSA, J.C.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M.; BRIONES, A. 2003. β -Glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *International Journal of Food Microbiology*. N° 80, p 171– 176.
- HIDALGO P; FLORES , M . 1994. Occurrence of te killer carácter in yeasts associated with Spanish wine production. *Food, Microbiology*. N° 11, p 161-167.
- HIDALGO TOGORES, J. 2003. Tratado de enología. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. España. TOMO I-II 1417 p.

- InfoStat, SOFTWARE ESTADÍSTICO, versión libre.
<http://www.infostat.com.ar/?lang=es>
- INV, Instituto Nacional de Vitivinicultura. 2013.
http://www.inv.gov.ar/noticias.php?ind=1&id_nota=120 [consulta: 12 de febrero de 2013]
<http://www.inv.gov.ar/PDF/Legislacion/Ley25163.pdf> [consulta: 12 de febrero de 2013]
<http://www.inv.gov.ar/noticias/CD-Anuario2012/01-%20INFORME%20COSECHA%202012.pdf> [consulta: 12 de febrero de 2013]
http://www.inv.gov.ar/vitiv_arg.php [consulta: 12 de febrero de 2013]
<http://www.inv.gov.ar/PDF/Legislacion/Ley14878.PDF> [consulta: 12 de febrero de 2013]
- JIRANEK, V.; LANGRIDGE, P.; HESCHKE, 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*. Vol. 46, N° 2, p 269 – 273.
- KEATING, Jeffrey D.; ROBINSON, Jamie; BOTHAST, Rodney J.; SADDLER, John; MANSFIELD, Shawn D. 2004. Characterization of a unique ethanologenic yeast capable of fermenting galactose. *Enzyme and Microbial Technology*. N° 35, p 242–253.
- KENNETH C. FUGELSANG. 1997. Wine Microbiology. California State University at Fresno. Ed. CHAPMAN & HALL. 241 p.
- KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. 1998. The Yeasts, A Taxonomic Study. Elsevier Science B.V. 1055 p.
- LEMARESQUIER, H.; GAINVORS, C.; LEQUART, B.; CHARLEMAGNE, V.; RÉZIER, V.; BELARBI, A. 1995. Sélection de levures oenologiques à activité clarifiante. *Revue Française d’Oenologie*. N° 154, p 23-29.
- LLANOS, M. 2002. Clasificación de levaduras vínicas. *La semana vitivinícola*. N° 2916, p 2150-2154.
- LLANOS, M. 2003. Selección y producción de levaduras vínicas. *La semana vitivinícola*. N° 2959, p 1302-1308.
- LOPEZ, Christian A.; RODRIGUEZ, María E. y SANGORRÍN, Marcela P. 2004. Selección de cultivos de levaduras, iniciadores de vinificación, identificación y evaluación de la aptitud enológica de los aislamientos. *El vino y su industria*. Año 3, N° 24, p 34-47.
- LÚQUEZ BIBILONI Claudia V.; FORMENTO, Juan Carlos; DÍAZ PERALTA, Eduardo. 2007. Las yemas, principal reservorio de levaduras entre los órganos aéreos vegetativos y

reproductivos de la vid (*Vitis vinifera* var. Malbec). *Rev. FCA UNCuyo*. Tomo XXXIX. N° 1, p 83-91.

- MARTÍNEZ - RODRÍGUEZ, Adolfo; ALFONSO, V.; CARRASCOSA, J.; BARCENILLA, M.; POZO-BAYÓN, M. A.; POLO, M. C. 2001. Autolytic capacity and foam analysis as additional criteria for the selection of yeast strains for sparkling wine production. *Food Microbiology*. N°18, p 183-191.
- MAS, A.; TORIJA, M. J.; BELTRAN, G.; NOVO, M.; HIERRO, N.; POBLET, M.; ROZÉS, N.; GUILLAMÓN, J. M. 2006. Selección de levaduras. *Tecnología del vino*. N° 02, Marzo-Abril, p 39-44.
- MATHEY, Héctor. Selección de levaduras para la elaboración de vinos espumantes. Proyecto de investigación SECyT 1999. (06/A132)
- MATURANO Y. Paola; NALLY M.C; TORO M.; CASTELLANOS DE FIGUEROA L.; VAZQUEZ F. 2009. Estudio cualitativo de actividades enzimáticas y fenómeno killer en levaduras vínicas. *Revista Enología*. N°1, año VI, Enero-Febrero, p 1-11.
- MERCADO, L.; A, DALCERO, A.; MASUELLI, R.; COMBINA, M. 2007. Diversity of *Saccharomyces* strains on grapes and winery surfaces: Analysis of their contribution to fermentative flora of Malbec wine from Mendoza (Argentina) during two consecutive years. *Food Microbiology*. N° 24 p. 403–412.
- MORATA, A.; y otros. 2005. Primeros criterios de selección de levaduras para vinificación en tinto. *La semana vitivinícola*. N° 3057, p 806-809.
- NAUMOV, G. I. 1987. Genetic basis for classification and identification of the ascomycetous yeasts. *Stud Mycol* . N° 30 p. 469-475.
- NIKOLAOU, E.; SOUFLEROS, E. H.; BOULOUMPASI, E.; B, TZANETAKIS, N. 2004. Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains according to their oenological characteristics and vinification results. *Food microbiology*. N° 23, p 205-211.
- NTSyS 2.0. Software para el procesamiento de datos y obtención de dendogramas
- RAINIERI, S. ; PRETORIUS, I.S. 2000. Selection and improvement of wine yeasts. *Annals of Microbiology*. N° 50, 15-31.
- REGODON, J. A.; et Al. 1997. A simple and effective procedure for selection of wine yeast strains. *Food Microbiology*. Vol. 14, p 247-254.
- REGODON MATEOS, José Antonio. Obtención y caracterización de cepas autóctonas de levaduras para la elaboración estandarizada de vinos de calidad. Universidad de Extremadura.

Departamento de Biología y producción de vegetales. 364 p. [en línea]
<http://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=212> [consulta: 12 de febrero 2013]

- RIBERÉAU GAYON, P.; et al. 2003. Tratado de enología. Tomo 1 Microbiología del vino. Vinificaciones. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. España. 655 p.
- RIBERÉAU GAYON, P.; et al. 1998. Tratado de enología. Tomo 1 Microbiología del vino. Vinificaciones. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. España. 655 p.
- RODRIGUEZ, J.; REINA, D.; CISERO A.; WINKELMAN, D.; CINTA, W.; AVAGNINA.; CASASSA M.; BARTOLLINI M.; CALDERON A.; QUINA C.; JAIME E.; MENENGAZZO J. M.; AGUINAGA J. C.; TOMAS E.; CORDOBA G.; DEIRAS J. I.; OVIEDO C.; BUCOLO, E.; LUCERO M.; VINCI, D.; CORREA, J.; GIRAUD BILLAUD, S.; VILLON, G.; KOWOL, M.; MASULLO, E.; CANOVAS, J.; GOMEZ, C.; GIULIANI, P.; SESTO, A.; DI MARCO, A.; LOBARBO, N.; DE LA VEGA, F.; CHACON, C.; GARCIA, F.; GONZALEZ MENA, G.; BLANCO, I.; NAVARTA, M.; PAVEZCA, P.; RAMIRO, R.; SIMONE, R.; NIELLA, L.; LUCERO, A.. 2005. *Vino Vivo*. Mendoza: Ed. Rómulo Caba.
- SÁNCHEZ, M. L.; SFREDDO, E.; PALADINO, S.; MAZA, M.; FORMENTO, J.C.; FARRANDO, S.; BERNARDI, M.; VARGAS, E. 2010. Creación de un cepario de levaduras vínicas. *Revista Argentina de Microbiología*. Supl. 1. Vol. 42, pág. 195
- SANTAMARIA, Pilar, GARIJO, P.; TENORIO, C.; LÓPEZ, R.; GUTIÉRREZ, A. Presencia de levaduras autóctonas en bodegas que practican la inoculación reiterada con levaduras secas activas.
[en línea]
http://www.oiv2007.hu/documents/viniculture/130_comunicaci_n_pilar_santamar_a.pdf
[consulta: 12 de febrero 2013]
- SUAREZ LEPE, J.A. 1997 LEVADURAS VINICAS, Funcionalidad y uso en bodega. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. España. 269 p.
- SUAREZ LEPE, J.A; ÍÑIGO LEAL, B. 2004. Microbiología Enológica, Fundamentos de Vinificación 3º Edición. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. España. 716 p.
- SWIEGERS J. H.; PRETORIUS I. S. 2007. Modulation of volatile sulfur compounds by wine yeast. *Applied Microbiol Biotechnol*. N° 74, p 954–960.
- TORIJA MARTÍNEZ, María Jesús. 2002. ECOLOGÍA DE LEVADURAS: SELECCIÓN Y ADAPTACIÓN A FERMENTACIONES VÍNICAS. UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOTECNOLOGIA FACULTAT D'ENOLOGIA. 206p. [en línea]

<http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/8643/Tesismjt.pdf?sequence=1> [consulta el día 12 de febrero 2013]

- TRIONE, D. 1989. Selección y elección de levaduras para los vinos tintos. III Seminario de actualización enológica.
- VALADE, M. 2004. Las levaduras seleccionadas, aliadas en el control de la calidad del vino. *La semana vitivinícola*. N° 3082, p 3038-3040.
- VALERO, E.; SCHULLER, D.; CAMBON, B.; CASAL, M.; DEQUIN, S. 2004. Dissemination and survival of commercial wine yeast in the vineyard: A large-scale, three-years study. *FEMS Yeast Research*. N° 5, p 959–969.
- VAUGHAN-MARTINI, A. and MARTINI, A. 1987. Three newly delimited species of *Saccharomyces sensu stricto*. *Antonie van Leeuwenhoek* N° 52, p. 77–84.
- VAZQUEZ, F. y otros. 2004. Selección de cepas de levaduras autóctonas para vinificación. *El vino y su industria*. Año 3, N°. 17, p 32-39.
- VINCENZINI, M; ROMANO, P; FARRIS, G.A. 2005. Microbiología del vino. 2005. Primera edición. Ed. Casa Editrice Ambrosiana. Milano. Italia. 494 p.
- ZUZUARREGUI MIRÓ, Aurora. 2005. Caracterización fisiológica y molecular de cepas vínicas de *Saccharomyces* sp. Influencia en su comportamiento durante la vinificación. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. UNIVERSITAT DE VALENCIA Servei de Publicacions, 202 p. [en línea] <http://www.tdx.cat/handle/10803/9527> [consulta 12 de febrero de 2013]
- WINESUR. 2013. <http://www.winesur.com/es/noticias/crece-el-precio-promedio-de-las-exportaciones-de-vino-fraccionado> [consulta: 30 de noviembre de 2011]

ANEXO

ANEXO**I. Cinéticas fermentativas**