





UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS INDUSTRIALES

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y DEL MEDIO AMBIENTE

**EVALUACIÓN ENOLÓGICA DE CO-INOCULACIÓN DE LEVADURAS  
SACCHAROMYCES Y NO-SACCHAROMYCES EN VINOS CHILENOS**

PROYECTO FIN DE CARRERA

INGENIERÍA QUÍMICA



Autor: MARÍA DE LA CRUZ SANTOS NAVARRETE

Nº Matrícula: 08758

Directores del proyecto:  
Dra. ASCENSIÓN FERNANDEZ  
Dr. JAIME ROMERO

Fecha: Septiembre 2016



La Dra. Ascensión Fernández Titular de Universidad, del Departamento de Ingeniería Química y del Medio Ambiente de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales de la Universidad Politécnica de Madrid, y el Dr. Jaime Romero, director del Laboratorio de Biotecnología de Alimentos del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, INTA, de la Universidad de Chile.

CERTIFICA:

Que la Memoria del Proyecto de Fin de Carrera “**EVALUACIÓN ENOLÓGICA DE CO-INOCULACIÓN DE LEVADURAS SACCHAROMYCES Y NO-SACCHAROMYCES EN VINOS CHILENOS**” ha sido realizada bajo su dirección por María de la Cruz Santos Navarrete, como requisito para optar a la Titulación de Ingeniero Químico.

Y para que conste a los efectos oportunos, expiden el presente certificado a uno de septiembre de dos mil dieciséis.

Ascensión Fernández

Jaime Romero



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero mostrar mi agradecimiento a mis directores del proyecto, a Ascensión Fernández y a Jaime Romero, por todo el tiempo dedicado a enseñarme y a aconsejarme durante la realización de este proyecto. También me gustaría agradecer la ayuda de Carolina Ilabaca por su paciencia durante el trabajo en el laboratorio. Tanto a Carolina como a Jaime agradecer la acogida que he recibido en el INTA siendo extranjera.

Por otro lado, quiero dar las gracias a mis amigas y compañeras de clase, Alba , María y Bea, sin las cuáles no habría pasado tantos buenos momentos tanto en la ETSII como fuera de ella, y sin las que no podría haber vivido la mejor experiencia de mi vida en Chile.

Por último gracias a mi familia, a la que he de agradecer no haber tirado la toalla en todos estos años, que han sido muchos, y sin los que no habría podido finalizar mis estudios en Chile. A mi hermana por ser mi compañera tanto en casa como en la Universidad y sin la que madrugar para llegar la primera al parking no habría sido lo mismo.



## RESUMEN EJECUTIVO

Tradicionalmente la fermentación alcohólica del mosto se producía de forma espontánea, a partir de levaduras nativas presentes en las propias uvas. De esta fermentación tradicional espontánea se consiguen obtener vinos poco reproducibles, con un elevado riesgo de presentar alteraciones microbiológicas y químicas y con unos tiempos de fermentación más largos.

Para conseguir asegurar un buen término de la fermentación, haciendo uso de la microbiología, se comenzaron a utilizar inóculos de fermentación, utilizando levaduras seleccionadas por su buena capacidad fermentativa consiguiendo no solo asegurar el término de la fermentación, sino que además confiriendo al vino unas características deseadas. Posteriormente aparecieron las levaduras secas activas (LSA) usadas como inóculos puros. Se observó que el uso continuado de una misma cepa comercial en bodega daba lugar a la obtención de vinos muy reproducibles, todos ellos con una cierta similitud organoléptica, no pudiendo obtener un producto claramente diferenciable.

En la actualidad el sector del vino se encuentra en una situación cada vez más competitiva y globalizada, es por ello que los productores de vino se enfrentan a una necesidad de mejorar las características organolépticas de sus vinos para satisfacer las necesidades del mercado. Por su parte los enólogos se enfrentan al reto de mejorar el proceso fermentativo y obtener una mayor complejidad aromática, lo que se traduce en una demanda de nuevas y mejores cepas de levadura capaces de adaptarse a diferentes tipos y estilos de vino. Esta demanda se puede solventar mediante la selección de levaduras no-*Saccharomyces*, ya que presentan potencial para formar compuestos volátiles.

Durante el proceso de fermentación alcohólica las levaduras convierten los azúcares en etanol y dióxido de carbono, pero además producen metabolitos volátiles que, siendo minoritarios, determinan fundamentalmente las características aromáticas del vino. El perfil aromático del vino es el resultado de la combinación e interacción existente entre los distintos compuestos aromáticos, aunque su aroma genérico es atribuido mayoritariamente a alcoholes y ésteres, que le otorgan su calidad e intensidad aromática.

Las levaduras no- *Saccharomyces* son capaces de crear perfiles aromáticos más complejos en el vino mediante la generación de enzimas,  $\beta$ -glucosidasas, que permiten la liberación de moléculas de terpeno y tiol. Por ello estas levaduras con baja tolerancia a la presencia de etanol, son utilizadas en cultivos iniciadores mixtos o secuenciales junto con una levadura *Saccharomyces* para la obtención de vino.

Mediante el uso de los cultivos iniciadores mixtos o secuenciales se consigue obtener un vino con características específicas según la levadura no-*Saccharomyces* utilizada en la fermentación, por ello en busca de poder diferenciar un vino de otro se realiza el presente proyecto que se encuentra englobado en uno de mayor amplitud en el que se desea evaluar la

contribución de dos levaduras nativas chilenas no-*Saccharomyces* sobre el mejoramiento del perfil aromático del vino en microfermentaciones, tanto en vino tinto como en blanco.

El principal objetivo que se persigue en este proyecto es realizar la fermentación con una inoculación secuencial o co-inoculación, primero de una levadura nativa chilena no-*Saccharomyces* seguida de una levadura *Saccharomyces cerevisiae* sobre un mosto Sauvignon Blanc del valle de Limari en Chile. Las levaduras nativas escogidas para este estudio son:

- Levadura nativa 1: código PNLI29 desde Limari identificada como *Lachancea thermotolerans*
- Levadura nativa 2: código SB1MP3 desde Maipo identificada como *Hanseniospora uvarum*

Para asegurar una correcta fermentación se realiza un seguimiento del contenido en etanol mediante un kit enzimático específico y también un seguimiento de las poblaciones de levaduras por conteo en cámara de Neubauer al microscopio.

Para tener una referencia de una fermentación con la que poder comparar los datos que se van obteniendo se van a realizar dos controles de fermentación con levaduras comerciales ambos dos. El primer control será una fermentación con una co-inoculación de *Torulaspora delbrueckii*, levadura no-*Saccharomyces* comercial con una *Saccharomyces cerevisiae*. El segundo control será una fermentación únicamente utilizando como levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Una vez ha finalizado la fermentación, con el fin de garantizar que son las levaduras inoculadas las presentes en las distintas fases de la fermentación, y por tanto que han sido capaces de fermentar el mosto, se va a proceder a realizar los siguientes tratamientos a las muestras que se van recogiendo durante todo el periodo de producción de vino:

Extracción de ADN mediante el *Power Soil DNA Isolation kit* (MO-BIO Laboratories, Inc.), que consiste en una extracción mecánica seguida de una química. La mecánica es llevada a cabo por medio de unas piedrecitas (silicatos o vidrio) que son las encargadas de romper las membranas y paredes, para posteriormente agregar reactivos que permitan la precipitación de paredes y membranas para poder aislar el ADN, extracción química.

Posteriormente se realiza una amplificación del ADN extraído mediante la reacción en cadena de la polimerasa, PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Es un procedimiento que permite amplificar una secuencia de ADN deseada. La amplificación por PCR posibilita la detección específica de secuencias de ADN, haciendo posible la identificación de microorganismos contaminantes. La amplificación se alcanza mediante un proceso cíclico, de entre 25 y 40 ciclos.

La última de las técnicas moleculares utilizadas para la identificación de microorganismos es la determinación del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP). Consiste en la diferenciación de los microorganismos mediante el análisis de los patrones de ruptura generados en un lugar

específico del genoma del organismo, cuando es cortado mediante las endonucleasas o enzimas de restricción. Los fragmentos polimórficos que aparecen son debidos a que los organismos de diferentes especies, e incluso de distintas cepas, difieren en la distancia de los sitios de clivaje para cada enzima de restricción (Ratón, 2004).

Los resultados obtenidos tanto para la PCR como para el RFLP son comparados en geles de poliacrilamida por medio de electroforesis, método analítico con el que se logran separar biomoléculas según su tamaño y carga eléctrica a través de una matriz gelatinosa, todo bajo la acción de un campo eléctrico.

Se van a realizar 4 tratamientos, levadura nativa 1, levadura nativa 2 y los dos controles. Cada uno de los tratamientos se ha replicado 3 veces, con lo que se van a tener un total de 12 microfermentaciones en tubos Falcon de 50 ml de capacidad.

Partiendo de las condiciones de contenido en azúcares, acidez total y sulfuroso libre y total iniciales del mosto se procede a la primera inoculación de levaduras en los tubos que contienen 50 ml de mosto, y que van a llevar a cabo la primera parte de la fermentación. A las 48 horas de haber iniciado la fermentación se co-inoculan los 9 tubos que contienen levaduras no-*Saccharomyces* con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* comercial, para llevar a término la fermentación, ya que es capaz de aguantar niveles superiores de etanol que las no-*Saccharomyces*.

Una vez finaliza la fermentación se procede a analizar las muestras que se han ido recogiendo correspondientes a los días 1, 3, 6 y 8 de fermentación. Mediante el seguimiento realizado del contenido en etanol y de la población de levaduras se ha comprobado que la fermentación realizada por las levaduras nativas ha sido correcta y con unos valores similares a los obtenidos en los controles de fermentación.

Para poder asegurar que no ha habido una contaminación con algún otro microorganismo y que han sido las levaduras inoculadas las que han llevado a cabo la fermentación se lleva a cabo la extracción de ADN, la amplificación de las regiones espaciadoras transcritas internas (5.8S-ITS) y la determinación del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción, es decir, la digestión de las amplificaciones del ADN extraído. Mediante el revelado de geles de poliacrilamida en los que se han insertado las muestras junto con positivos que corresponden al ADN extraído de las levaduras utilizadas, con las que se van a comparar las amplificaciones y digestiones obtenidas, observando que efectivamente las levaduras escogidas para realizar el estudio han sido las que han fermentado el mosto.

Una vez confirmado que las levaduras nativas escogidas son aptas para realizar un proceso de fermentación de un mosto de uva blanca, resta realizar un análisis del perfil aromático del vino obtenido con las microfermentaciones, estudio que será realizado por un enólogo experto, y por otro lado se ha de realizar el mismo estudio con un mosto de uva tinta, para observar si las levaduras nativas se comportan de manera similar.



## Índice de Contenidos

<b>Capítulo 1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>15</b>
1.1 FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.....	21
1.1.1 Proceso Bioquímico de la Fermentación Alcohólica.....	22
1.2 LEVADURAS <i>SACCHAROMYCES</i> .....	24
1.2.1 Morfología y organización celular de las levaduras.....	25
1.2.2 Características genéticas de las levaduras de la vinificación.....	26
1.2.3 El mosto.....	27
1.2.4 Parámetros físicos de la fermentación alcohólica.....	31
1.2.5 Crecimiento de las levaduras y cinética de la fermentación.....	33
1.2.6 Posibles mejoras en la actividad de las levaduras durante la fermentación.....	36
1.3 LEVADURAS NO- <i>SACCHAROMYCES</i> .....	37
1.3.1 Aislamiento, identificación y enumeración.....	38
1.3.2 Levaduras no-Saccharomyces en la fermentación alcohólica de vinos.....	39
1.3.3 Alteraciones del vino.....	45
1.4 CULTIVOS INICIADORES MIXTOS Y SECUENCIALES.....	46
<b>Capítulo 2. OBJETIVOS.....</b>	<b>49</b>
<b>Capítulo 3. MÉTODOS Y MATERIALES.....</b>	<b>53</b>
3.1 MATERIALES.....	55
3.2 PREPARACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS, METODOLOGÍA.....	56
3.3 MÉTODOS DE SEGUIMIENTO DE LA FERMENTACIÓN.....	58
3.3.1 Medición de etanol.....	58
3.3.2 Recuento de levaduras al microscopio.....	60
3.4 MEDICIONES A REALIZAR.....	62
3.4.1 Determinación de la acidez total.....	62
3.4.2 Medida de acidez volátil.....	64
3.4.3 Determinación del sulfuroso libre.....	65
3.4.4 Determinación del sulfuroso total.....	66
3.5 CARACTERIZACIÓN DE LEVADURAS.....	67
3.5.1 Extracción de ADN.....	67
3.5.2 Reacción en cadena de la polimerasa, PCR.....	70
3.5.3 Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción, RFLP.....	73

3.5.4	Electroforesis.....	75
<b>Capítulo 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>		<b>79</b>
4.1	CONDICIONES INICIALES DEL MOSTO.....	81
4.2	SEGUIMIENTO DE ETANOL.....	82
4.3	SEGUIMIENTO DE LA POBLACIÓN DE LEVADURAS.....	86
4.4	CONDICIONES AL FINAL DE LA FERMENTACIÓN.....	89
4.4.1	Acidez total al final de la fermentación.....	89
4.4.2	Sulfuroso libre y total al final de la fermentación.....	90
4.5	ESTUDIO DE LAS MUESTRAS.....	91
<b>Capítulo 5. CONCLUSIONES.....</b>		<b>101</b>
<b>Capítulo 6. LINEAS FUTURAS.....</b>		<b>105</b>
<b>Capítulo 7. IMPACTO SOCIAL Y MEDIOAMBIENTAL.....</b>		<b>109</b>
<b>Capítulo 8. PLANIFICACIÓN TEMPORAL Y PRESUPUESTO.....</b>		<b>115</b>
8.1	PLANIFICACIÓN TEMPORAL.....	117
8.2	PRESUPUESTO.....	119
8.2.1	Costes de personal.....	120
8.2.2	Costes de material.....	120
8.2.3	Costes de equipos.....	121
8.2.4	Costes indirectos.....	121
8.2.5	Costes totales proyecto.....	122
<b>Capítulo 9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>		<b>123</b>
<b>Capítulo 10. ABREVIATURAS/ NOTACIÓN.....</b>		<b>133</b>
<b>Capítulo 11. ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>		<b>137</b>
<b>Capítulo 12. ÍNDICE DE TABLAS.....</b>		<b>141</b>

# Capítulo 1.

# INTRODUCCIÓN



*“El vino es exclusivamente la bebida que resulta de la fermentación alcohólica completa o parcial de la uva fresca, estrujada o no, o del mosto de uva. Su grado alcohólico adquirido no puede ser inferior a 8,5 p. 100 vol.*

*Sin embargo, teniendo en cuenta las condiciones climáticas, de terreno o de variedad, de factores cualitativos especiales o de tradiciones propias de ciertos viñedos, el grado alcohólico total mínimo podrá establecerse en 7 p. 100 vol. por medio de una legislación particular de la región considerada.”* (Normativa de etiquetado de vinos, Organización Internacional de la Viña y el Vino 2015)

La actividad vitivinícola en Chile comienza gracias a la llegada de los conquistadores españoles, quienes introdujeron la vid para producir el vino de misa, y que en el siglo XVI comenzaron a plantar viñedos. No fue hasta la década de los 80 en la que el país realmente comenzó a posicionarse como uno de los mayores productores mundiales de vino. A día de hoy Chile es uno de los mayores productores tanto de uva como de vino del mundo, según la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV).

Chile es una de las pocas regiones del mundo que tiene vides no injertadas anteriores a la filoxera (64.530 ha), ya que las barreras naturales y las condiciones climáticas han impedido el desarrollo de esta enfermedad. Por su situación geográfica, es un territorio largo y delgado que yace entre la imponente cordillera de los Andes y el azul océano Pacífico, comprende climas y tierras tanto de secano como húmedas y de riego, lo que ha dado un abanico de vinos muy marcado por la influencia de las variedades.

La gran mayoría de viñas y viñedos chilenos se encuentran ubicados en los 483 kilómetros del valle central que se sitúan entre la cordillera de los Andes y la cordillera de la costa, en el centro del país. Esta región está dividida en una serie de valles, cada uno de ellos con características únicas y, especializándose en las variedades de cepa de uva más adecuada para cada región y para el clima en el que se encuentran.



Figura 1. División geográfica de los valles de cultivo de uva en Chile.<sup>1</sup>

El Valle de Elqui, conforma la frontera norte de las regiones vinícolas de Chile. Las condiciones climáticas que se dan para el cultivo de uvas son excelentes: Un valle bien ventilado y seco, ya que las precipitaciones anuales llegan solo a los 130 mm, con lo que se permite la cosecha de uvas maduras y dulces, a partir de las cuales se produce el pisco, bebida alcohólica nacional chilena. Las cepas que más se cultivan en esta zona son Cabernet Sauvignon, Merlot, Carménère y Chardonnay, además de algunas hectáreas dedicadas al Syrah.

<sup>1</sup> Fuente: La cubiella septiembre 25, 2013. <http://www.lacubiella.com/articulo/entendiendo-a-chile-y-sus-regiones>.

En 1990 se descubrió que el Valle del Limarí era un lugar apropiado para el cultivo de cepas nobles, debido a las condiciones climáticas y suelos, similares al Valle de Elqui. La mitad de su extensión está cubierta por el cultivo de Cabernet Sauvignon.

El Valle de Aconcagua ofrece condiciones climáticas ideales para el cultivo de cepas, con días calurosos y noches frescas y húmedas. La producción de vino en este valle comenzó en el año 1870, se cultivan diversas cepas como Cabernet Sauvignon, Merlot y Cabernet Franc. Pero a pesar de que la superficie cultivada llega al 10%, el Syrah es considerado el vino representativo del Valle de Aconcagua.

El Valle de Casablanca por su cercanía al mar atribuye una humedad permanente debido a la niebla matinal. Los suelos son por naturaleza muy arcillosos y ricos en minerales descompuestos, provenientes de la nieve derretida de los Andes. Las condiciones son ideales en esta zona especialmente para las uvas blancas de maduración lenta, es por ello que casi las tres cuartas partes de los cultivos fueron destinados a la cepa Chardonnay. Otras cepas características del Valle de Casablanca son el Sauvignon Blanc, el Pinot Noir y el Merlot. La cepa del Riesling, que en Chile se encuentra raramente, también crece en este valle.

En el Valle del Maipo, cercano a la capital, Santiago, tiene sus inicios la historia de la producción del vino en Chile. A día de hoy es la región vinícola más conocida de Chile. De aquí provienen los vinos de exportación más exitosos y es aquí donde se descubrió que en Chile existían ejemplares de la cepa Carménère, que se creía extinguida. El clima en el Valle del Maipo es estable, con veranos cálidos y secos e inviernos cortos y suaves, que por regla general, no sobrepasan los 450 mm de precipitaciones anuales, por ello maduran aquí de la mejor forma uvas para vino tinto, conocidas por su necesidad de sol. El 80 % de las hectáreas cultivables son dedicadas a cepas para vino tinto, Cabernet Sauvignon, Merlot, Carménère, Syrah, Cabernet Franc y Malbec, el otro 20% se destinan al cultivo de Chardonnay, Sauvignon Blanc y Semillón.

Y como estos existen otros muchos valles, Curicó, Maule, etc., conocidos internacionalmente por sus vinos de gran calidad.

Tradicionalmente la fermentación alcohólica del mosto se producía de forma espontánea, a partir de levaduras “salvajes”, o nativas, presentes en las uvas. Es por ello que las levaduras poseen un papel fundamental a la hora de elaborar vino, ya que son las responsables de la transformación de los azúcares que son fermentables en etanol y dióxido de carbono, principalmente. De la fermentación tradicional espontánea se consiguen obtener vinos poco reproducibles, con un elevado riesgo de presentar alteraciones microbiológicas y químicas (ej. picados acéticos, defectos aromáticos, ralentizaciones o paralizaciones de fermentación, etc.), y, en general, con unos tiempos de fermentación más largos.

Para conseguir asegurar un buen término de la fermentación, se desarrolló la idea, aplicando la microbiología, de utilizar inóculos de fermentación. Haciendo uso de levaduras

seleccionadas por su buena capacidad fermentativa se consigue no solo asegurar el término de la fermentación, sino que además se consigue conferir al vino unas características deseadas.

A finales del siglo XIX, el concepto de inóculo de especies puras se hizo popular primero en la industria cervecera, mediante el uso de cultivos líquidos de levaduras. En el sector del vino, no fue hasta la aparición de las levaduras secas activas (LSA), que se usaron inóculos puros. Es una tecnología que supone una gran ventaja sobre los cultivos líquidos anteriores, ya que permite su producción y almacenamiento durante todo el año, además de solo tener que hidratarlas con un poco de agua tibia para poder utilizarlas.

Gracias al fácil manejo de las levaduras secas activas, tuvo lugar una búsqueda de levaduras para todo tipo de fermentaciones (fermentación de mostos con altas concentraciones en azúcares, fermentaciones a bajas temperaturas, etc.).

La levadura mayoritariamente seleccionada actualmente corresponde a aislados del género *Saccharomyces*, más concretamente a la especie *Saccharomyces cerevisiae*, levadura que se considera como un microorganismo domesticado debido a que se encuentra abundantemente en ambientes industriales en los cuales se realizan fermentaciones alcohólicas. Es por ello que está presente especialmente en bodegas de vinificación, dando lugar a una microbiota residente en bodega.

Tras estudiarse con afán se ha observado que un uso continuado de la misma cepa comercial da lugar a una microbiota residente uniforme, debido a que las levaduras seleccionadas se han impuesto sobre otros microorganismos competidores. Esto ha dado lugar a una reducción notable de los microorganismos presentes en las bodegas como son *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula* y *Metschnikowia*.

Todo ello ha derivado en una cierta similitud organoléptica en los vinos obtenidos, ya que se han reducido las variables diferenciadoras que aportaban las levaduras. A pesar de ello no hay que olvidar que la inoculación de levaduras seleccionadas en mostos ha dado lugar a un gran avance en la enología debido a la necesidad de obtener un producto reproducible y sin defectos.

La diferencia principal entre una fermentación espontánea y una inoculada con levaduras secas activas está en que de las levaduras nativas o salvajes, denominadas levaduras no-*Saccharomyces* son capaces de corregir ciertos defectos analíticos del vino, pero sobre todo en que intensifican y mejoran las propiedades aromáticas del vino. Estos aportes sensoriales han sido limitados por la levadura *Saccharomyces* domesticada ya que consigue desplazar a las demás levaduras. En una fermentación natural también ocurre ese desplazamiento pero de una forma natural. Por otro lado hay que destacar que las levaduras no-*Saccharomyces* suponen un riesgo ya que pueden suponer un mal gusto u olor del vino. Es por ello que uno de los aspectos más interesantes a día de hoy en la microbiología enológica consiste en el estudio

y selección de levaduras no-*Saccharomyces*, debido a su contribución aromática y tecnológica en los vinos.

Las levaduras no-*Saccharomyces* de interés presentan actividades pectinolíticas que aumentan la extracción de compuestos y aumentan la fluidez del mosto. Otro de los aspectos interesantes de estas levaduras es que consiguen liberar aromas gracias a las enzimas  $\beta$ -glucosidasas. Esto ha llevado al uso comercial de algunas de las levaduras no-*Saccharomyces* como la *Torulaspota delbrueckii* y al estudio de algunas especies del género *Hanseniaspora* o *Metschnikowia*, *Candida*, etc. Estos estudios se llevan a cabo utilizando estas levaduras en combinación o secuencialmente (co-inoculación), con levaduras *Saccharomyces*, permitiendo que la levadura no-*Saccharomyces*, que posee una tolerancia al etanol muy baja, pueda expresarse antes de inocular la *Saccharomyces*, que llevará a término la fermentación ya que su tolerancia al etanol es más alta.

Estas co-inoculaciones se realizan inoculando primero la levadura no-*Saccharomyces*, y a las 24 o 48 horas, para no permitir que otras levaduras *Saccharomyces* presentes en las bodegas se impongan, se inocula la *Saccharomyces* seleccionada.

Por todo ello se está abriendo un campo de investigación de combinaciones entre levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*, para dotar a los vinos de unas características que los mejoren organolépticamente, siendo siempre primordial que estas características sean atractivas para el consumidor.

Otra de las alternativas de uso de las levaduras no-*Saccharomyces* consiste en recuperar combinaciones entre levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* que reflejen las combinaciones que se daban tradicionalmente en los viñedos pero haciendo posible un control del proceso de fermentación.

## 1.1 FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

La fermentación alcohólica es la transformación cuantitativa de la glucosa en principalmente, etanol y dióxido de carbono, CO<sub>2</sub>. Se da en levaduras, otros hongos y algunas bacterias. El proceso de fermentación alcohólica es llevado a cabo por las levaduras *Saccharomyces*, ya que son las que mayor concentración de etanol aguantan. Además del etanol y el dióxido de carbono durante la fermentación como productos se obtienen también glicerina, ácidos volátiles, alcoholes superiores, ésteres, etc.

Este proceso es la base de muchas aplicaciones en la industria alimentaria, como la producción de pan, cerveza, vino y otras bebidas fermentadas.

En sí misma, la fermentación alcohólica es un proceso biológico de fermentación en plena ausencia de aire, concretamente de oxígeno (O<sub>2</sub>), que está originado por la actividad de

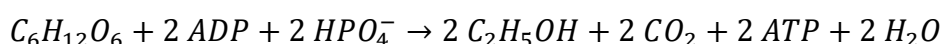
algunos microorganismos que procesan los hidratos de carbono, principalmente azúcares como la glucosa, la fructosa, la sacarosa, el almidón, etc., para obtener como productos finales un alcohol en forma de etanol ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ ), dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) en forma de gas y unas moléculas de ATP que consume el metabolismo celular energético anaeróbico de los propios microorganismos. El etanol que resulta del proceso se emplea en la elaboración de algunas bebidas alcohólicas, tales como el vino, la cerveza, la sidra, el cava, etc.

Durante el proceso de fermentación la concentración de etanol va aumentando hasta llegar aproximadamente a un 12-13% en volumen, momento en el cual las levaduras comienzan a morir al alcanzarse niveles tóxicos de etanol para su supervivencia, motivo por el cual las bebidas alcohólicas, no destiladas no alcanzan valores superiores al 20% en volumen de concentración de etanol.

### 1.1.1 Proceso Bioquímico de la Fermentación Alcohólica

La finalidad biológica de la fermentación alcohólica consiste en proporcionar energía anaeróbica a los microorganismos unicelulares (levaduras) en ausencia de oxígeno, para ello disocian las moléculas de glucosa y obtienen la energía necesaria para sobrevivir, produciendo el etanol y  $\text{CO}_2$  como productos de la fermentación. Las levaduras y bacterias causantes de este fenómeno son microorganismos que habitan en las frutas y cereales y contribuyen en gran medida al sabor de los productos fermentados finales.

Las fuentes de carbono, fundamentalmente las hexosas glucosa y fructosa, permiten a las células de levadura obtener la energía que necesitan mediante la fermentación alcohólica. Esta ruta metabólica tiene lugar en el citoplasma y puede expresarse mediante la siguiente ecuación global simplificada:



La fermentación alcohólica sigue la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas, descrita sobre 1940 por los investigadores que dan nombre a esta ruta y conocida también como glicolisis. Esta es una ruta que consta de diez reacciones, las cinco primeras constituyen la fase de inversión de energía, en la que los azúcares se activan metabólicamente por fosforilación que depende del ATP para dar lugar a un azúcar de seis carbonos, la fructosa-1,6-bifosfato, que sufre una ruptura para proporcionar dos moles de triosa fosfato. Durante la fase de generación de energía, que va de la reacción 6 a la 10, las triosas fosfato sufren una nueva activación que da lugar a dos compuestos con un alto potencial de transferencia de fosfato, primero el 1,3-bisfosfoglicerato y luego el fosfoenolpiruvato. Cada uno de estos compuestos transfiere su fosfato de alta energía al ADP, proporcionando de esta forma ATP, en un proceso que se conoce como fosforilación a nivel de sustrato. La energía química del ATP puede transformarse posteriormente en la célula en otras formas de energía necesarias para el crecimiento de la misma, como pueden ser la biosíntesis y transporte a través de membranas, mediante los denominados procesos de transducción de energía. La primera reacción de esta

fase de generación de energía es una reacción de oxidación, catalizada por el enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Este enzima requiere dinucleótido de nicotinamida-adenina ( $\text{NAD}^+$ ) como coenzima, para poder aceptar los electrones del sustrato que se está oxidando. Como consecuencia de ello el  $\text{NAD}^+$  se reducirá a  $\text{NADH}$ .

Tras la ruta glicolítica la fermentación alcohólica finaliza con dos reacciones adicionales. En la primera de ellas el piruvato resultante es descarboxilado a acetaldehído y dióxido de carbono, mediante el enzima piruvato descarboxilasa, que necesita la presencia como coenzima del pirofosfato de tiamina. Finalmente, el acetaldehído es reducido a etanol por el enzima alcohol deshidrogenasa, en una reacción que implica oxidación del  $\text{NADH}$  a  $\text{NAD}^+$ , nuevamente, lo que permite recuperar el potencial de oxidación consumido en la etapa anterior. Los procesos de anabolismo y catabolismo están mediados por deshidrogenasas que utilizan predominantemente  $\text{NADP}^+$  y  $\text{NAD}^+$  como cofactores redox. La célula por otro lado mantiene en equilibrio la formación de  $\text{NADH}$  y su oxidación a  $\text{NAD}^+$  para el mantenimiento de la glicolisis.

Cabe destacar que la ruta glicolítica no es únicamente un proceso conducente a la obtención de energía para la levadura, sino que constituye además una ruta capaz de proporcionar a las levaduras metabolitos que pueden utilizar como puntos de partida para la biosíntesis de moléculas asociadas al aumento de biomasa.

Las moléculas de glucosa-6-fosfato pueden ser direccionadas hacia la ruta de los fosfatos de pentosa, la cual permite la formación de  $\text{NADPH}$  y de ribosa-fosfato, moléculas que son necesarias para la biosíntesis de ácidos grasos y de nucleótidos. El piruvato también da lugar a un punto de partida importante para la síntesis de diferentes moléculas, como oxalacetato, succinato, ácidos orgánicos o aminoácidos. La producción de estas moléculas tiene lugar al inicio de la producción de vino, cuando las actividades piruvato descarboxilasa y alcohol deshidrogenasa son bajas.

Finalmente, la dihidroxiacetona fosfato, uno de los productos finales de la fase de inversión de energía, se utiliza para generar glicerol. Esta molécula contribuye de una manera importante a aumentar la calidad del vino, interviene en la biosíntesis de triacilgliceroles y constituye además el principal osmolito compatible que las levaduras producen para hacer frente al estrés osmótico al que se ven afectadas al inicio de la producción de vino. La síntesis de glicerol también constituye un mecanismo para la oxidación de las moléculas de  $\text{NADH}$  generadas durante la glicolisis que no han podido ser reoxidadas por el desvío de 1,3-bifosfoglicerato o piruvato dando lugar a productos diferentes al etanol. Relacionado con el proceso de fermentación alcohólica hay que destacar la formación de alcoholes superiores, que pueden generarse a partir de algunos aminoácidos y son muy importantes en el aroma del vino como se comentará más adelante.

## 1.2 LEVADURAS SACCHAROMYCES

La fermentación que ocurre en el mosto es un proceso microbiológico complejo que implica interacciones entre levaduras, bacterias y hongos filamentosos, de los cuales las levaduras desempeñan el papel central. Las levaduras son hongos superiores unicelulares que se multiplican formando yemas. De acuerdo con su desarrollo sexual, con el modo en el que se forman las esporas, pueden clasificarse en Ascomicetos y Basidiomicetos. Las levaduras que se encuentran en la uva y en el vino pertenecen principalmente al grupo Ascomicetos. En estos organismos, se desarrolla el cigoto dentro de una estructura en forma de saco, el asca, mientras que el núcleo sufre dos divisiones meióticas, con frecuencia son seguidas de una o más divisiones mitóticas. Alrededor de cada núcleo hijo y del citoplasma circundante se forma una pared originando cuatro ascosporas dentro del asca. Después esta pared formada se rompe y se liberan las ascosporas allí encerradas, que son capaces de germinar y producir nuevas células vegetativas. Aunque se conocen miles de especies de levadura, las levaduras enológicas, de producción de vino, están representadas solamente por una quincena.

Tradicionalmente la producción de vino se ha llevado a cabo utilizando cepas de levadura que proceden de la superficie de la uva y del ambiente de las bodegas, levaduras que están en prensas, tanques, fermentadores, bombas, etc. Las levaduras son capaces de alcanzar las uvas por el efecto de diseminación del viento y de los insectos ya que están presentes en las viñas desde el inicio de la maduración del fruto. Las especies predominantes, desde un cincuenta hasta un setenta y cinco por ciento, en la superficie de las uvas corresponden a los géneros *Kloeckera* y *Hanseniaspora*, en una más baja proporción es posible encontrar otras especies de levaduras estrictamente oxidativas o débilmente fermentativas y poco tolerantes a la presencia de etanol, pertenecientes a *Metschnikowia*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Kluyveromyces* y *Hansenula*. Se encuentra también, pero en una muy pequeña proporción las especies fermentativas *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces bayanus*. Esta población microbiana o microbiota puede verse afectada por un gran número de factores tales como la temperatura, la pluviosidad, la altitud, grado de madurez de la cosecha y el uso de fungicidas. En cuanto a la flora que se puede encontrar en la superficie de la maquinaria de la bodega destaca mayoritariamente *Saccharomyces cerevisiae*.

Las levaduras que se encuentran en el mosto durante las primeras horas de llenado de los depósitos corresponden a los mismos géneros identificados en la uva, con un predominio de *Hanseniaspora* y *Kloeckera*. En estas condiciones de vinificación espontánea, las levaduras del género *Saccharomyces*, principalmente de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, comienzan a desarrollarse tras unas veinte de horas, coexistiendo con las levaduras de la uva, y al cabo de tres o cuatro días de fermentación predominan y son las responsables últimas de la fermentación alcohólica. Este cambio poblacional está relacionado fundamentalmente con el aumento que conlleva el proceso de fermentación de la presencia de etanol, así como las condiciones de anaerobiosis, el sulfitado durante la vendimia y el mosto, la cantidad de azúcar presente y la mayor tolerancia de estas levaduras a temperaturas más altas. La mayor o menor persistencia de las levaduras “salvajes” depende también de la temperatura a la que se lleve a cabo el proceso de fermentación, de la disponibilidad de nutrientes y de la calidad e identidad

de los organismos presentes inicialmente. La especie *Saccharomyces cerevisiae* está constituida por numerosas cepas que ofrecen propiedades tecnológicas variables como el grado de etanol que son capaces de aguantar, el contenido en SO<sub>2</sub>, la velocidad de la fermentación, su capacidad fermentativa en condiciones no óptimas, naturaleza y cantidad de productos secundarios producidos y características aromáticas que aportan al vino. Debe destacarse pues la importancia que tiene la utilización de técnicas genéticas en la identificación y caracterización de las diferentes especies y cepas de levadura que participan en los procesos fermentativos.

Todo lo anterior hace referencia a las técnicas tradicionales de producción de vino, actualmente la estrategia habitual para llevar a cabo la producción del vino implica la inoculación en el mosto de levaduras previamente seleccionadas en forma de levadura seca activa, práctica que comenzó a desarrollarse en los años setenta. Este método de inoculación permite una disminución en el tiempo de la fase de latencia, asegura una rápida y completa fermentación del mosto y conduce a un grado importante de reproducibilidad en el producto final cada año, principal reclamo del consumidor. Debido a que el crecimiento de la microbiota natural no es completamente suprimido durante los primeros días de la producción de vino, estas cepas pueden aportar efectos importantes en cuanto a algunas propiedades del vino. Ya que evidentemente la levadura utilizada como inóculo ha de ser cuidadosamente seleccionada, se han propuesto diferentes características o criterios que debe reunir la cepa utilizada. De esta forma, Degré, 1993, sugirió que estas levaduras deberían conducir a fermentaciones vigorosas con cortas fases de latencia y dejando cantidades muy bajas o nulas de azúcares residuales, para evitar una fermentación espontánea del producto una vez embotellado, tener características fermentativas que puedan ser reproducibles, ser tolerantes a altas presiones, etanol y temperaturas no óptimas, y producir glicerol y  $\beta$ -glicosidasa en cantidades adecuadas para conseguir aportar un buen aroma al vino. Otros factores que pueden destacarse de las levaduras a seleccionar pueden ser que posea capacidad de fermentar a temperaturas bajas, ser capaz de obtener una baja formación de espuma, poseer factor Killer (ser el microorganismo dominante), ser cepas floculantes o fácilmente separables del medio, presentar determinados niveles de ciertas actividades enzimáticas y mostrar resistencia a las condiciones adversas o de estrés osmótico en el crecimiento que tienen lugar durante la producción del vino. En los últimos años buscando una diferenciación en cuanto a la producción de vinos se ha extendido la utilización de levaduras autóctonas de cada región que cumplen este tipo de características para conseguir un vino que consiga mantener las características sensoriales de cada zona productora, consiguiendo así la diferenciación respecto a otros vinos deseada.

### **1.2.1 Morfología y organización celular de las levaduras**

Las células de las levaduras *Saccharomyces* se encuentran rodeadas por una pared celular rígida que les permite resistir los cambios de presión osmótica que pueden tener lugar en el medio extracelular. En el interior de la célula se encuentra el espacio periplásmico y la

membrana plasmática, que rodea el citoplasma, y presenta diversos mecanismos de transporte que determinan el papel de ser la principal barrera y control de permeabilidad. Las levaduras además contienen diversos orgánulos subcelulares característicos de las células eucariotas, un núcleo rodeado por membrana, retículo endoplasmático liso y rugoso, aparato de Golgi, mitocondrias y vacuola, entre otros.

Destaca la gran importancia de numerosos enzimas que se encuentran en el citoplasma, entre los que se están los responsables de la fermentación alcohólica, además es fundamental el papel metabólico de las mitocondrias, aunque debido a su naturaleza fermentativa, pueden existir cepas de *Saccharomyces* sin mitocondrias.

También resalta el papel de la vacuola, implicada en homeostasis, que experimenta una continua transformación morfológica y bioquímica a lo largo de todo el ciclo celular. Ubicados en ella existen enzimas que participan en procesos de degradación y salvamento de constituyentes celulares, y acumula metabolitos como aminoácidos básicos, como S-adenosilmetionina, polifosfatos, alantoína y alantoato, a concentraciones mucho mayores que las que se encuentran en el citoplasma.

### 1.2.2 Características genéticas de las levaduras de la vinificación

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que se usan en los laboratorios descienden de aislados naturales, y cuando se comparan con las levaduras utilizadas en bodega para la vinificación, se encuentran diferencias importantes desde el punto de vista genético. Por un lado las cepas que se utilizan en estudios de laboratorio contienen de forma artificial auxotrofías para algunos aminoácidos o bases nitrogenadas, mientras que por otro las cepas vínicas son protótrofas, no necesitan ningún requerimiento en forma de aminoácidos o nucleótidos para crecer, lo que plantea una importante diferencia en cuanto a las posibilidades de manipulación genética de estas levaduras.

Mientras que la mayoría de las cepas de *Saccharomyces* empleadas en el laboratorio son haploides o diploides y presentan longitudes cromosómicas bien definidas, las cepas de bodega son mayoritariamente diploides y poliploides, y además, muestran un alto nivel de polimorfismo en la longitud cromosomal, lo que determina una gran variabilidad tanto en la capacidad de esporulación como en la viabilidad de dichas esporas. Esta diferencia junto con la primera mencionada también condiciona las posibilidades de manipulación genética de las levaduras vínicas o de bodega.

Por último destacar que las levaduras vínicas son mayoritariamente homotálicas (HO), es decir, que después de un proceso de esporulación, las células que derivan pueden cambiar de sexo, conjugarse con otra célula de sexo opuesto, y formar, una célula con doble contenido de ADN. En contraposición, en las cepas heterotálicas (ho) las células permanecen en estado haploide hasta encontrar otra de sexo opuesto con la que conjugarse. Las cepas vínicas presentan capacidad de reorganizar sus cromosomas durante el crecimiento mitótico,

característica que no es posible observar en cepas de laboratorio haploides, esto hace que las levaduras vínicas no mantengan uniformidad genética.

Se ha de resaltar también la existencia en las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*, así como en el resto de eucariotas, de ADN (mtDNA) circular que se localiza en la matriz y codifica diversas proteínas esenciales para la función mitocondrial. Uno de los aspectos más interesantes del ADN mitocondrial de levadura es su alto grado de polimorfismo. Los distintos tamaños entre el ADN mitocondrial de diferentes cepas de *Saccharomyces* resultan de la presencia variable de algunos intrones y de variaciones de tamaño en las regiones intergénicas, variabilidad que ha sido utilizada para estudios taxonómicos.

### 1.2.3 El mosto

En el Estatuto de la Viña, del Vino y de los Alcoholes se denomina mosto al jugo obtenido de la uva fresca por medio del estrujado, escurrido o prensado, mientras no haya comenzado su fermentación. Se diferencian los siguientes tipos de mosto:

- Mosto natural: hace referencia al mosto fresco sin que haya sido objeto de tratamientos.
- Mosto conservado: es el mosto cuya fermentación alcohólica ha sido evitada por tratamientos autorizados en el Estatuto, excluida la adición de alcohol. Se suele denominar “apagado” al mosto conservado por prácticas enológicas.
- Mosto concentrado: es el producto que se obtiene mediante la deshidratación parcial de los mostos hasta que el grado de concentración impida su fermentación espontánea.

Los mostos de uva son líquidos espesos, algo viscosos y más densos que el agua y en los que se encuentran dispersas todas las sustancias siguientes:

#### Azúcares

La glucosa y la fructosa se encuentran casi en igual proporción en los mostos de uvas ya maduras. Antes de la maduración predomina la glucosa y en la uva ya madura la fructosa. La glucosa y la fructosa son fácilmente fermentadas por las levaduras, fermentan más rápido a la glucosa que a la fructosa, y por ello los vinos a los que se les para la fermentación son vinos dulces ricos en fructosa. Se calcula, conociendo la cantidad de azúcar del mosto, el grado alcohólico probable (GAP) del vino que se va a obtener después de la fermentación de dicho mosto, aplicando la siguiente fórmula:

$$GAP = \frac{\text{Azúcares}}{17}$$

Asumiendo que las levaduras, por término medio, necesitan 17 gramos de azúcar para producir un grado de alcohol. En ocasiones el cálculo se lleva a cabo restando a los azúcares

totales 1 gramos que corresponde a los azúcares que no son fermentables por la levadura, como las pentosas (xilosa, ramnosa, arabinosa, etc.).

### Ácidos y compuestos de carácter ácido

En los mostos existen ácidos orgánicos libres y combinados en forma de sales, algunas de ellas ácidas, también existen ácidos minerales, las sales ácidas de algunos de ellos y otras sustancias de carácter ácido. El conjunto de todas estas sustancias conforma la acidez de los mostos, siendo las principales:

- Ácido málico y sus sales ácidas. Muy abundantes en las uvas poco maduras y escasean en las que alcanzan una perfecta madurez en los climas cálidos. Son solubles en los mostos y en los vinos.
- Ácido tartárico. Compuesto más abundante en los mostos de uva, estando en una mayor proporción si el mosto proviene de uva verde que de una madura. Es muy soluble en agua y en líquidos alcohólicos.
- Sales ácidas del ácido tartárico (bitartratos). La sal más abundante en el mosto de uva es el bitartrato potásico, que es poco soluble en agua fría e insoluble en alcohol.
- Sales minerales de carácter ácido. Las más abundantes tanto en vinos como en mostos son los fosfatos, que en los mostos se encuentran casi exclusivamente de tal forma en que sólo un tercio de la acidez del ácido fosfórico está neutralizada por el calcio o potasio entre otros.
- Sustancias de carácter ácido. Destacando el anhídrido sulfuroso (SO<sub>2</sub>).

La acidez total junto con la acidez parcial, energía ácida o pH de los mostos son de mucha importancia ya que por un lado no solo favorecen una perfecta fermentación, ya que las levaduras toleran muy bien una elevada acidez y no haciéndolo microorganismos que pueden producir enfermedades en los vinos. También ayudan a conseguir vinos con un gusto más fresco, que desarrollan más bouquet en la crianza, avivan el tono y matiz del color de los vinos, los protegen de algunos enturbiamientos y quiebras de color. Por otro lado facilitan la clarificación natural y el encolado. En resumen, la acidez influye en el proceso de fermentación, siendo un proceso más puro a valores más bajos de pH, obteniéndose de esta forma mayores rendimientos en alcohol.

La acidez total que conviene que tengan los mostos debe oscilar entre 4,5 y 7 expresada en gramos de ácido tartárico por litro.

### Taninos

Lo conforman un grupo de sustancias que existen en muchas cortezas, maderas, hollejos de frutos, etc. En las uvas están presentes en los raspones, hollejos y pepitas. Entre las principales propiedades que poseen destacan que son compuestos sólidos, no nitrogenados, de sabor áspero y astringente, se disuelven bien en alcohol y en agua por lo tanto en mostos y vino también. En vinos y mostos se presentan en estado coloidal y sus micelas poseen cargas eléctricas negativas. Con las sales de hierro dan lugar a compuestos de color negro-azulado, que en los vinos producen la “quiebra azul”.

Los taninos resultan de la polimerización de muchas moléculas elementales con función fenólica. Teniendo en cuenta las moléculas elementales que les dan origen pueden ser: taninos hidrolizables o taninos condensados.

### Materias Colorantes

Estas materias contenidas en el mosto pertenecen a dos clases de compuestos, los flavonoles y los antocianos. Los flavonoles o antoxatinas son pigmentos amarillos existentes en el hollejo de las uvas tanto blancas como tintas. Son monoglucósidos del kampferol y de la quercitina. Por otro lado los antocianos o antocianinas, son pigmentos de color rojo de las uvas tintas. Al hidrolizarse originan un azúcar y una aglucona denominada antocianidina. El monoglucósido de malvidol es el constituyente principal de la materia colorante de las variedades de uva tinta de la vid vinífera Europea, mientras que el diglucósido de malvidol es típico de algunas vides americanas, hecho clave para la identificación de procedencia de un vino.

### Materias pécticas

Son sustancias no nitrogenadas que en los mostos se encuentran en estado coloidal. A los líquidos que las contienen les aportan cierta viscosidad y suavidad al paladar. Pueden ser destruidos por medio de enzimas pectolíticas, dando al mosto más fluidez y una mejor filtración. Las materias pécticas están constituidas por pectinas, gomas y mucílagos. Las pectinas están formadas por cadenas de ácido galacturónico esterificadas con alcohol metílico que, cuando llenan los espacios intercelulares, se denominan protopectinas y durante la maduración del fruto, son hidrolizadas por las protopectinasas formándose la pectina como producto de dicha hidrólisis. Las gomas están formadas por cadenas de moléculas de azúcar y son anhídridos de arabinosa y los mucílagos son anhídridos de glucosa.

### Sustancias nitrogenadas

Los mostos contienen una pequeña proporción de sustancias nitrogenadas, desde 0,3 hasta 1,5 g de N<sub>2</sub>/hl. Son necesarias para la alimentación de las levaduras, dado que el nitrógeno es el elemento plástico de su protoplasma celular, convirtiéndose en el elemento regulador de la fermentación. Su carencia o insuficiencia imposibilita la fermentación, ya que impide el crecimiento y multiplicación de las levaduras.

### Sales minerales

En el mosto existen siempre pequeñas cantidades de sulfatos, fosfatos y cloruros de potasio, calcio, magnesio y sodio, y también existen cantidades pequeñas de hierro y aún más pequeñas de otros metales como cobre, procedente de restos del sulfato de cobre con que se trató el mildiu de la vid, de tuberías y grifos de bronce, etc. Los sulfatos están en mayor proporción que los fosfatos y éstos que los cloruros, que son escasos a excepción de viñedos cercanos al mar. Entre los cationes existentes en el mosto, su concentración sigue el siguiente orden descendente: potasio, calcio, magnesio y sodio.

### Gases disueltos

El mosto al ser manipulado en contacto con el aire disuelve sus gases, oxígeno y nitrógeno. El oxígeno disuelto desaparece muy rápido ya que se combina, oxidando los taninos, materias colorantes, etc. Por el contrario, el nitrógeno permanece inactivo, disuelto, hasta que es eliminado por el carbónico producido durante la fermentación.

### Turbios

Los turbios, o también llamados fangos, están constituidos por residuos terrosos, fragmentos de raspones y hollejos, sustancias pépticas y mucilaginosas, proteínas precipitadas, etc. Para que la acción de los turbios en el mosto sea casi nula, se procede al desfangado, que consiste en parar la fermentación durante 24 horas para que los turbios se depositen en el fondo y posteriormente separarlos del mosto claro por medio de un trasiego, se consigue que la acción de los turbios sobre el mosto sea casi nula. Los mostos que son fermentados sin los turbios dan origen a vinos más limpios y finos de gusto.

### Enzimas

Son sustancias complejas producidas por las células de los microorganismos. Incluso en pequeñas cantidades son capaces de activar reacciones importantes como la fermentación alcohólica. Cada enzima posee una actividad específica y actúa sobre un grupo de sustancias para producir en ellas cambios determinados. En los mostos actúan las oxidasas o enzimas oxidantes, que oxidan, fijando el oxígeno del aire, compuestos como los taninos y la materia colorante.

Debido a la gran variedad de situaciones geográficas y climas, en ocasiones resulta que el estado de madurez de las uvas es insuficiente para obtener un vino bien constituido. Para remediarlo se puede, en ciertas condiciones y dentro de ciertos límites, hacer algunas adiciones al mosto encaminadas a atenuar los defectos de su composición. Los principales motivos que llevan a realizar correcciones en los mostos son: querer obtener un determinado tipo de vino al que están acostumbrados los consumidores, y llegar a conseguir un vino bien constituido. Partiendo de la base de que los procedimientos de corrección no permiten nunca compensar completamente las insuficiencias debidas a una madurez defectuosa, se pueden realizar correcciones de acidez, de azúcar, del color del mosto y de las sustancias nitrogenadas.

La acidez de un mosto puede corregirse bien por exceso o por defecto. La acidificación se lleva a cabo en regiones cálidas, para obtener vinos de color vivo, agradables al paladar y de buena conservación. Debido a temperaturas elevadas y los suelos salinos, se produce la salificación de gran parte del ácido tartárico y del ácido málico. La acidificación se puede llevar a cabo cuando la acidez total del mosto, expresada en gramos de ácido tartárico, sea inferior a 4g/l y el pH sea superior a 3,6. Una acidificación se puede realizar por medios indirectos como son la anticipación total o parcial de la vendimia, empleo de anhídrido sulfuroso, el enyesado y el fosfatado, o por medios directos como mezcla de uva de buena

acidez con las de acidez insuficiente, empleo de agraces o jugo de uvas verdes, adición de ácidos (tartárico, málico, cítrico, etc.).

El proceso de vinificación lleva implícito una pérdida de acidez debida a la fermentación alcohólica, precipitaciones de bitartrato potásico, fermentación maloláctica y fermentación maloalcohólica. Sin embargo en años de mala maduración o accidentes meteorológicos, que obligan a recoger la uva antes de tiempo, estas desacidificaciones pueden ser insuficientes y se procede entonces realizar un corrección de acidez por medio de la desacidificación. Existen diferentes métodos de desacidificación como mezclar el mosto con mostos de acidez deficiente, empleo de resinas aniónicas, desacidificación por vía química y fermentación maloalcohólica.

En cuanto a la corrección del azúcar del mosto, se puede realizar una mezcla de uvas o de mostos con otros más ricos en azúcar, o se puede adicionar mosto concentrado que se preparan a partir de mostos apagados. Otra opción es también hacer una concentración parcial del mosto eliminando cierta cantidad de agua del mosto. Y por último se puede llevar a cabo la edulcoración o chaptalización, adicionando sacarosa al mosto, antes o durante la fermentación, para aumentar así el grado alcohólico del vino. En ocasiones también debe corregirse el mosto por exceso de azúcar, bien por adición de vino elaborado con poca graduación alcohólica, o bien por mezcla de mostos o uvas deficientes en azúcar.

Para conseguir corregir el color, en vinos manchados y oxidados, se utilizan carbones enológicos (carbón animal purificado y vegetal activado). En vinos con poco color, se adiciona caramelo enológico en dosis crecientes según el color que se desee obtener, y para vinos tintos, en algunos países se utiliza la enocianina con el fin de aumentar la tonalidad y coloración, pero en España su uso está prohibido.

Las sustancias nitrogenadas presentes en los mostos suelen ser suficientes para tres fermentaciones sucesivas, pero si en algún caso es necesario aumentarlas se suele emplear carbonato de amonio en dosis de hasta 10 g/hl.

#### **1.2.4 Parámetros físicos de la fermentación alcohólica**

A continuación se citan los principales factores fisicoquímicos que condicionan el crecimiento de las levaduras *Saccharomyces* durante la fermentación alcohólica.

##### Temperatura

La temperatura es el factor físico más importante tanto desde el punto de vista del crecimiento de las levaduras como del avance de la fermentación. *Saccharomyces cerevisiae* presenta una temperatura óptima de crecimiento alrededor de los 30°C, aunque puede adaptarse a un amplio rango de temperaturas, con un máximo de 40°C, temperatura a partir de la cual se observa una disminución de viabilidad. Entre 10 y 32°C la velocidad de fermentación aumenta linealmente, hecho que no implica que las temperaturas elevadas sean las más

indicadas para llevar a cabo la fermentación del mosto. La toxicidad que presenta el etanol que se va acumulando durante la vinificación aumenta con la temperatura. Las elevadas temperaturas provocan la evaporación del etanol y la consiguiente pérdida de compuestos volátiles esenciales para las características organolépticas del vino, sobretodo del vino blanco. Por otro lado temperaturas excesivamente bajas tampoco son recomendables, ya que se corre el riesgo de parar la fermentación al someter a las levaduras a un ambiente demasiado frío debido al efecto que tiene la temperatura en la fluidez de la membrana. Por todo ello el control de la temperatura de fermentación es un parámetro esencial en la actual industria enológica.

Generalmente la fermentación de los vinos blancos se realiza entre los 10 y los 15°C, mientras que la temperatura para la elaboración de los vinos tintos se sitúa en valores más elevados, entre los 20 y los 30°C, esto es debido a que una mayor temperatura en los tintos favorece la extracción de las sustancias fenólicas típicas de los mismos. En ambos casos se recomienda una temperatura inicial de fermentación sobre los 20°C con el fin de estimular el arranque del crecimiento de las levaduras.

La fermentación alcohólica es un proceso exotérmico, de manera que la temperatura tiene una tendencia a elevarse, afectada por valores como la concentración del azúcar del mosto, la temperatura inicial del mismo, la velocidad de fermentación, la temperatura y aireación de la bodega, y el diámetro y material del tanque de fermentación. Este calor generado se pierde espontáneamente por difusión al medio exterior, por la evaporación del etanol y el agua, y por la liberación del dióxido de carbono, pero además se requieren sistemas adicionales de control de la temperatura para mantener una fermentación isotérmica.

### Aireación

*Saccharomyces cerevisiae* es un fermentador facultativo, capaz de consumir azúcar en ausencia de oxígeno mejor que otras levaduras no-*Saccharomyces*. Un exceso en la concentración de oxígeno puede inhibir la fermentación, lo que se conoce como efecto Pasteur, pero cierta cantidad de aire es beneficiosa para el crecimiento de las levaduras vínicas, por la necesidad de oxígeno para sintetizar esteroides, ergosterol principalmente, y ácidos grasos insaturados. Se ha de tener en cuenta que una aireación excesiva puede llevar a una producción indeseable de acetaldehído y sulfuro de hidrógeno, y a una menor producción de ésteres aromáticos.

### pH

El pH normal del mosto de uva ronda entre 2,75 y 4,2. Valores inferiores a 2,8 pueden suponer dificultades para el crecimiento de *Saccharomyces*. Los efectos nocivos que presenta un pH bajo se deben a que incrementan el efecto tóxico del etanol y del sulfito. La tolerancia a pH ácido es dependiente de la abundancia de iones potasio en el mosto. Los valores bajos de pH lo que hacen es favorecer la hidrólisis de disacáridos y, por tanto, la fermentación. En ocasiones se añaden ácidos como el tartárico ya que éste carácter ácido del mosto previene la aparición de microorganismos alterantes, teniendo siempre en cuenta que un exceso de tartárico añadido puede producir precipitaciones indeseadas.

### Clarificación

La clarificación consiste en la eliminación de partículas sólidas del mosto, y es un factor muy importante en la producción del vino blanco. La eliminación de los nutrientes, sobre todo de los nitrogenados, que van asociados a esas partículas puede dificultar el crecimiento de las levaduras. Por otro lado, las partículas sólidas actúan como núcleos de formación de burbujas de dióxido de carbono, favoreciendo la disipación de este gas, por lo que en niveles excesivos pueden inhibir el crecimiento de *Saccharomyces*. Cabe destacar también que por el contrario los mostos más clarificados dan mejores resultados finales desde el punto de vista organoléptico. Es por tanto necesario encontrar un equilibrio en la clarificación que dé lugar a un mejor vino sin afectar el curso de la fermentación.

### Dióxido de carbono

Uno de los productos de la fermentación alcohólica es el dióxido de carbono. Durante la fermentación se produce un volumen de dióxido de carbono equivalente a 56 veces el volumen del mosto fermentado. La liberación de este gas tiene dos fines, uno disipar parte del calor producido al ser una reacción exotérmica, y dos, para producir corrientes de convección dentro del mosto que permiten la difusión de nutrientes. Si se produce en exceso, afecta a la viabilidad de *Saccharomyces cerevisiae*, debido principalmente a la alteración de su membrana.

## **1.2.5 Crecimiento de las levaduras y cinética de la fermentación**

El crecimiento de las levaduras durante la fermentación vínica es distinto al que tiene lugar en otros procesos industriales, como puede ser la elaboración de cerveza, esto es debido a que la elevada concentración de azúcares produce niveles de etanol inhibidores del crecimiento. Dado que el mosto de uva es un medio fácilmente fermentable que contiene los nutrientes necesarios para permitir el crecimiento de las levaduras, el proceso de fermentación comienza rápidamente con inóculos de aproximadamente  $10^6$  células/ml. Tras un corto periodo de latencia, en el cual las levaduras se adaptan a su nuevo medio, rico en nutrientes, se inicia el ciclo de crecimiento típico de *Saccharomyces cerevisiae* en las fermentaciones vínicas, que consta de tres etapas:

#### IV. Fase de crecimiento limitado.

Tiene una duración de entre 2 y 5 días y produce un aumento de la población hasta  $10^7$ - $10^8$  células/ml. En esta fase la velocidad de crecimiento es máxima y constante, y suele consumirse entre un tercio y un medio de la cantidad inicial de azúcares.

#### V. Fase quasi-estacionaria.

Esta fase dura alrededor de 8 días, durante los cuales no se produce un aumento del número de células de la población, pero las células son metabólicamente activas y la velocidad de fermentación sigue manteniéndose en su valor máximo.

#### VI. Fase de muerte.

Fase que puede dilatarse hasta varias semanas, durante la cual el número de células viables decrece progresivamente hasta aproximadamente  $10^5$  células/ml. La pérdida de viabilidad va acompañada de una disminución de la velocidad de fermentación debida a la disminución del número de células viables y a una inhibición de la actividad metabólica de las células no proliferativas.

El seguimiento del crecimiento de las levaduras se suele realizar por recuento microscópico de las células en muestras diluidas del mosto de fermentación. También puede estimarse la cantidad de células mediante medida de la densidad óptica a 600-620 nm previa elaboración de curvas de calibrado para la cepa inoculada. Para ambos casos la estimación del número de células presentes en el mosto en fermentación no es capaz de diferenciar entre células vivas y muertas, distinción muy importante cuando se monitoriza el desarrollo de fermentaciones vínicas. Para conseguir diferenciar ambos tipos de células se puede recurrir a siembras en placas de medio nutritivo sólido, de manera que sólo las células viables serán capaces de desarrollar colonias (tipo de análisis muy lento) Existen sin embargo métodos más rápidos, aunque menos fiables, para la estimación del número de células viables que basados en el empleo de reactivos fluorescentes o en la determinación de ATP por bioluminiscencia.

Todos estos métodos de seguimiento del crecimiento de las levaduras son relativamente difíciles de implantar en una bodega, por ello en la práctica, se realiza el estudio de la cinética del proceso fermentativo mediante técnicas más sencillas como la disminución de la concentración de azúcares, el aumento del contenido en etanol o la liberación de dióxido de carbono. De entre todos, el método más fácil de adaptar a las condiciones de la bodega es la determinación de la densidad del mosto ya que la medida de la masa por unidad de volumen constituye una determinación aproximada del contenido en azúcares., y sabiendo que a lo largo de la fermentación disminuye la concentración de éstos y aumenta el contenido en etanol, lo que conduce a una disminución de la densidad, la densidad inicial del mosto y la final del vino dependerán del contenido en azúcares de partida que generará un porcentaje de etanol concreto.

#### **1.2.5.1 Metabolismo nitrogenado**

*Saccharomyces cerevisiae* es capaz de utilizar indistintamente como fuentes de nitrógeno aminoácidos, amonio, uracilo, derivados de prolina y urea. Entre todos los componentes nitrogenados que se pueden encontrar en el mosto, los aminoácidos pueden ser considerados

los más importantes en cuanto a la aportación de nitrógeno para la síntesis de proteínas estructurales y funcionales (que hacen aumentar la biomasa de las levaduras), además de ser fundamentales para la producción de enzimas y transportadores de metabolitos que intervienen en los cambios bioquímicos que tienen lugar a lo largo de la fermentación.

Las células de levadura captan la mayoría de fuentes nitrogenadas presentes en el mosto durante las primeras horas de la fermentación, mientras se consume aproximadamente el 10% del azúcar presente. Los compuestos nitrogenados son asimilados y degradados en un orden específico de preferencia, orden dependiente de factores como son la necesidad de cada compuesto para procesos biosintéticos, su eficiencia de transporte y la posibilidad de su conversión en amonio o glutamato sin liberar compuestos que sean tóxicos para la célula.

Durante el crecimiento de las levaduras más de la mitad de las reservas de aminoácidos intracelulares se localizan en las vacuolas, lo que contribuye a la regulación de la actividad de diversas enzimas que intervienen en su degradación. El amonio y el glutamato son los compuestos centrales de todo el metabolismo nitrogenado que presentan las levaduras. El metabolismo de los compuestos nitrogenados contribuye también a la formación de productos de gran importancia en la calidad final del vino, ya que afectan a sus propiedades sensoriales.

### ***1.2.5.2 Importancia del metabolismo de las levaduras sobre el aroma del vino***

El aroma que percibido en el vino es resultado de una serie de compuestos apreciados por el olfato y el gusto, la mayoría de los cuales son volátiles. Algunos son metabolitos acumulados en la uva y son los responsables del denominado aroma varietal, pero la mayoría resultan del proceso de fermentación y sus niveles dependen básicamente de las levaduras que predominan durante la fermentación y de las condiciones en las que ésta se lleva a cabo.

Los principales grupos de compuestos que derivan del metabolismo de los carbohidratos y que contribuyen al aroma del vino son los ácidos orgánicos, los alcoholes superiores, los ésteres y los aldehídos, éstos últimos en menor proporción. También contribuyen sustancias derivadas de ácidos grasos, y de compuestos que contienen nitrógeno o azufre, entre otros, al aroma del vino. Algunos de los compuestos resultantes del metabolismo son negativos para la calidad del vino, como es el caso del acetaldehído, el ácido acético, el acetato de etilo, algunos alcoholes superiores en niveles elevados y sobre todo compuestos de azufre reducidos, sulfuros orgánicos y tioles. En fermentaciones con inoculación de cepa seleccionada se asume que el carácter del vino puede ser influenciado significativamente por la cepa inoculada, ya que ésta generaría un porcentaje elevado de estos compuestos.

A continuación se describe el origen de los principales compuestos volátiles generados durante el metabolismo de las levaduras. El primer grupo de compuestos lo forman los ácidos grasos volátiles, Entre los que se encuentran el ácido acético, los ácidos grasos de cadena

larga y los ácidos grasos de cadena corta. Para ácido acético los niveles están muy controlados y no deben superar los 1,0-1,5 g/l.

Otro grupo de compuestos son los alcoholes superiores, alcoholes con más de dos átomos de carbono cuyo peso molecular y punto de ebullición son superiores a los que presenta el etanol, y son los compuestos que cuantitativamente más influyen en el aroma del vino. En concentraciones inferiores a 300 mg/l contribuirían a la deseada complejidad del vino, mientras que niveles superiores a 400 mg/l tendrían un efecto negativo en la calidad del mismo. Los alcoholes superiores más producidos por las levaduras durante la fermentación alcohólica son: 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, hexanol y 2-feniletanol.

Los ésteres constituyen uno de los grupos más importantes y más numerosos dentro de los compuestos que afectan al aroma, y son responsables del carácter afrutado y floral de diversos vinos. Los que más aportan al aroma son los ésteres de acetato de alcoholes superiores (como el acetato de etilo) y los ésteres etílicos de ácidos grasos saturados de cadena media. El principal éster es el acetato de etilo, del que no se aceptan niveles superiores a 170 mg/l en vinos blancos y 160 mg/l en tintos. Todos estos compuestos mencionados derivan fundamentalmente del metabolismo de azúcares.

También son importantes los aldehídos volátiles de cadena corta, que contribuyen sobre todo a aromas tipo piña o limón. Los principales son: el acetaldehído, cuyo límite en vino está establecido en 100 mg/l, y el diacetilo, para el que no se admiten concentraciones superiores a 1-4 mg/l. Son generados a partir de dos cetoácidos procedentes a su vez de síntesis o degradación de aminoácidos o alcoholes superiores.

Los fenoles volátiles son importantes ya que afectan al gusto, color y olor de los vinos. Destacan los vinilfenoles en vinos blancos y los etilfenoles en vinos tintos.

Finalmente, los compuestos de azufre presentan una contribución significativa al aroma del vino debido a su elevada reactividad, siendo en algunos casos responsables de aromas indeseables. El principal compuesto de este grupo es el sulfuro de hidrógeno cuyo límite aceptable es de entre 10 y 100µg/l. Se ha observado que una deficiencia en fuentes de nitrógeno fácilmente asimilables es una causa importante de formación de sulfuro de hidrógeno por las levaduras. Otros compuestos de azufre que pueden contribuir al aroma del vino son: metilmercaptano, etilmercaptano, dimetilsulfuro y el dietil disulfuro.

### **1.2.6 Posibles mejoras en la actividad de las levaduras durante la fermentación**

A pesar de la importancia y valor de las metodologías tradicionales en los procesos de elaboración de vino, la industria actual está sometida a importantes presiones tanto por los agentes económicos como por los consumidores, lo que está llevando a la búsqueda, y en

consecuencia, a grandes cambios en las prácticas habituales de la enología. La producción de vinos de alta calidad y reproducibles, junto a la reducción de costes de producción y el empleo de tecnologías respetuosas con el medio ambiente, son los principales objetivos que afronta el sector del vino. Aunque la calidad de la uva es uno de los factores esenciales en la calidad del vino hay que tener en cuenta que la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es el microorganismo responsable de la transformación del mosto en vino, por lo que muchas de sus propiedades van a estar influenciadas claramente por dicho microorganismo. Entre estas propiedades pueden destacarse: su capacidad fermentativa, su capacidad de adaptarse a las condiciones particulares de cada mosto y de cada bodega, su resistencia a la amplia variedad de agentes adversos para su crecimiento a los que se va a enfrentar y sus características metabólicas.

El emplear cepas puras como inóculos en las fermentaciones industriales, junto con un buen conocimiento de la bioquímica, la genética y la biología molecular de *Saccharomyces cerevisiae*, hacen posible el planteamiento de estrategias de mejora genética de cepas vínicas de levadura. Estrategias que han de tener en cuenta las propiedades genéticas y genómicas de las cepas naturales de *Saccharomyces cerevisiae* que se emplean en la elaboración del vino, que se deben preservar si se quieren mantener las características fermentativas de las cepas modificadas. De los muchos aspectos potencialmente mejorables de las levaduras vínicas, desde el punto de vista industrial son especialmente interesantes las modificaciones que van encaminadas a mejorar la eficiencia del proceso fermentativo y a disminuir el riesgo de paradas de fermentación, mientras que desde el punto de vista del consumidor resultan atractivas las estrategias dirigidas a la mejora nutricional y organoléptica del producto final. Es difícil predecir la tendencia en el empleo de organismos genéticamente manipulados en la industria alimentaria, pero el desarrollo de estas estrategias permite entender con mayor detalle los factores relevantes para conseguir optimizar el rendimiento del proceso y las características del producto final, y puede ser útil para seleccionar las cepas naturales con las propiedades que sean de interés. Algunos ejemplos de las manipulaciones genéticas que se han llevado a cabo han conseguido: mejorar la capacidad fermentativa, mejorar la resistencia de las levaduras a la concentración de etanol y mejorar propiedades nutricionales y organolépticas del vino.

### 1.3 LEVADURAS NO-SACCHAROMYCES

La transformación del mosto de uva en vino mediante la fermentación alcohólica, como ya se ha mencionado, es el resultado de la acción combinada de varias especies de levaduras que se suceden durante dicha fermentación, si se lleva a cabo de la manera tradicional. Para observar qué especies son las que están presentes se han llevado a cabo diferentes estudios, realizados en diferentes países, sobre el aislamiento e identificación de levaduras presentes en la superficie de las uvas y en la maquinaria de las bodegas. De forma general, se puede afirmar que estas fermentaciones comienzan con el crecimiento de especies de las levaduras pertenecientes a los géneros *Candida*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Hanseniaspora*,

*Metschnikowia*, *Pichia*, *Torulaspota* y *Zygosaccharomyces*, también llamadas levaduras de bajo poder fermentativo, y que están englobadas en la denominación de levaduras no-*Saccharomyces*. El crecimiento de estas especies está limitado a los dos o tres primeros días de fermentación, después de los cuales mueren debido al efecto tóxico del etanol sobre ellas. A medida que estas levaduras no-*Saccharomyces* van desapareciendo, las cepas de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, denominadas de alto poder fermentativo, empiezan a multiplicarse hasta llegar a convertirse en las únicas responsables de la fermentación alcohólica. A pesar de crecer sólo durante los primeros días de la fermentación, las levaduras no-*Saccharomyces* producen gran cantidad de compuestos que tienen una gran influencia sobre la calidad del vino.

### 1.3.1 Aislamiento, identificación y enumeración

Para poder entender la contribución al proceso de fermentación y poder hacer uso del potencial de las levaduras no-*Saccharomyces*, es necesario disponer tanto de técnicas de aislamiento como de técnicas para su correcta identificación.

El recuento en placa es el procedimiento clásico para aislar y enumerar levaduras de uvas, mosto, vino y bodega. Se pueden utilizar las técnicas de siembra en superficie o profundidad, aunque parece ser que la siembra en superficie proporciona mejores resultados. Otros sistemas para enumerar levaduras son el método de los filtros de membrana, el método del número más probable, el método de la reducción de colorantes y el recuento microscópico directo.

En enología para aislar levaduras vínicas y conseguir distinguir entre *Saccharomyces cerevisiae* y no-*Saccharomyces* se utilizan medios de cultivo como el agar lisina, medio selectivo basado en que *Saccharomyces cerevisiae* no crece en este medio ya que es incapaz de utilizar la lisina como fuente de nitrógeno.

Aunque el recuento en placa de levaduras es idóneo para estudios enológicos, es demasiado lento para que pueda aplicarse en los programas de control de calidad, ya que en general es necesario incubar las placas hasta cuatro días para poder obtener resultados fiables. Como consecuencia de ello se han desarrollado métodos automáticos más rápidos para la enumeración de las poblaciones de levaduras, los cuales están basados en la impedancia, medidas de ATP y microscopía de fluorescencia.

Siguiendo los criterios clásicos de identificación, las levaduras se clasifican en base a sus características fisiológicas, bioquímicas y morfológicas. Las características fisiológicas sirven para describir e identificar las especies y también para identificar géneros. Las pruebas más utilizadas para la identificación son el crecimiento sobre distintas fuentes de carbono y nitrógeno, la capacidad de fermentación de distintas fuentes de carbono, requerimientos vitamínicos, hidrólisis de urea, resistencia a antibióticos y crecimiento a distintas temperaturas y en medios con concentraciones elevadas de cloruro sódico o azúcar. El

principal inconveniente de estos métodos clásicos es que necesitan de una media de 60 a 90 pruebas, haciendo del proceso un método complejo y hacendoso.

Por todos los inconvenientes que se presentan a la hora de utilizar los métodos clásicos, se han desarrollado otros métodos basados en el análisis del perfil de ácidos grasos de cadena larga y de proteínas, como pueden ser el RFLP de ADN mitocondrial, electroforesis de cromosomas o análisis de restricción del ADN ribosómico.

### 1.3.2 Levaduras no-*Saccharomyces* en la fermentación alcohólica de vinos

Al inicio de la fermentación, la microflora presente proviene únicamente de las uvas y está constituida fundamentalmente por especies que pertenecen a géneros que toleran muy poco la presencia de etanol como pueden ser *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Metschnikowia* y cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, éstas últimas son las únicas más tolerantes a la presencia de etanol, pero se encuentran en baja proporción respecto a las demás mencionadas. La relación de proporción existente entre levaduras no- *Saccharomyces* y *Saccharomyces*, puede contribuir a acentuar tanto los cambios químicos como los sensoriales que tienen lugar durante la fermentación y que más tarde darán lugar a cambios en cuanto a la calidad del vino que se obtiene.

En una bodega se debe decidir si se potencia o no la flora microbiana no- *Saccharomyces* con el fin de aprovechar sus características fermentativas. Como consecuencia de ello se han llevado a cabo estudios de biodiversidad para conocer las cepas de levaduras no- *Saccharomyces* propias de algunas variedades de uva para poder establecer una relación causa-efecto a partir de los vinos obtenidos a partir de dichas uvas.

Las diferencias encontradas pueden estar debidas al hecho de que en contraste con las levaduras *Saccharomyces*, las no-*Saccharomyces* secretan una serie de enzimas como glicosidasas, lipasas,  $\beta$ -glucosidasas, esterasas, proteasas o celulasas entre otros, que pueden interaccionar con los sustratos que están presentes en el medio mejorando algunas etapas del proceso como son la maceración, filtración y clarificación, el aumento de rendimiento y la extracción de color o las características del vino, en particular el aroma.

Si se tiene en cuenta que las enzimas que proceden de la uva son escasas y con una limitada actividad, es importante llevar a cabo estudios sobre la posibilidad de sacar el mayor rendimiento posible a las enzimas producidas por las levaduras que intervienen en el proceso debido a que por una parte se podría reducir la adición de enzima exógena, obteniendo un producto “más natural”, y por otra parte la acción de esas enzimas podría mejorar el proceso y los atributos sensoriales del vino al modificar ciertos componentes del mosto.

### **1.3.2.1 Influencia sobre el proceso de fermentación**

La uva está constituida por diversos compuestos como fenoles, precursores aromáticos, componentes estructurales y enzimas. Los componentes estructurales son lignina, celulosa, glucanos, pectinas, hemicelulosas y proteínas. Suponiendo que las enzimas propias de la uva ni son capaces de cubrir todas las actividades ni son totalmente eficaces en las condiciones de producción de vino, resulta por tanto de gran interés ser capaz de controlar el desarrollo de las levaduras no-*Saccharomyces* como productoras de enzimas. Del conjunto de enzimas que son secretados, los relacionados con la hidrólisis de los componentes estructurales reciben el nombre de enzimas de maceración (enzimas proteolíticas, celulolíticas, pectolíticas, etc.). Las enzimas pectolíticas son capaces de romper pectinas de cadena larga dando lugar a otras más cortas y solubles que facilitan el prensado de las uvas y contribuyen a la clarificación del mosto, pudiendo aumentar la extracción de sustancias que contribuyen al color y al aroma del mosto. Las enzimas proteolíticas presentes en las uvas son junto con los polisacáridos las responsables del aumento de turbidez en vinos y mostos. Con un tratamiento con proteasas se daría lugar a la hidrólisis de esas proteínas mejorando como consecuencia la clarificación y estabilidad del vino. La hidrólisis enzimática de dichas proteínas da lugar a moléculas solubles de tamaño menor como son los péptidos y aminoácidos, los cuales contienen nitrógeno, que además de ayudar en la clarificación y estabilización contribuyen a evitar posibles paradas en la fermentación por falta de nitrógeno asimilable.

### **1.3.2.2 Influencia en el aroma**

Una de las características organolépticas que definen la calidad de un vino es el aroma, que está determinado por cientos de compuestos distintos de concentraciones variables entre 10-1 y 10-10g/kg. Esta concentración depende de factores como la variedad, el clima, suelo, momento de vendimia, riego y de la gran cantidad de variables que existen en el proceso de fermentación, temperatura, pH, nutrientes o microflora.

Existen tres diferentes grupos de aroma, el varietal o primario procedente de la variedad de la uva, el aroma de fermentación o secundario y el bouquet de maduración o terciario, que resulta de las transformaciones del aroma durante el envejecimiento. Las levaduras no-*Saccharomyces* pueden influir tanto en el aroma primario como en el secundario.

#### **1.3.2.2.1 Aroma primario**

El aroma primario o varietal viene determinado por la cantidad y naturaleza química de los metabolitos secundarios volátiles que están presentes en las uvas. De entre todos ellos los terpenos son los que intervienen principalmente en el sabor y aroma del vino, por ejemplo de los vinos que provienen de la uva Moscatel. Los terpenos son compuestos volátiles que se

encuentran en la uva como moléculas libres o en forma de precursores glicosilados no aromáticos. La hidrólisis que permite liberar los compuestos aromáticos volátiles se lleva a cabo en dos etapas. En primer lugar se rompen los enlaces glicosídicos liberando azúcares como arabinosa, ramnosa o apiosa mediante la acción de una  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa,  $\alpha$ -L-ramnosidasa o  $\beta$ -D-apiosidasa, respectivamente. En la segunda etapa son liberados los terpenos a partir del glicósido resultante de la primera etapa mediante la acción de la  $\beta$ -D-glucosidasa.

Durante el proceso de fermentación, estos precursores, son hidrolizados en una proporción muy baja debido a que normalmente las enzimas hidrolíticas tienen su actividad reducida al ser inhibidos por el etanol y la glucosa y también por las condiciones del proceso, como pH y temperatura. En grado de inhibición es dependiente de las cepas de y especies de los organismos involucrados. Grossman y col. (1987) manifestaron que la  $\beta$ -glucosidasa de *Hansenula sp.*, aislada del mosto fermentado, era capaz de liberar sustancias aromáticas al adicionársele al vino, pero efectiva en menor grado al adicionársele al mosto. Los estudios realizados sobre las glicosidasas de las levaduras indican que existen algunas específicas capaces de influir en el aroma primario de los vinos, en especial en fermentaciones llevadas a cabo en condiciones nativas donde las levaduras no-*Saccharomyces* predominan al inicio de la fermentación, debido a que pocas cepas de *Saccharomyces* poseen actividad hidrolítica, mientras que en las no- *Saccharomyces* se ha encontrado una alta capacidad.

#### 1.3.2.2.2 Aroma secundario

Las responsables del aroma secundario o de fermentación son las levaduras, esto es debido a los compuestos que son generados durante la fermentación alcohólica por el metabolismo de las levaduras de vinificación. De entre todos ellos el etanol, glicerol y dióxido de carbono, a pesar de ser mayoritarios, tienen una contribución relativamente pequeña pero fundamental a la vez para el aroma del vino. Los alcoholes superiores, ácidos grasos volátiles, los ésteres y los aldehídos contribuyen en mayor medida a este aroma secundario, procediendo de la conversión de sustancias directamente fermentables como azúcares, ácidos grasos de cadena larga, de los compuestos nitrogenados y azufrados. Todos estos compuestos presentes en el mosto son capaces de penetrar en el interior de la célula por medio de la pared celular, y participan en diversas reacciones químicas que producen numerosos compuestos volátiles. El principal ácido graso responsable de aproximadamente el 90% de la acidez volátil del vino es el ácido acético. El resto de ácidos como el propanoico o el butanoico, están presentes en menor cantidad como producto del metabolismo de las levaduras.

En la siguiente tabla se describen los ácidos volátiles producidos por las levaduras durante la fermentación así como su concentración en el vino y el aroma que se le asocia a cada uno.

Compuesto	Concentración en vino [mg/l]	Aroma asociado
Ácido fórmico	50	-
Ácido acético	150 - 900	Vinagre, acre
Ácido propiónico	Trazas	Rancio, acre ligero
Ácido butírico	Trazas	Acre
Ácido isobutírico	Trazas	Acre
Ácido valérico	Trazas	Desagradable
Ácido isovalérico	< 3	Rancio, queso, sudor
Ácido hexanoico	Trazas - 37	Amargo, grasiento, vinagre, rancio
Ácido heptanoico	Trazas	Aceitoso, grasiento, jabonoso, rancio, mantequilla
Ácido octanoico	Trazas - 41	
Ácido nonanoico	Trazas - 54	Grasiento, fenólico, cítrico, rancio
Ácido decanoico	Trazas - 54	
Ácido tridecanoico	15 - 118	Grasiento, cítrico

Tabla 1. Concentraciones de los principales ácidos grasos volátiles producidos durante la fermentación alcohólica y aroma característico.<sup>2</sup>

Cuantitativamente el grupo de compuestos aromáticos más importante son los alcoholes superiores, alcoholes con más de dos átomos de carbono y con peso molecular y punto de ebullición superiores a los que presenta el etanol. En el vino se encuentran en concentraciones por debajo de 300 mg/l, y contribuyen a la complejidad aromática del vino. El alcohol isoamílico destaca por ser el mayoritario de los alcoholes superiores de carácter alifático. De entre los alcoholes aromáticos destaca el 2-fenil-etanol. La importancia de todos ellos proviene de su función como precursores de la formación de ésteres. En la siguiente tabla aparecen los alcoholes más importantes.

Compuesto	Concentración en vino [mg/l]	Aroma
Propanol	9 - 68, 125	Alcohol
Butanol	0,5 - 8,5	Alcohol
Alcohol isobutílico	9 - 28, 140	Alcohol
Alcohol amílico	15 - 150	Mazapán
Alcohol isoamílico	45 - 490	Mazapán
Hexanol	0,3 - 12	Herbáceo
Feniletanol	10 - 180	Floral, rosas

Tabla 2. Concentraciones de los principales alcoholes superiores producidos durante la fermentación alcohólica y aroma característico.<sup>3</sup>

<sup>2</sup> Fuente: Lambrechts y Pretorius, 2000.

<sup>3</sup> Fuente: Lambrechts y Pretorius, 2000.

Estudios han demostrado que la producción de alcoholes superiores es característica individual de cada cepa, y por tanto la capacidad de una cepa para producir alcoholes superiores en ciertas cantidades puede ser utilizada como carácter determinante para escoger una u otra levadura en procesos industriales. Se ha comprobado que un vino fermentado solo con *Saccharomyces*, posee de dos a tres veces más alcoholes superiores producidos por dicha levadura, que uno fermentado con cultivos puros de no- *Saccharomyces*. Empleando cultivos mixtos las diferencias se reducen y la cantidad total de alcoholes superiores es similar en todos los vinos.

En el vino se han identificado unos 160 ésteres, siendo uno de los grupos funcionales más importantes. Los ésteres, generados durante la fermentación, aportan a los vinos jóvenes aroma fresco y afrutado, en especial los ésteres de acetato. La cepa de levadura es un factor determinante de los niveles de ésteres que se formarán, siendo los géneros *Hansenula*, *Candida* y *Picchia*, los que poseen una mayor capacidad de producir acetato de etilo, superando a las levaduras vínicas por excelencia, *Saccharomyces cerevisiae*. A continuación se presenta una tabla con los principales ésteres producidos durante la fermentación y el aroma que confieren.

Compuesto	Concentración en vino [mg/l]	Aroma
Acetato de etilo	10 - 100	Barniz, afrutado
Acetato de 2-feniletilo	0,01 – 4,5	Rosa, miel, afrutado, floral
Acetato de isoamilo	0,03 – 8,1	Plátano, pera
Acetato de isobutilo	0,01 – 0,8	Plátano
Acetato de hexilo	0 – 4,8	Manzana madura
Butanoato de etilo	0,01 - 3	Floral, afrutado
Caprato de etilo	Trazas – 2,1	Floral
Caprilato de etilo	0,05 – 3,8	Piña, pera
Caproato de etilo	Trazas – 3,4	Manzana, plátano, violetas
Isovaleriato de etilo	0 – 0,7	Manzana, afrutado
2-metil butanoato de etilo	0 – 0,9	Fresa, piña

Tabla 3. Concentración en vino y aroma característico de los principales ésteres producidos durante la fermentación alcohólica.<sup>4</sup>

En cuanto a los compuestos carbonílicos, los aldehídos volátiles le confieren al vino características como el aroma a manzana, nuez o limón, dependiendo de la estructura química que posean. Destaca por encima de todos ellos el acetaldehído, que constituye el 90% de los aldehídos totales que se encuentran en el vino. Otros compuestos carbonílicos interesantes son el diacetilo, que en elevadas concentraciones indica un crecimiento de bacterias lácticas, y las tetrahidropiridinas, que son responsables del aroma a acetamida y relacionadas también con el crecimiento de bacterias lácticas en el vino. Diversos estudios indican que las levaduras no-*Saccharomyces* producen en mucha menos cantidad compuestos carbonílicos, como por

<sup>4</sup> Fuente: Rojas, 2002.

ejemplo las especies *H. anómala* o *K. apiculata*, que producen cantidades comprendidas entre niveles que no son detectables y 40 mg/l, frente a las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* que son capaces de producir desde 6 a 190 mg/l.

Compuesto	Concentración en vino [mg/l]	Aroma
<b>Acetaldehído</b>	10 - 300	Amargo, manzana verde
<b>Benzaldehído</b>	0,003 – 4,1	Almendra amarga
<b>Butanal</b>	Trazas	Acre
<b>Diacetilo</b>	0,05 - 5	Mantequilla
<b>Propanal</b>	Trazas	Amargo, manzana verde
<b>Isobutanal</b>	Trazas	Manzana
<b>Pentanal</b>	Trazas	Cacao, café afrutado
<b>Isovaleraldehído</b>	Trazas	Piña, pera
<b>2-acetil-tetrahidropiridina</b>	Trazas	“Mousy”

Tabla 4. Concentración en vino y aroma característico de los principales compuestos carbonílicos producidos durante la fermentación alcohólica.<sup>5</sup>

La contribución de los compuestos azufrados al aroma del vino es muy importante por ser moléculas muy reactivas y debido a sus bajísimos límites de detección. Ha sido estudiada con especial detalle la producción del sulfuro de hidrógeno ya que ocurre con frecuencia al partir de mostos con bajo nivel de nitrógeno, pero no existen apenas datos de producción de levaduras no-*Saccharomyces*, cosa que no ocurre con las *Saccharomyces*. De los datos que se dispone, casi en su totalidad todas las cepas estudiadas produjeron sulfuro de hidrógeno, siendo las que más producen las levaduras pertenecientes al género *Candida*.

Compuesto	Concentración en vino [mg/l]	Aroma
<b>Sulfuro de hidrógeno</b>	Trazas - >80	Huevos podridos
<b>Sulfuro de dimetilo</b>	Trazas - 910	Espárragos, maíz, melazas
<b>Sulfuro de dietilo</b>	Trazas	Verdura hervida, cebolla, ajo
<b>Disulfuro de dimetilo</b>	Trazas – 1,6	Repollo hervido, cebolla
<b>Disulfuro de dietilo</b>	Trazas	Ajo, goma quemada
<b>Metil mercaptano</b>	-	Huevos podridos, repollo
<b>Etil mercaptano</b>	-	Cebolla, goma
<b>S-metil tioacetato</b>	2 - 16	Vegetales podridos
<b>S-etil tioacetato</b>	Trazas - 4	Queso, quemado
<b>4-mercapto-4metilpentan-2-ol</b>	Trazas	Orina, guayaba

Tabla 5. Concentración en vino y aroma de los principales compuestos azufrados producidos por levaduras durante la fermentación alcohólica.<sup>6</sup>

<sup>5</sup> Fuente: Lambrechts y Pretorius, 2000.

### 1.3.3 Alteraciones del vino

Durante el proceso de vinificación existen diversas etapas que pueden sufrir un crecimiento microbiano indeseado, alterando el estado sanitario del vino y su calidad organoléptica, pudiendo no ser apto para el consumo. Dentro de los principales organismos capaces de alterar el vino se encuentran las levaduras no-*Saccharomyces*. Entre las alteraciones organolépticas se encuentran el sabor amargo, la presencia de aromas no deseados, turbidez, viscosidad y la formación de sedimentos y películas. Los puntos críticos potenciales de contaminación por microorganismos son: la uva, las instalaciones y equipos de la bodega y la fermentación y envejecimiento. Las alteraciones que producen las levaduras no-*Saccharomyces* son del tipo organolépticas, como la formación de fenoles volátiles, la re-fermentación, un incremento de la acidez volátil, formación de excesivos ésteres, la formación de films o películas microbianas y una desacidificación en exceso.

La re-fermentación se da típicamente en vinos ya acabados que contienen cantidades altas de azúcares residuales, donde las levaduras pueden desarrollarse, y provocando un enturbiamiento y desprendimiento de dióxido de carbono, que puede llevar al estallamiento del vidrio del vino, en caso de estar ya embotellado, debido al aumento de presión.

La alteración debida a una concentración excesiva de ésteres está ligada al crecimiento en el mosto de levaduras no-*Saccharomyces*, y se debe a la formación de acetato de etilo y de acetato de metilbutilo, y va acompañada normalmente de una formación de ácido acético. Una concentración igual o superior a 200 mg/l de acetato de etilo da lugar a considerar que un vino está alterado. El ácido acético se forma durante los inicios de la fermentación, niveles elevados dan lugar a un vino desagradable.

Levaduras de los géneros *Pichia*, *Candida* y *Metschnikowia* son capaces de formar una película en la superficie de los vinos almacenados, y confieren al vino aroma a oxidado que deriva de la producción de acetaldehído. Estas levaduras proliferan en vinos expuestos al aire ya que su desarrollo es dependiente de la presencia de oxígeno.

La calidad de un vino puede verse afectada debido a la presencia de levaduras capaces de degradar el ácido málico, cuando este vino disponga de bajos niveles de dicho ácido, ya que habrá una pérdida en la acidez del vino y en consecuencia disminuirá el pH, lo que favorece el crecimiento microbiano. Otro efecto debido a los bajos niveles de ácido málico puede ser la pérdida de color del vino, observándose un matiz azulado en vez del rojo intenso de un vino tinto.

---

<sup>6</sup> Fuente: Lambrechts y Pretorius, 2000.

## 1.4 CULTIVOS INICIADORES MIXTOS Y SECUENCIALES

Los cultivos mixtos hacen referencia a aquellos cultivos en los que inicialmente se encuentran presentes más de una especie de microorganismo y los cultivos secuenciales son aquellos en los que cada microorganismo será inoculado en un momento distinto del proceso de fermentación. Estos procesos son fundamentales sobre todo para la industria de bebidas fermentadas, es por ello muy importante realizar su estudio y modelado. Los modelos de estos procesos deben ser capaces de representar la dinámica de múltiples especies de microorganismos que crecen en una mezcla de sustratos. Tanto en alimentos como en bebidas fermentadas, y en especial dentro del mundo del vino uno de los aspectos más importantes a tratar es el estudio de las propiedades organolépticas, para ello se requiere estudiar la dinámica poblacional y el impacto de estos cultivos de distintos microorganismos en el perfil de compuestos volátiles, y la influencia que tienen en el perfil sensorial.

La inoculación de cultivos mixtos o secuenciales constituye hoy en día una gran herramienta para poder estandarizar el producto y preservar aquellas características que son deseables en el producto final. Con el fin de asegurar un producto estandarizado se seleccionan cepas de una determinada región, consiguiendo además preservar las características organolépticas distintivas de una zona de producción

Además de *Saccharomyces cerevisiae* se también están presentes otras levaduras en la fermentación del vino: *Hanseniaspora guilliermondii*, *Kloeckera apiculata* (Romano et al., 1992, 1997a; Zironi et al., 1993; Gil et al., 1996), *Pichia anomala* (Rojas et al., 2001), *Candida stellata*, *Torulaspota delbrueckii* (Ciani & Maccarelli, 1998), *Candida valida*, *Bretanomyces bruxellensis*, *Rhodotorula aurantiaca*, *Deckera intermedia* (Mateo et al., 1991;) y *Candida catarellii* (Toro & Vázquez, 2002). Todas ellas mejoran el bouquet del vino, pero no son capaces de llevar a término la fermentación debido la poca tolerancia que presentan frente a altas concentraciones de etanol. Es por ello que varios autores ya han estudiado fermentaciones usando mezclas de levaduras, ya sea inoculadas simultáneamente (Moreno et al. 1991; Gil et al., 1996; Erten, 2001) o secuencialmente (Herraiz et al., 1990; Zironi et al., 1993; Toro & Vázquez, 2002).

En los últimos años los cultivos mixtos de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* o de *Saccharomyces cerevisiae* y no-*Saccharomyces* se han aplicado obteniendo buenos resultados con el fin de mejorar las características aromáticas del vino. Por un lado es importante tener en cuenta las posibles interacciones que puedan existir entre los componentes del cultivo iniciador mixto y por otro es necesario determinar la posible influencia de los microorganismos autóctonos en el éxito de la implantación del cultivo, ya que aunque se trate de un cultivo iniciador de una cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae* no está garantizado el éxito.

Existe un gran número de estudios que se han enfocado en la investigación de los cultivos mixtos y secuenciales en la producción de vino, entre ellos se encuentran los siguientes:

Escalante-Minakata, Ibarra-Junquera. 2007. Los cultivos mixtos y las fermentaciones alcohólicas. *BioTecnología*; 11.

Ciani, M; Comitini, F; Mannazzu, I; Domizio, P. 2009. Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non- *Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Res*; 10: 123-133.

Jolly NP, Augustyn OPH, Pretorius IS: The Effect of Non- *Saccharomyces* Yeasts on Fermentation and Wine Quality. *South African Journal for Enology and Viticulture* 2003; 24.

Manzanares, P; Strehaiano, P; Taillandier, P; Vallés, S; Viana, F. 2011. 2-Phenylethyl Acetate Formation by Immobilized Cells of *Hanseniaspora vineae* in Sequential Mixed Fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture* 62: 122-126.

Gil, J. V; Manzanares, P; Vallés, S; Viana, F. 2009. Increasing the levels of 2-phenylethyl acetate in wine through the use of a mixed culture of *Hanseniaspora osmophila* and *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology* 135: 68-74.

Basado en los estudios anteriores se ha llevado a cabo el estudio que a continuación se propone, en el cual se realizará la fermentación alcohólica partiendo de un cultivo secuencial de levaduras nativas chilenas junto con una comercial *Saccharomyces cerevisiae*, con el fin de producir un vino con unas características sensoriales y aromáticas características.



# Capítulo 2.

## OBJETIVOS



El presente proyecto está englobado en uno de mayor amplitud en el que se desea evaluar la contribución de levaduras nativas chilenas no-*Saccharomyces* sobre el mejoramiento del perfil aromático del vino en fermentaciones, tanto en vino tinto como en blanco.

El principal objetivo que se persigue este proyecto es realizar la fermentación con una inoculación secuencial, co-inoculación, primero de una levadura nativa chilena no-*Saccharomyces* seguida de una levadura *Saccharomyces* sobre un mosto Sauvignon Blanc Limari. Las levaduras nativas escogidas para este estudio son:

- Levadura nativa 1: código PNLI29 desde Limari identificada como *Lachancea thermotolerans*
- Levadura nativa 2: código SB1MP3 desde Maipo identificada como *Hanseniospora uvarum*

Para asegurar una correcta fermentación se ha de realizar un seguimiento de los principales parámetros de avance de dicha fermentación:

- Medición del etanol mediante un kit enzimático específico
- Seguimiento de las poblaciones de levaduras por conteo al microscopio

Además se van a realizar dos fermentaciones de control con levaduras comerciales para tener una referencia de una fermentación correcta:

- Control 1: *Torulaspora delbrueckii*, levadura no- *Saccharomyces* comercial que se va a co-inocular con *Saccharomyces cerevisiae*.
- Control 2: *Saccharomyces cerevisiae*

Finalmente, una vez concluida la fermentación, con el fin de garantizar que son las levaduras inoculadas las presentes en las distintas fases de la fermentación, se va proceder a realizar:

- Extracción de ADN
- Amplificación del ADN extraído (PCR)
- Digestión de las amplificaciones (RFLP) y revelado por electroforesis



# Capítulo 3.

## MÉTODOS Y MATERIALES



### 3.1 MATERIALES

Los materiales que se han utilizado para la realización de las fermentaciones y su seguimiento han sido los siguientes:

- Tubos Falcon 50 ml y 15 ml
- Levaduras:
  - ✓ Nativa 1: código PNLI29
  - ✓ Nativa 2: código SB1MP3
  - ✓ *Saccharomyces cerevisiae* comercial código EC118
  - ✓ *Torulaspota delbrueckii* comercial código TD291
- Mosto Sauvignon Blanc Limari
- Tubos 0,2 ml, 0,6 ml y 2 ml
- Cubetas plástico 3 ml para espectrofotómetro
- Micropipetas
- Puntas de plástico con y sin filtro
- pHmetro
- Baño termostatzado VISION
- Refractómetro
- Enzimas:
  - ✓ Liticasa
  - ✓ Proteinasa k
  - ✓ HINF I, junto con su tampón específico
- Partidores ITS 1 e ITS 4
- Nutrientes: Vitaferment
- Metabisulfito de potasio
- Nucleótidos
- Cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ )
- Agua:
  - ✓ Destilada
  - ✓ Libre de nucleasas
  - ✓ Ultra pura (Miliq)
- Kit medición etanol
- Microscopio Amscope M500
- Cámara de Neubauer
- Cubreobjetos para microscopio
- Termociclador ESCO Swift Max Pro
- Equipo electroforesis bidimensional

### 3.2 PREPARACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS, METODOLOGÍA

Los tratamientos a realizar son cuatro, dos correspondientes a las co-inoculaciones con las levaduras nativas y los otros dos corresponden a dos controles, uno es una co-inoculación de una no-*Saccharomyces* comercial con una *Saccharomyces* comercial y el último tratamiento corresponde a un control general de fermentación solo con una levadura, la *Saccharomyces cerevisiae* comercial. A continuación en la tabla se esquematiza cada uno de los tratamientos, cada uno de los cuales tendrá tres réplicas.

Tratamiento	1			2			3			4		
	1.1	1.2	1.3	2.1	2.2	2.3	3.1	3.2	3.3	4.1	4.2	4.3
no- <i>Saccharomyces</i>	Nativa 1, PNL129			Nativa 2, SB1MP3			<i>Torulaspora delbrueckii</i> TD291			-		
<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> EC118											

Tabla 6. Esquema de los tratamientos realizados.

Para preparar las fermentaciones lo primero es homogeneizar el mosto, mediante agitación, después se proceden a llenar los 12 tubos Falcon de 50 ml, con 50 ml del mosto. Para realizar la primera inoculación es necesario tener las levaduras nativas, que se encontraban congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , cultivadas en medio líquido (YPD), para obtener la concentración de levaduras que se desea inocular. Para ello se procedió a realizar un conteo con el microscopio la población de levaduras y mediante la siguiente ecuación se consiguió obtener el volumen necesario de ese cultivo líquido a añadir a los tubos Falcon de 50 ml con mosto, llegando así a la concentración de  $10^8$  células/ml deseada.

#### Nativa 1, PNL1 29

Se contaron  $4,9185 \cdot 10^9$  células/ml, por ello:

$$V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$50 \text{ ml} \cdot 10^8 \frac{\text{cél.}}{\text{ml}} = V_2 \cdot 4,9185 \cdot 10^9$$

$$V_2 = 1,0165 \text{ ml}$$

#### Nativa 2, SB1MP3

En el microscopio se contaron  $1,111875 \cdot 10^{10}$  células/ml:

$$V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$50 \text{ ml} \cdot 10^8 \frac{\text{cél.}}{\text{ml}} = V_2 \cdot 1,111875 \cdot 10^{10}$$

$$V_2 = 0,45 \text{ ml}$$

*Torulaspora*, TD291

Se inoculó según las instrucciones que da el proveedor de dicha levadura, 25 g/hl, primero ambientando la levadura con una solución de mosto y agua destilada durante unos 10 minutos para después añadirla a los tubos Falcon correspondientes. Para ello se pesaron en la balanza 0,0125 g de levadura para cada una de las 3 réplicas.

*Saccharomyces*, EC118

De igual forma que con la *Torulaspora*, se trabajó según las instrucciones, en este caso se debían tener 20 g/hl, por lo que se pesaron 0,01 g de dicha levadura para cada una de las 3 réplicas.

Una vez inoculado el mosto, se le ha de añadir una primera dosis de nutrientes, 20 g/hl de Vitaferment, para que las levaduras tengan todo lo necesario para crecer y realizar la fermentación sin paradas indeseadas. La segunda dosis, también de 20 g/hl, se ha de añadir el tercer día de fermentación.

Los tubos ya con el mosto inoculados se dejan en un baño termostaticado a 18°C, con los tapones de los tubos no cerrados del todo para dejar salir el dióxido de carbono que se va a generar en el proceso de fermentación.



Figura 2. Baño termostaticado laboratorio MECESUP, Chile.

A las 24 horas de haber inoculado la primera levadura, se ha de realizar la co-inoculación, solo en los 3 primeros tratamientos, lo que contienen las levaduras no-*Saccharomyces*. Se inocularon en cada tubo Falcon 0,01 gramos de levadura *Saccharomyces* comercial EC118, ambientando primero la levadura con solución de agua destilada y mosto durante 10 minutos y después añadiendo poco a poco mosto a la levadura hasta que se alcanzara una temperatura similar a la temperatura del baño termostaticado para poder añadirla al tubo Falcon del ensayo.

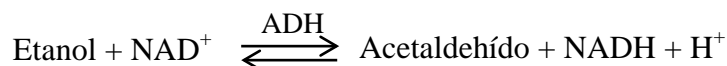
### 3.3 MÉTODOS DE SEGUIMIENTO DE LA FERMENTACIÓN

Para realizar el seguimiento de una fermentación existen diversos métodos como la evaluación cinética de la fermentación mediante kit enzimáticos, medida de la glucosa y fructosa, dado que los azúcares disminuyen a lo largo de la fermentación, medida del etanol, medida de la densidad, medida del peso, ya que en una fermentación al liberarse dióxido de carbono como producto las muestras disminuyen su peso, etc.

De entre todos los métodos disponibles se ha escogido realizar el seguimiento mediante la medición de etanol y realizando conteo de levaduras al microscopio.

#### 3.3.1 Medición de etanol

Para llevar a cabo un seguimiento de la fermentación mediante la medición de etanol, se van tomando muestras del avance de dicha fermentación, de las cuales por medio de un kit enzimático se podrá obtener el porcentaje en etanol que contienen y que hará referencia al etanol que contienen nuestras microfermentaciones en ese momento. Para ello el kit enzimático está basado en el principio de que el etanol se oxida a acetaldehído por medio del dinucleótido de nicotinamida-adenina (NAD) en presencia de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH).



El equilibrio de esta reacción se encuentra desplazado hacia la izquierda, es decir, en el lado de etanol y NAD. Pero puede ser completamente desplazada hacia el lado derecho en condiciones alcalinas y atrapando el acetaldehído formado. El acetaldehído se oxida cuantitativamente a ácido acético en presencia de aldehído deshidrogenasa (AI-DH).



El NADH se determina por medio la absorbancia de luz que presenta que presenta en el espectrofotómetro uv-visible tanto a 334, 340 como a 365 nm. Por tanto se tiene una relación entre el etanol presente en la muestra y el NADH, proporcionando finalmente el kit el contenido en etanol. El kit de medición de etanol contiene:

- Botella 1 con aproximadamente 100 ml de solución, que consta de: tampón difosfato de potasio, pH aproximado igual a 9,0
- Botella 2 con aproximadamente 30 tabletas, cada tableta contiene: NAD y aldehído deshidrogenasa
- Botella 3 contiene aproximadamente 1,6 ml de suspensión que consiste en: ADH

- Botella 4 con solución de control de ensayo de etanol cuyo fin es llevar un control del ensayo, pero no afecta a la hora de realizar los cálculos.

Para llevar a cabo el procedimiento es necesario que la longitud de onda del espectrofotómetro se ajuste a 340 nm (365 o 334 nm también son válidos), que la cubeta de vidrio o plástico posea una trayectoria de luz de 1 cm, que la temperatura del ambiente de trabajo sea de 20°C y por último y más importante que la solución de muestra contenga de 0,3 hasta 12 µg de etanol por ensayo. Para esta última condición se ha de tener un conocimiento previo aproximado de la cantidad de etanol que van a tener las muestras a analizar, para poder llevar a cabo las diluciones pertinentes, sino el kit se satura y dan valores de absorbancia erróneos y por tanto porcentaje de etanol erróneo también. Por otro lado es absolutamente necesario tapar las cubetas con parafilm, durante la medición con el fin de evitar que de la mezcla de ensayo se evapore el etanol.

Una vez que se cumplen los requisitos para medir la absorbancia es necesario que se lleven a cabo las reacciones anteriormente mencionadas en las que se obtiene como producto NADH, para ello además del número de muestras será necesario un blanco y una cubeta con la solución de control. Cada cubeta contendrá:

<b>Medición absorbancia 1 (A<sub>1</sub>)</b>		
Blanco	100 µl agua destilada miliq.	Agitar, esperar 3 minutos y medir absorbancia
Muestras	100 µl muestra (diluída)	
Control	100 µl botella 4, control	
<b>Medición absorbancia 2 (A<sub>2</sub>)</b>		
Blanco	50 µl botella 3	Agitar, esperar 10 minutos y medir absorbancia
Muestras		
Control		

Tabla 7. Esquema de realización de ensayo de medición de etanol con kit enzimático.

Después de medir las absorbancias se pasa a determinar las diferencias de absorbancia (A<sub>2</sub>-A<sub>1</sub>) para el control, el blanco y la muestra.

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{muestra} - (A_2 - A_1)_{blanco}$$

Las diferencias de absorbancia medidas deben, por regla general, ser de al menos 0,1000 unidades de absorbancia para conseguir resultados suficientemente precisos. Con el control se procede de la misma forma que con las muestras al determinar la diferencia.

### Cálculo

De acuerdo con la ecuación general para calcular la concentración en reacciones en las que la cantidad de NADH formado es estequiométricamente la mitad de la cantidad de sustrato:

$$c = \frac{V \times MW}{\varepsilon \times d \times v \times 2 \times 1000} \times \Delta A \left[ \frac{g}{l} \right] = \frac{0,7256}{\varepsilon} \times \Delta A \left[ \frac{g_{etanol}}{l_{solución\ de\ muestra}} \right]$$

- V = volumen final [ml]
- v = volumen de la muestra [ml]
- MW = peso molecular de la sustancia a ensayar [g/mol]
- d = trayectoria de la luz [cm]
- $\epsilon$  = coeficiente de extinción de NADH a:
  - ✓ 340 nm = 6,3 [l · mmol<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup>]
  - ✓ 365 nm = 3,4 [l · mmol<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup>]
  - ✓ 334 nm = 6,18 [l · mmol<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup>]

Si la muestra se ha diluido durante la preparación, el resultado se debe multiplicar por el factor de dilución F. Para comprobar que el ensayo se ha realizado correctamente el resultado obtenido al introducir los datos de absorbancia para el control han de ser cercanos a 0,06 g etanol/l de solución.

A la hora de analizar muestras que contienen etanol (bebidas, cosméticos, etc.), lo que se calcula el grado alcohólico volumétrico, que se calcula por medio de la densidad del etanol, para una temperatura de 20°C de la siguiente forma:

$$\% \text{ Etanol} = \frac{c_{\text{Etanol}} \left[ \frac{\text{g}}{\text{l}} \text{ solución de la muestra} \right]}{10 \times 0,78924 \left[ \frac{\text{g}}{\text{ml}} \right]}$$

Una de las formas de cerciorarse de que la fermentación ha llegado o está llegando a su fin es mediante esta medición, ya que en los últimos días de fermentación el grado alcohólico se mantiene, debido a que las levaduras ya no son capaces de producir más. También comparando el porcentaje alcohólico obtenido para las muestras con el calculado inicialmente mediante el contenido inicial de azúcares en el mosto, grado alcohólico probable (GAP), se tiene una idea de que la fermentación está llegando a su fin.

### 3.3.2 Recuento de levaduras al microscopio

Otra de las técnicas utilizadas para hacer un seguimiento de la fermentación es ver la evolución del número de células. Ya que se conocen las fases que atraviesa una levadura en un proceso de vinificación, se va estudiando en qué etapa de la fermentación uno se encuentra, ya que al principio durante la fase de latencia, las levaduras no se reproducen, solo se acomodan al nuevo medio en el que habitan. Posteriormente durante la fase siguiente de crecimiento exponencial se da un aumento exponencial, valga la redundancia, en el número de células que se observarán en el microscopio. Finalmente se observará un descenso en la población de células vivas, hecho indicativo de que la fermentación está llegando a su fin.

Para realizar el recuento de levaduras se utilizan cámaras de recuento, como la cámara de Neubauer (también existen otras cámaras para recuento como la de Thoma), se trata de una gruesa placa de cristal con forma de portaobjetos, de unos 30 x 70 mm y unos 4 mm de

grosor. En una cámara simple, la porción central, que es donde se realiza el conteo, está dividida en 3 partes.



Figura 3. Cámara de Neubauer.<sup>7</sup>

En la parte central se encuentra grabada una retícula cuadrangular, en el caso de la imagen la cámara posee doble cámara, caso más común, existen por lo tanto 2 zonas de conteo, una superior y otra inferior al eje longitudinal de la cámara.

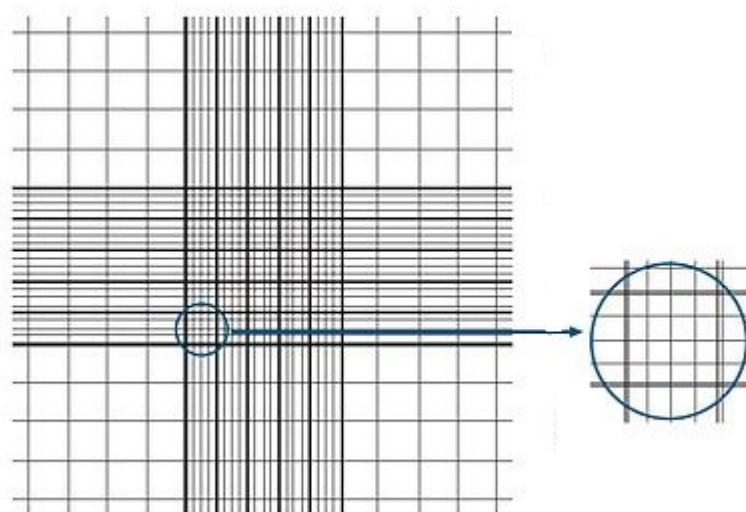


Figura 4. Retícula de cámara de Neubauer.<sup>8</sup>

La retícula completa mide 3 mm x 3 mm de lado, y está subdividida en 9 cuadrados cada uno de 1mm. El cuadrado central se divide en 25 cuadrados medianos de 0,2 mm de lado, y cada uno de estos cuadros se subdivide a su vez en 16 cuadrados pequeños.

Para llevar a cabo el conteo primero se ha de poner un volumen muy pequeño de muestra en una de las dos zonas de recuento y sobre ellas se pone un cubreobjetos evitando la formación de burbujas, las levaduras se distribuirán en la cámara por capilaridad. A continuación se fija la cámara de recuento en la platina del microscopio para realizar la observación microscópica.

<sup>7</sup> Fuente: BEMED. <http://www.bemed.com.br/produtos/camara-de-contagem/camara-de-neubauer-melhorada-espelhada-kasvi>.

<sup>8</sup> Fuente: Imagen de Wikipedia adaptada. [https://es.wikipedia.org/wiki/C%C3%A1mara\\_de\\_Neubauer](https://es.wikipedia.org/wiki/C%C3%A1mara_de_Neubauer).

Para hacer el recuento, hay que fijarse en el cuadrado central, e ir contando las células de cada uno de sus 25 cuadrados, normalmente al ser una tarea muy tediosa se cuentan los 5 cuadrados de la diagonal y se introducen en la siguiente fórmula, obteniendo una aproximación del total de células/ml de muestra.

$$\frac{N^{\circ}células}{ml} = 2,5 \times 10^5 \times F \times N \times \frac{25}{i}$$

- F: Factor de dilución de la muestra, si ha sido necesario realizar dicha dilución
- N: número de células obtenido al contar los cuadrados de la cámara
- i = número de casillas de las 25 disponibles, que se han contado para obtener N

En ocasiones será necesario hacer diluciones de las muestras ya que será imposible hacer el recuento debido a la cantidad de ellas. Por otro lado si se quiere hacer una diferenciación entre la población de células vivas y las muertas, se lleva a cabo una tinción de las muestras con violeta de cristal. Con esta tinción se consigue distinguir entre las células vivas, activas que repelen el colorante, y las muertas, que quedan coloreadas.

### 3.4 MEDICIONES A REALIZAR

Como ya se ha mencionado anteriormente es importante conocer las características iniciales del mosto ya que de ellas dependerán en parte las características que se obtengan en el producto final. En este proyecto las condiciones iniciales que se han medido en el mosto han sido la determinación tanto del SO<sub>2</sub> libre, la acidez, el contenido inicial de azúcar y el pH.

Por un lado la medida de pH del mosto se obtiene directamente de la lectura de un pHmetro. El pH mide la acidez del mosto o vino, en ellos la medida de pH debe de estar entre 3 y 4. En los mostos y en los vinos, el pH varía dependiendo de la maduración de las uvas, de la concentración de ácidos orgánicos en el momento de la cosecha, en la variedad de la uva, en las prácticas enológicas, en la presencia y metabolismo de micro-organismos, etc.

De una forma similar se obtiene el contenido en azúcares inicial del mosto, mediante un refractómetro, y con ello se puede llegar a tener una idea anticipada del porcentaje de alcohol potencial que tendrá el vino final obtenido, mediante tablas de Conversión de °Brix a grados alcohólicos, o mediante el cálculo del grado alcohólico probable (GAP).

#### 3.4.1 Determinación de la acidez total

La acidez de un mosto corresponde mayoritariamente a los ácidos málico, tartárico y a sus sales, aunque en el vino existen además presentes otros ácidos como el ácido láctico, el succínico o el fosfórico. Dentro de un medio acuoso estos ácidos se disocian dando lugar a

iones  $H^+$ , siendo el grado de disociación distinto para cada uno de los ácidos. Como ejemplo el ácido tartárico es más fuerte que el ácido málico, por lo que entregará más iones  $H^+$ .

La acidez total, o de titulación, corresponde a la suma de todos los ácidos que son valorables después de haber llevado el pH a 7 mediante la adición de una solución alcalina. Esta acidez total se descompone en acidez fija y acidez volátil, y la mayoría de vinos contienen entre 4,5 y 7,0 g/l de tartárico.

En cuanto a la acidez de un vino, se distinguen principalmente dos conceptos, la concentración real de iones  $H^+$  (pH), definida como el inverso del logaritmo de la concentración molar de los iones  $H^+$ . El otro concepto es el número de funciones ácidas libres o la cantidad de ácidos presentes, y que se determina mediante una valoración, o lo que es lo mismo, una titulación, con una solución alcalina. Se define el punto titulométrico como aquel punto en el que la totalidad de las funciones ácidas de un vino o mosto han sido combinadas con bases. Este punto es difícil de determinar siendo una fuente de discusión entre los investigadores de varios países y por ello ha sido de suma dificultad poder llegar a un acuerdo sobre el valor de dicho punto. En Estados Unidos se asegura que para poder neutralizar los ácidos débiles existentes en el vino, como son la segunda función del ácido málico o la tercera del cítrico, la neutralización debe llegar a alcanzar un valor de pH de 8,2 a 8,4, por este motivo utilizan como indicador ácido-base fenolftaleína que tiene su punto de viraje entre esos valores. Por otro lado los franceses y la OIV (Organización Internacional de la Viña y el vino) postulan que ya que el vino contiene sustancias anfóteras como sustancias colorantes, no se puede conseguir subir el pH por encima de 7 sin incurrir en un error que puede ser apreciado en el caso de vinos muy coloreados, en cuyo caso se estaría consumiendo álcali para neutralizar funciones ácidas que no existen en el vino y también en otras reacciones como saponificación de los ésteres, una posible oxidación del azúcar o una hidrólisis del aldehído bisulfito.

Por todo lo explicado anteriormente la OVI acepta la definición de acidez total siguiente: álcali que es necesario para llevar el pH del vino a un valor de 7. Por ello proponen como indicador ácido-base utilizar azul de bromotimol, cuyo punto de viraje se encuentra entre pH 6,0 y 7,6.

Por otro lado en Chile a pesar de las recomendaciones de la OVI se utiliza como indicador ácido-base la fenolftaleína, que como ya se ha dicho tiene su punto de viraje en un pH aproximadamente de 8,4. Un factor de variación se produce al agregar un exceso de indicador, lo que provoca un descenso del punto titulométrico, dando valores de acidez menores de 0,1 g/l de ácido sulfúrico. El método que se utiliza es el siguiente:

- En un matraz Erlenmeyer de 250 ml se agregan 50 ml de agua destilada y 1 ml de indicador
- Se adicionan unas gotas de NaOH 0,1N hasta desarrollar un tono rosado en la solución
- Sobre el agua ya neutra se añaden 5 ml del vino o mosto a analizar, que hará que desaparezca el tono rosado anterior
- Se procede a valorar la solución desde una bureta con NaOH 0,1N

Una vez hecha la valoración se procede a calcular el valor de acidez mediante la siguiente fórmula, donde V hace referencia al gasto en ml de NaOH 0,1N:

$$g \text{ de } H_2SO_4 = V \times 0,0049 \times 200$$

Lo que nos da la acidez total expresada en gramos de ácido sulfúrico, pero en vinos de exportación, y en general, el resultado de acidez se expresa en forma de gramos de ácido tartárico, para lo cual se ha de multiplicar el resultado obtenido en gramos de sulfúrico por 1,53.

### 3.4.2 Medida de acidez volátil

La acidez volátil la componen el conjunto de ácidos grasos, en especial los de la serie acética que están presentes en el vino, formada por el ácido acético, el fórmico, el propiónico, el butírico y en muy pequeñas cantidades el ácido isovalérico, el caproico y el caprílico.

Los ácidos volátiles del vino tienen su origen en el proceso de la fermentación debido al metabolismo de la levadura. Normalmente, una fermentación termina con un contenido en ácido acético de entre 0,2 y 0,4 g/l que contribuyen al típico sabor del vino. Los valores son dependientes de muchos factores como el tipo de levadura utilizada, la temperatura de fermentación o la naturaleza del medio.

Cuando en un vino se sobrepasa un contenido en ácido acético de 0,7 o 0,8 g/l es probable que exista alguna alteración microbiológica como la picadura acética, la “Tourné” o el amargor a partir de la degradación de la glicerina. Todo esto justifica la importancia de analizar el contenido en acidez volátil, además de que económicamente un vino con alta acidez volátil es muy castigado en el mercado.

La ley de alcoholes chilena estipula que los vinos que contengan más de 2 g/l de ácido acético no pueden consumirse directamente y deben ser destinados para la producción de vinagre o pueden destinarse también a ser destilados para dar lugar a alcohol vitivinícola de subproductos.

Tanto los ácidos láctico y succínico como el ácido carbónico y el anhídrido sulfuroso deben ser excluidos de la acidez volátil del vino, por ello cualquier método que se aplique para la determinación de esta acidez debe evitar los factores de error que suponen el dióxido de carbono y el anhídrido sulfuroso en el vino. Para lograr eliminar el dióxido de carbono es suficiente con calentar el vino a una temperatura entre 40 y 50°C, y agitarlo fuertemente. Por el contrario el anhídrido sulfuroso ha de cuantificarse, tanto el total como el parcial, y restarlo posteriormente al valor de acidez volátil obtenido.

El método oficial chileno para la determinación de la acidez volátil de un vino es el método de Blarez, método basado en el arrastre de los ácidos volátiles mediante una corriente de agua en forma de vapor, llegando a su total extracción. Para llevarlo a cabo son necesarios:

- Una fuente de vapor constituida por un matraz de caldera que contiene en su interior agua alcalinizada para evitar la formación de ácido carbónico
- Un matraz Kjeldal de 250 ml que esté conectado a la fuente de vapor y a un condensador-refrigerante
- Un matraz Erlenmeyer de 250 ml para recibir el destilado
- Un mechero

El procedimiento para llevar a cabo esta medición consiste en medir 10 ml de vino, una vez le ha sido eliminado el CO<sub>2</sub> y verterlo en el matraz Kjeldal conectado a la fuente de vapor y se deja destilar hasta obtener 100ml en el matraz Erlenmeyer. El destilado se valora con NaOH 0,1N, utilizando fenolftaleína como indicador. El valor de la acidez volátil viene dado por la siguiente expresión, siendo V los ml de NaOH consumidos:

$$\frac{g_{\text{ácido acético}}}{l} = V \times 0,6$$

### 3.4.3 Determinación del sulfuroso libre

El sulfuroso (SO<sub>2</sub>) se encuentra en el vino en dos estados, que dependen directamente del pH y de su acidez, estos son:

- SO<sub>2</sub> activo o molecular, que lleva a cabo la acción antiséptica en concentraciones superiores a 0,8mg/l, controlando el desarrollo de casi todas las especies de microorganismos. Esta forma es la que emite olor a azufre penetrante y picante, característico de este compuesto.
- Bisulfito, que es la proporción de anhídrido capaz de formar sales ácidas disociadas, tiene bajo poder antiséptico sobre levaduras y un poder más elevado sobre ciertos géneros de bacterias.

Para determinar el anhídrido sulfuroso libre, los chilenos llevan a cabo el método de Ripper. Este método está basado en la reacción redox que tiene lugar en la que el sulfuroso reacciona con el yodo. El yodo que no reacciona junto con el almidón dan un color azul, que indican el punto final de la valoración. Es recomendable añadir un poco de bicarbonato de sodio para prevenir que el oxígeno interfiera en la valoración.

Los reactivos que se utilizan son: ácido sulfúrico 1/3, almidón 1%, Yodo 0,2N y bicarbonato de sodio. Para este método se utiliza un matraz Erlenmeyer de 250 ml en el que dependiendo de si es vino blanco o tinto, se añaden 25 ml o 10 ml respectivamente de la muestra a analizar, junto con 2 ml de ácido sulfúrico, 1 ml de almidón y una punta de espátula de bicarbonato de sodio. Inmediatamente después se valora con el yodo hasta observar una tonalidad azul-morada que ha de permanecer al menos durante 30 segundos.

Para obtener la cantidad de sulfuroso libre operamos de la siguiente forma, siendo V el volumen consumido de yodo:

- Vino blanco

$$\frac{mg_{SO_2 libre}}{l} = V \times 25,6$$

- Vino tinto

$$\frac{mg_{SO_2 libre}}{l} = V \times 64$$

### 3.4.4 Determinación del sulfuroso total

La medida del sulfuroso total da como resultado el contenido tanto de sulfuroso libre como del que se encuentra combinado. Se espera que el sulfuroso que se encuentra libre sea un tercio del total contenido en el vino.

Con respecto al sulfuroso que se encuentra combinado: los bisulfitos poseen la propiedad de fijarse a las moléculas que poseen un grupo carbonilo (azúcares, ácidos cetónicos y etanal). Se tienen dos tipos de combinaciones: Combinaciones de débil constante de disociación, que corresponden a las combinaciones estables, ocurren generalmente con aldehídos producidos por las levaduras para formar ácido etanol sulfónico, que es inútil en el control de los microorganismos de alteración. Y por otro lado están las combinaciones de fuerte constante de disociación, que corresponden a combinaciones inestables dependientes del equilibrio entre los contenidos de anhídrido sulfuroso libre y anhídrido sulfuroso combinado.

La determinación del sulfuroso total también se lleva a cabo mediante el método de Ripper, el fundamento de este método es el mismo que para la determinación del sulfuroso libre, pero para conseguir realizar la determinación del sulfuroso total es necesario hidrolizar la muestra en medio fuertemente alcalino con el fin de liberar el  $HSO_3^-$  que está unido al acetaldehído y a otras moléculas orgánicas y así poder valorar directamente el sulfuroso total.

Los reactivos a utilizar son ácido sulfúrico 1/3, almidón 1%, yodo 0,2N, bicarbonato de sodio y NaOH 1N. En un matraz Erlenmeyer de 250 ml se añaden para vino blanco 25 ml y para tinto 10 ml de la muestra a analizar y el mismo volumen de NaOH que de muestra. Se agita la mezcla y se deja reposar durante 10 minutos, tapando el matraz. Pasado el tiempo de reposo se adicionan 2 ml de ácido sulfúrico y 1 ml de almidón, junto con una punta de espátula de bicarbonato de sodio, e inmediatamente se realiza la valoración con el yodo, hasta viraje azul-morado de la solución.

Siendo V el volumen utilizado de yodo en la valoración, se calcula:

- Vino blanco

$$\frac{mg_{SO_2 total}}{l} = V \times 25,6$$

- Vino tinto

$$\frac{mg_{SO_2 total}}{l} = V \times 64$$

### 3.5 CARACTERIZACIÓN DE LEVADURAS

Con el fin de conocer qué microorganismo está presente, y es el que ha realizado la fermentación alcohólica, se han llevado a cabo diversos estudios describiendo la aplicación de herramientas biológicas moleculares para conseguir diferenciar y caracterizar las levaduras utilizadas. Una de las técnicas más utilizadas para este propósito es la *Polymerase Chain Reaction*, o reacción en cadena de la polimerasa (PCR), desarrollada por el químico Kary B. Mullis en 1985, la cual tiene la capacidad de amplificar un segmento de ADN en un billón de copias idénticas. Una vez se ha conseguido amplificar dicho ADN puede ser entonces analizado por medio de la técnica de electroforesis en gel, ya sea de poliacrilamida o de agarosa. Otra técnica para la identificación de microorganismos es la determinación del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), y se basa en la distinción de los microorganismos analizando los patrones de ruptura que se generan en lugares específicos del genoma del microorganismo, cuando las enzimas de restricción o endonucleasas lo cortan.

Para realizar estas técnicas es necesario primero extraer el ADN de los microorganismos a analizar, y para realizar el RFLP previamente se ha de haber amplificado el ADN por medio de la PCR.

#### 3.5.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN se puede realizar de dos formas, una química, que por medio de la acción de enzimas se consigue una precipitación en frío de las proteínas y paredes, pudiendo separarlas del ADN. La otra forma consiste en una extracción mecánica seguida de una química, que se lleva a cabo por medio de unas piedras (silicatos o vidrio) que son las encargadas de romper las membranas y paredes, para posteriormente agregar reactivos que permitan la precipitación de paredes y membranas para poder aislar el ADN.

Para llevar a cabo la extracción de ADN de una muestra (de 1 a 2 ml), primero se ha de centrifugar dicha muestra para separar el pellet del sobrenadante. El pellet obtenido se ha de

lavar primero con PBS (500  $\mu$ l) y posteriormente con TE (500  $\mu$ l), esto es, añadir PBS o TE, vortexear la muestra, centrifugar y volver a separar el pellet del sobrenadante. Con ello conseguimos limpiar los compuestos grasos de la muestra. Una vez limpia la muestra se agrega otra vez PBS (480  $\mu$ l) y se vortexea para soltar el pellet, quedando lista para la adición de las enzimas. Primero se añade la enzima Liticasa (20  $\mu$ l, en concentración 20 mg/ml), que va a romper la pared y membranas, y se deja incubar a 37°C durante 20 minutos en baño termostatzado. Posteriormente se agrega la segunda enzima, la Proteinasa k (2,5  $\mu$ l, en concentración 20 mg/ml), y se incuba también durante 20 minutos a 37°C en baño termostatzado. La Proteinasa k será la encargada de romper las proteínas para que luego puedan se precipitadas.



Figura 5. Centrifuga laboratorio MECESUP, Chile.

Una vez se ha incubado la muestra con las dos enzimas, se procede a utilizar el *Power Soil DNA Isolation kit* (MO-BIO Laboratories, Inc.). El kit de aislamiento se compone de un método nuevo para el aislamiento de ADN genómico a partir de muestras ambientales. Posee un alto nivel de pureza que permite un mayor éxito a la hora de la amplificación por PCR de los organismos de la muestra. Los pasos a seguir para la utilización de este kit, y por lo tanto para lograr la extracción correcta del ADN de la muestra, son los siguientes:

- 1) Se toman tantos tubos con granos de cerámica como muestras se van a analizar y se añaden 60  $\mu$ l de la solución C1 junto con todo el volumen de la muestra. Se agitan durante 10 minutos en agitador a alta velocidad y transcurrido ese tiempo se centrifugan los tubos a 10.000 x g durante 1 minuto.  
La solución C1 contiene SDS y otros agentes de ruptura requeridos para la lisis celular. El SDS es un detergente aniónico que descompone los ácidos grasos y lípidos asociados con la membrana celular de varios organismos.

- 2) Se toman 750  $\mu\text{l}$  del sobrenadante y se añaden a un tubo de 2 ml (contenidos en el kit) junto con 270  $\mu\text{l}$  de la solución C2. Se vortexea el tubo para homogeneizar y se incuba a 4°C durante 5 minutos. Por último se centrifuga a 10.000 x g durante 1 minuto.  
La solución C2 es una tecnología de eliminación de inhibidores patentada (*Inhibitor Removal Technology*, IRT) que contiene un reactivo para precipitar el material orgánico e inorgánico, incluyendo sustancias húmicas, restos de células y proteínas.
- 3) Del sobrenadante se toman 800  $\mu\text{l}$  y se añaden junto con 230  $\mu\text{l}$  de la solución C3 a un tubo de 2 ml. Se agita suavemente con la mano, se incuba a 4°C durante 5 minutos y se centrifuga a 10.000 x g durante 1 minuto.  
La solución C3 es también una tecnología de eliminación de inhibidores patentada (*Inhibitor Removal Technology*, IRT) y es un segundo reactivo para precipitar el material orgánico e inorgánico adicional, incluyendo ácidos húmicos, restos de células y proteínas. Es importante eliminar la contaminación de materia orgánica e inorgánica ya que pueden reducir la pureza del ADN.
- 4) Se agregan 1200  $\mu\text{l}$  de la solución C4, previamente agitada, a un tubo de 2 ml, junto con 750  $\mu\text{l}$  del sobrenadante del anterior paso. Se agita el tubo suavemente con la mano hasta hacer desaparecer las dos fases existentes.  
C4 es una solución de sal de alta concentración. Dado que el ADN se une fuertemente a la sílice a altas concentraciones de sal, esto ajustará las concentraciones de la solución de sal y ADN para permitir la unión del ADN, pero no del material orgánico e inorgánico que todavía pudiera estar presente ya a niveles muy bajos, a los filtros de centrifugado.
- 5) Tomando los tubos de 2 ml, que contienen los filtros de espín, se van introduciendo 675  $\mu\text{l}$  de la solución del paso anterior, se centrifugan a 10.000 x g durante 1 minuto, se saca el filtro y se tira el líquido que queda en el fondo del tubo. Esta operación se repite hasta hacer pasar todo el volumen contenido en el tubo de 2ml del paso anterior.  
El ADN se une selectivamente a la membrana de sílice en el dispositivo de filtro de centrifugado en la solución de alta concentración de sal. Los contaminantes pasan a través de la membrana de filtro, dejando exclusivamente el ADN unido a la membrana.
- 6) Se agregan a los tubos con filtro anteriores 500  $\mu\text{l}$  de la solución C5, se centrifuga otra vez a 10.000 x g durante 1 minuto, y vuelvo a descartar el líquido que queda en el fondo del tubo.  
La Solución C5 es una solución de lavado a base de etanol, que se utiliza para limpiar aún más el ADN que está unido a la membrana del filtro de sílice en el filtro de centrifugado. Esta solución de lavado elimina la sal residual, el ácido

húmico y otros contaminantes al mismo tiempo que permite al ADN permanecer unido a la membrana de sílice.

- 7) Por último se centrifugan los filtros con las tapas de los tubos abiertas a 10.000 x g durante 1 minuto, con lo que se consigue retirar el contenido residual de la solución C5 que hubiera quedado, ya que el etanol puede interferir en procesos posteriores como PCR, RFLP y electroforesis.
- 8) Se traspasa con cuidado el filtro a un nuevo tubo de 2 ml y se agregan 80 µl de la solución C6 y se centrifuga por última vez a 10.000 x g durante 1 minuto. C6 es un tampón de elución estéril, a medida que pasa a través de la membrana de sílice, el ADN que se une a ella en presencia de alta concentración de sal, selectivamente se libera de la membrana gracias a que la solución C6 carece de sal.
- 9) Como último paso se tira el filtro y el ADN contenido en el tubo se conserva a una temperatura que puede ir de los -20 hasta los -80°C.

### 3.5.2 Reacción en cadena de la polimerasa, PCR

La PCR o reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*), es un procedimiento que permite la amplificación seleccionada de una secuencia de ADN. La amplificación por PCR posibilita la detección específica de secuencias de ADN, haciendo posible la identificación de microorganismos contaminantes. La amplificación se alcanza mediante un proceso cíclico, de entre 25 y 40 ciclos. Cada ciclo consta de tres fases:

- Desnaturalización: consiste en la elevación de la temperatura dentro del tubo de reacción, hasta los 95° C. Como consecuencia de dicho calentamiento se produce la desnaturalización o separación de la doble hélice de ADN ya que se rompen los puentes de hidrógeno que las unían, de esta forma cada cadena queda como molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria de ADN.
- Alineamiento: se alinean los iniciadores a sitios específicos complementarios de las cadenas sencillas de la región que se va a amplificar, para lograrlo se baja la temperatura entre los 40 y los 60 °C lo que va a permitir la unión o alineamiento de los iniciadores.
- Elongación: La enzima Taq polimerasa se usa para replicar el segmento de ADN. Se sintetiza una nueva cadena en sentido 5' a 3' para lo cual se incrementa la temperatura, por lo general llegando a los 72 °C, ya que es la temperatura óptima a la cual la ADN polimerasa se une a los iniciadores dando comienzo a la replicación.

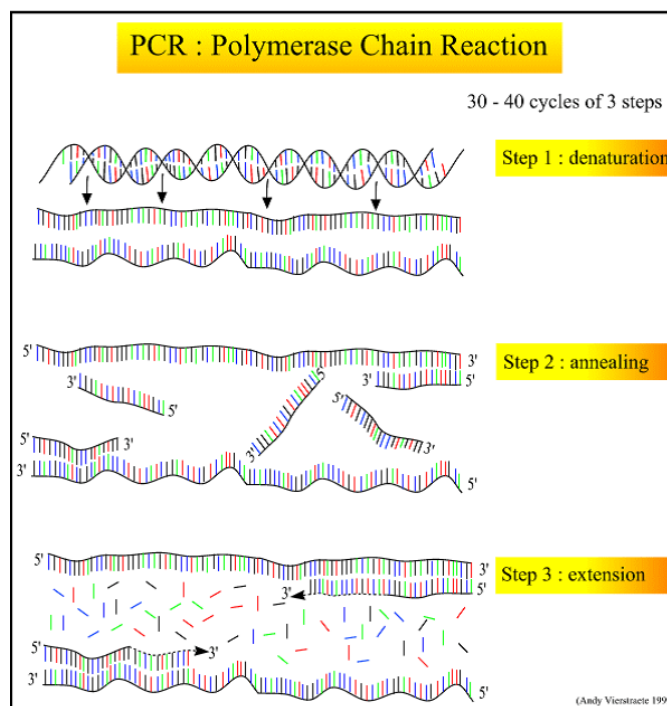


Figura 6. Descripción gráfica PCR.<sup>9</sup>

Estas tres fases constituyen un ciclo y dan como resultado la copia de una porción de la molécula de ADN de doble cadena para producir dos cadenas ADN hijas, transcurridos dos ciclos se dará lugar a 4 copias, y así sucesivamente, dando lugar a un aumento exponencial en el número de copias obtenidas.

Para realizar la PCR primero se realiza un “mix de PCR” para todas las muestras de ADN a amplificar, debido a que los volúmenes si se va haciendo de muestra en muestra son tan pequeños que se incurriría en demasiado error. Para ello primero se ha de calcular cuántas muestras hay que analizar, y a ellas sumarles dos negativos, para comprobar que el mix no está contaminado, y uno o varios positivo con los que se quiere comparar las muestras, y que verifican que el mix preparado funciona.

Por cada muestra a amplificar el mix va a contener:

- Agua libre de nucleasas: 18,5  $\mu$ l
- $MgCl_2$ : 2,4  $\mu$ l
- Nucleótidos: 1,2  $\mu$ l
- ITS 1: 0,3  $\mu$ l
- ITS 4: 0,4  $\mu$ l
- Enzima Gotaq: 0,3  $\mu$ l
- Tampón de enzima: 6  $\mu$ l

Una vez hecho el mix se procede a añadir en tubos de 0,2 ml, 29  $\mu$ l de mix junto con 1  $\mu$ l del ADN a amplificar, en el caso de los negativos no se añade este último  $\mu$ l.

<sup>9</sup> Fuente: Imagen adaptada de la original: Andy Vierstraete 1999.

Los partidores utilizados son el ITS1 y el ITS4, ambos espaciadores transcritos internos, son secuencias específicas complementarias que se añaden a la reacción y que amplifican de una forma selectiva una secuencia de ADN. La enzima utilizada es la Taq ADN polimerasa.

### 3.5.2.1 PCR en la región 5.8S-ITS del ADN

Para la identificación de levaduras mediante la técnica de PCR, se ha utilizado el análisis del gen 5.8S rRNA y sus regiones espaciadoras transcritas internas, comúnmente se conoce como 5.8S-ITS (Esteve-Zarzoso et al., 1999). La amplificación de este fragmento permite identificar diferentes especies de levaduras. Las secuencias de los partidores son:

- ITS1: 5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
- ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

Los tubos que contienen el mix junto con el ADN de las muestras se llevan a un termociclador (EscoSwift Max Pro), donde se seleccionan las condiciones de PCR óptimas. Para el caso de estudio se han realizado 30 ciclos, cada uno de los cuales consta de: una desnaturalización inicial durante 5 minutos a 94°C, seguido de una desnaturalización de 30 segundos a 94 °C, después alineamiento durante 30 segundos a 55°C, extensión durante 1 minuto a 72 °C y por último una extensión final de 10 minutos a 72 °C.

Para observar los amplificados se utilizan geles de poliacrilamida o agarosa, mediante la técnica de electroforesis, que se explica más adelante en el punto 3.5.4.



Figura 7. Termociclador ESCO laboratorio MECESUP, Chile.

### 3.5.3 Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción, RFLP

Otra de las técnicas moleculares utilizadas para la identificación de microorganismos es la determinación del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP). Esta técnica consiste en la diferenciación de los microorganismos mediante el análisis de los patrones de ruptura generados en un lugar específico del genoma del organismo, cuando es cortado mediante las endonucleasas o enzimas de restricción. Los fragmentos polimórficos que aparecen son debidos a que los organismos de diferentes especies, e incluso de distintas cepas, difieren en la distancia de los sitios de clivaje para cada enzima de restricción (Ratón, 2004). Posteriormente son comparados en geles de agarosa o poli(acrilamida) por medio de electroforesis.

Se parte de los amplificadores de ADN obtenidos mediante la PCR para realizar las digestiones (RFLP). Existe una gran variedad de endonucleasas, o enzimas de restricción que se pueden emplear, cada una de ellas con una temperatura óptima de acción. Las enzimas de restricción son proteínas que cortan en secuencias específicas el ADN, dando lugar a fragmentos de diferentes tamaños que son los que permiten diferenciar unas levaduras de otras. Estos cortes que realizan al ADN los hacen de una forma específica, cada enzima es capaz de reconocer una secuencia particular de nucleótidos, denominada “diana de restricción”. Una vez reconocida esa secuencia se posiciona sobre el ADN y lo corta dentro o en torno a esa secuencia. Según realizan ese corte las enzimas se clasifican en:

- Enzimas que generan extremos romos o parejos
- Enzima que generan extremos cohesivos o desaparejos

Las enzimas de restricción reconocen secuencias de 4, 6 o más bases y se encuentran sólo en organismos procariotas, bacterias. La función natural de estas enzimas en las bacterias consiste en protegerlas contra virus, de esta forma la bacteria utiliza las enzimas para cortar el ADN viral. Su nomenclatura está asociada al organismo del que provienen, por ejemplo las enzimas de restricción que provienen de la bacteria *Escherichia coli* se denominan *Eco* (la diana de restricción para *EcoRI* es la secuencia GAATTC, como muestra la Figura 8).

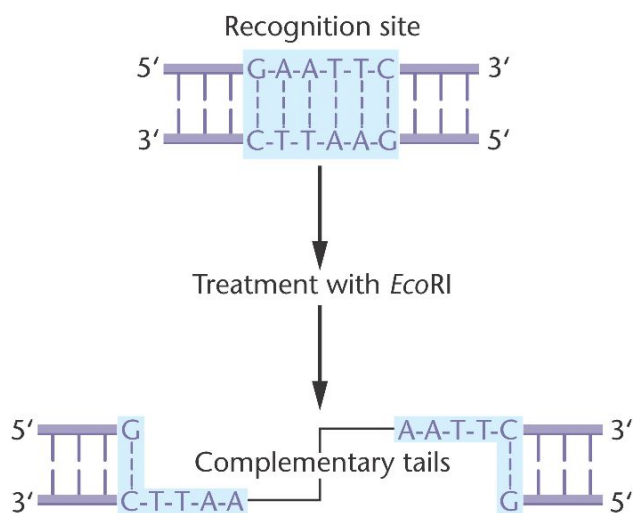


Figura 8. Funcionamiento de las enzimas de restricción.<sup>10</sup>

### 3.5.3.1 Digestión (RFLP) de la región 5.8S-ITS del ADN

Para llevar a cabo este método se ha de preparar un “mix de RFLP”, ya que, como ocurría con la PCR, los volúmenes a tomar para una sola muestra son muy pequeños. Este mix va a contener, para cada muestra a digerir:

- Agua libre de nucleasas
- Tampón 10x de enzima (Hinf I)
- Enzima Hinf I

Los volúmenes tanto del agua como del amplificado son variables, dependiendo de la calidad del amplificado obtenido al realizar la PCR. Por un lado si se han obtenido bandas muy gruesas en el gel de la PCR, se tomarán de 1 a 2  $\mu\text{l}$  del amplificado, en caso contrario se tomarán de 4 a 5  $\mu\text{l}$ . Se parte de que el volumen total para la digestión (RFLP) va a ser de 10  $\mu\text{l}$ , por lo tanto el volumen de agua será el que se irá modificando según la cantidad de amplificado que se añada. De enzima se utilizan 0,1  $\mu\text{l}$  por muestra y de tampón de enzima 1  $\mu\text{l}$ . Una vez se tiene hecho el mix, se introducen en tubos de 0,2  $\mu\text{l}$ , el volumen de cada amplificado junto con el volumen de mix necesario, que serán 10  $\mu\text{l}$  menos los  $\mu\text{l}$  de amplificado que se hayan introducido. Con los tubos ya preparados se llevan al termociclador donde se lleva a cabo la digestión a la temperatura de 37°C, la óptima para la enzima de restricción utilizada (Hinf I).

El tiempo de digestión para que actúe la enzima es de dos horas y veinticinco minutos, una vez transcurrido ese tiempo es necesario inactivar la enzima, lo cual se puede hacer mediante la adición de Proteinasa k, o mediante un golpe de calor. Posteriormente, los productos de la

<sup>10</sup> Fuente: <http://bio3400.nicerweb.com/Locked/media/ch19/EcoRI.html>.

digestión se observa por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida, obteniendo los cortes que ha realizado la enzima a cada amplificado de ADN. Esos cortes son específicos de cada microorganismo y permiten diferenciar qué levaduras son las presentes en cada muestra de ADN que se ha estudiado.

### 3.5.4 Electroforesis

La electroforesis es un método analítico con el que se logran separar biomoléculas según su tamaño y carga eléctrica a través de una matriz gelatinosa, todo bajo la acción de un campo eléctrico.

Se fundamenta en la migración que sufren los solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico, migrando hacia el ánodo (polo positivo) o hacia el cátodo (polo negativo) dependiendo de su carga, peso molecular y estructura tridimensional. La velocidad de migración que sufre cada partícula depende de la densidad de carga de la molécula, del voltaje aplicado y de la porosidad del gel utilizado. Se puede calcular ya que es directamente proporcional al producto del gradiente de potencial ( $E$ ) y de su carga efectiva ( $q$ ), e inversamente proporcional al coeficiente de fricción o resistencia que ofrece al medio ( $f$ ).

$$V = \frac{q \times E}{f}$$

Además de la fricción con el solvente que dificultará el movimiento originando una fuerza que se opone, las moléculas tienden a moverse de una manera aleatoria o movimiento browniano debido a que poseen energía cinética propia, lo que se denomina como difusión. La energía cinética que poseen las moléculas tiende a aumentar a medida que aumenta la temperatura, por ello la difusión aumenta con la temperatura. La suma de todas esas fuerzas provoca que las moléculas no consigan migrar de una forma homogénea, por lo que estando las moléculas en un cierto lugar de una solución, ocurre que los iones comienzan a moverse de tal forma que acaban formando un frente cuya anchura aumenta con el tiempo. Con el fin de reducir la anchura de dicho frente, se ha de reducir el movimiento de las moléculas empleando un medio que oponga resistencia a ese movimiento en concreto. Esto se logra por medio de geles, polímeros solubles de muy alto peso molecular que consiguen atrapar moléculas de agua formando un tamiz que dificulta el movimiento de los solutos, por lo que la migración de las moléculas será más lenta.

Entre los geles más comúnmente utilizados en electroforesis se encuentran el de agarosa y el de poliacrilamida. Los geles de poliacrilamida se forman debido a la polimerización vinílica del monómero acrilamida y del monómero entrecruzador  $N,N'$ -metilen-bis-acrilamida, utilizando como catalizador aminas terciarias como el TEMED ( $N,N,N,N'$ -tetrametilen-diamina).

### 3.5.4.1 Método electroforético zonal en gel de poliacrilamida

Es uno de los métodos más comunes, ya que es útil para lograr la separación de mezclas complejas. Consiste en aplicar pequeñas cantidades de la disolución de proteínas a un gel, que se impregna con una solución tampón. Es un método con alto poder resolutivo, ya que se aplica una pequeña cantidad de proteína a una zona estrecha, mientras que la longitud del trayecto que va a recorrer es mucho mayor que la zona donde se ha aplicado.

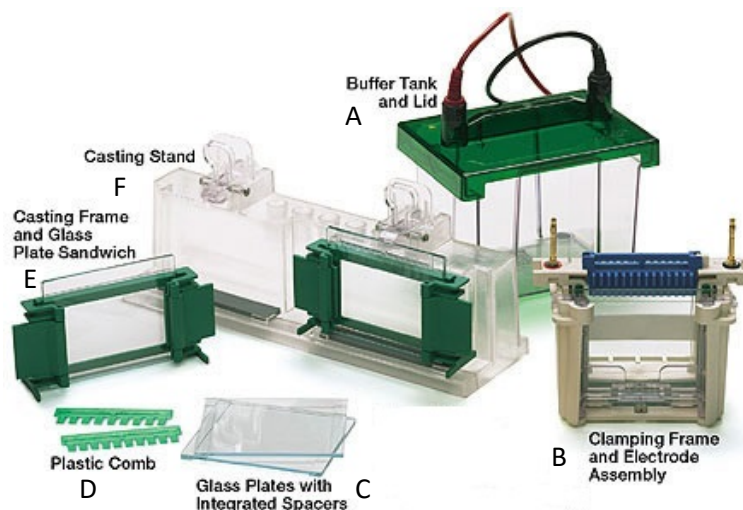


Figura 9. Equipo de electroforesis bidimensional.<sup>11</sup>

El equipo necesario para llevar a cabo este método junto con una fuente de alimentación, es el observado en la Figura 9: Cubeta o tanque vertical con tapa (A) donde se coloca el marco de sujeción y de electrodos (B), placas de vidrio con espaciadores integrados (C), peinetas de plástico (D), marcos de gelificación (E) y soporte de gelificación (F).

Los geles de poliacrilamida son químicamente inertes y de propiedades uniformes. Su principal ventaja reside en que son fácilmente reproducibles y se preparan rápidamente. Los geles formados son transparentes, insolubles en agua y permiten obtener una buena visibilidad de las bandas obtenidas. Para hacer el gel primero se han de sujetar los vidrios al soporte de plástico, y éste a su vez al pie que lo sostiene. En un tubo se añaden:

- Agua destilada: 3,25 ml
- TBE 5x: 2,5 ml
- Solución de acrilamida: 6,6 ml
- APS al 25%: 65  $\mu$ l
- TEMED: 12,5  $\mu$ l

<sup>11</sup> Fuente: Imagen adaptada de Apuntes científicos 2011-2012.  
<http://apuntescientificos.org/electroforesis.html>.

Una vez estén todos los reactivos, se homogeneiza la solución agitandola suavemente con la mano y se vierte entre los dos vidrios con cuidado de que no se formen burbujas de aire, justo después se pone la peineta en la parte superior de los vidrios, para que al gelificar queden formados los pocillos, es fundamental que los vidrios estén extremadamente limpios. Se deja gelificar durante 10 minutos tras los cuales los vidrios, que contienen entre medias el gel, se separan tanto del soporte como del marco de gelificación y suavemente se retira la peineta, lavando cuidadosamente con agua destilada los pocillos formados para que queden limpios. A continuación se coloca el gel en el marco de sujeción, y éste en el tanque llenandolo con TBE 1x, tampón de corrida, y se procede a llenar los pocillos con las muestras ya sean amplificadas (PCR) o amplificadas digeridos (RFLP). Para que las muestras queden impregnadas en los pocillos se añaden junto con azul de bromofenol-formamida, mediante una micropipeta como se ve en la Figura 10. Hay que tener especial cuidado de que las muestras no pasen de un pocillo al de al lado. En el primer pocillo se añade un ADN estándar con un rango de tamaño de 100-1500pb (100pb ladder), para que las muestras a analizar se comparen con él. Para controlar el avance del frente de electroforesis se añade a la muestra un colorante marcador como el azul de bromofenol, molécula cargada y de pequeño tamaño que avanza más que cualquier componente de la muestra.



Figura 10. Llenado de los pocillos del gel de poliacrilamida.<sup>12</sup>

Una vez llenos los pocillos con las muestras se procede a conectar los electrodos a la fuente de alimentación y a correr el gel. El tiempo de corrida del gel ha de ser escogido con mucho cuidado ya que corridas muy cortas impiden el avance de las muestras pero a la vez minimizan la dispersión y el ensanchamiento de las bandas. Para la electroforesis de las amplificaciones de una PCR el tiempo de corrida es de 20 minutos a 200 Voltios. Para los resultados del RFLP el tiempo es de 45 minutos a 150 Voltios.

<sup>12</sup> Fuente: Biomodel, Electroforesis de proteínas y de ácidos nucleicos.  
<http://biomodel.uah.es/tecnicas/elfo/inicio.htm>

Finalizada la corrida de los geles, se procede a revelarlos ya que no es posible apreciar a simple vista los resultados obtenidos para el caso de levaduras de fermentación. Para ello se puede revelar sumergiéndolo en una solución de bromuro, en agitación durante 10 minutos y posteriormente bajo luz ultravioleta observar los resultados. La otra opción es un revelado con plata, que se lleva a cabo mediante de la preparación de tres soluciones, en las que se va sumergiendo el gel respectivamente:

- Solución Fijadora
  - ✓ Agua destilada: 45 ml
  - ✓ Etanol- ácido acético 10x: 5 ml
- Solución de Plata 1x
  - ✓ Agua destilada: 50 ml
  - ✓ AgNO<sub>3</sub> 100x: 500 µl
- Solución Reveladora
  - ✓ Agua destilada: 30 ml
  - ✓ Hidróxido de sodio 7,5%: 20 ml
  - ✓ Formaldehído 37%: 500 µl

Primero el gel se sumerge en la solución fijadora y se introduce en un microondas durante 10 segundos, a continuación se recupera esa solución, para usarla de nuevo más tarde. El gel se sumerge en la solución de plata y se tiene por 10 segundos en el microondas, tras los cuales se tira la solución de plata. Para retirar los restos de plata del gel se realizarán dos lavados sucesivos con agua destilada durante 15 segundos, tras ello se sumerge el gel en la solución reveladora y se tiene por 20 segundos en el microondas. Al sacar el gel con la solución del microondas se deja reposar durante 1 minuto, y se lava el gel con agua destilada otros 15 segundos. Finalmente se vuelve a sumergir en la solución reveladora que va a fijar el revelado y se pueden ya apreciar los resultados obtenidos.

# **Capítulo 4.**

# **RESULTADOS Y**

# **DISCUSIÓN**



## 4.1 CONDICIONES INICIALES DEL MOSTO

El mosto utilizado para las fermentaciones es un mosto Sauvignon Blanc procedente del Valle de Limari. Antes de comenzar con las inoculaciones, es necesario medir las condiciones iniciales que presenta el mosto de trabajo.

Para la medida del pH se utiliza un pH-metro, obteniendo un valor de pH igual a 3 para el mosto. Este dato entra dentro del rango normal de pH de un mosto que está entre 2,75 y 4,2.

Mediante un refractómetro se obtiene la concentración inicial de azúcares. Se midieron 20,2 °Brix, que corresponden a 202 g de azúcar/litro de mosto. Generalmente se tiene un contenido un poco más alto, 230-240 g/l, por lo que el porcentaje volumétrico de etanol obtenido no llegará al 13%.

Teniendo el contenido de azúcares iniciales se puede obtener el grado alcohólico probable, que junto con otros factores, nos dará una idea de cuando la fermentación está legando a su fin.

$$GAP = \frac{202 \text{ g/l}}{17} = 11,88$$

A continuación se procede a hacer las mediciones tanto de acidez total como de sulfuroso, libre y total. Los resultados se presentan en las Tablas 8 y 9:

ACIDEZ TOTAL	ml NaOH	g Sulfúrico/l	g Ác. Tartárico/l	Media g Ác. Tartárico/l
Muestra	3,3	3,234	4,94802	<b>5,47281</b>
Réplica	4	3,92	5,9976	

Tabla 8. Resultados acidez total.

SULFUROSO	ml Yodo	mg/l SO <sub>2</sub> libre	mg/l SO <sub>2</sub> total	Media SO <sub>2</sub> libre	Media SO <sub>2</sub> total
Muestra	1,2	30,72	92,16	<b>30,08</b>	<b>90,24</b>
Réplica	1,15	29,44	88,32		

Tabla 9. Resultados sulfuroso total y libre.

Una vez obtenidas las condiciones iniciales que presenta el mosto de trabajo, se procede a realizar las primeras inoculaciones. En la Tabla 10 se observan las concentraciones de cada levadura para cada uno de los tratamientos de fermentación a realizar:

Tratamiento	1			2			3			4		
	1.1	1.2	1.3	2.1	2.2	2.3	3.1	3.2	3.3	4.1	4.2	4.3
<b>Nativa 1, PNLI29</b>	10 <sup>8</sup> células/ml			-			-			-		
<b>Nativa 2, SB1MP3</b>	-			10 <sup>8</sup> células/ml			-			-		
<i>Torulaspora</i>	-			-			25 g/hl			-		
<i>Saccharomyces</i>	-			-			-			20 g/hl		

Tabla 10. Concentraciones de cada levadura para cada uno de los tratamientos de fermentación.

Una vez transcurridas 48 horas después de esta inoculación se vuelven a inocular los tratamientos, excepto los que ya contenían la levadura *Saccharomyces*, con 20 g/hl de levadura *Saccharomyces* y se continúa la fermentación.

## 4.2 SEGUIMIENTO DE ETANOL

Para llevar a cabo el seguimiento del contenido de etanol del mosto, se tomaron muestras para analizarlas los días 1, 2, 3, 6 y 8 de la fermentación que corresponden a:

- Día 1: 24 horas desde el inicio de la fermentación
- Día 2: 48 horas desde el inicio de la fermentación
- Día 3: 24 horas después de la co-inoculación con *Saccharomyces* y tercer día de fermentación
- Día 6: sexto día de fermentación
- Día 8: último día de fermentación

De todas estas muestras se hace el seguimiento de etanol mediante el kit de etanol, (Boehringer Mannheim / R-Biopharm). Los resultados obtenidos se presentan como porcentajes volumétricos de etanol.

Para el primer tratamiento, que contiene la co-inoculación de la levadura nativa 1 con la *Saccharomyces*, se obtienen los resultados que se presentan en la Figura 11.

### Nativa 1 + *Saccharomyces*

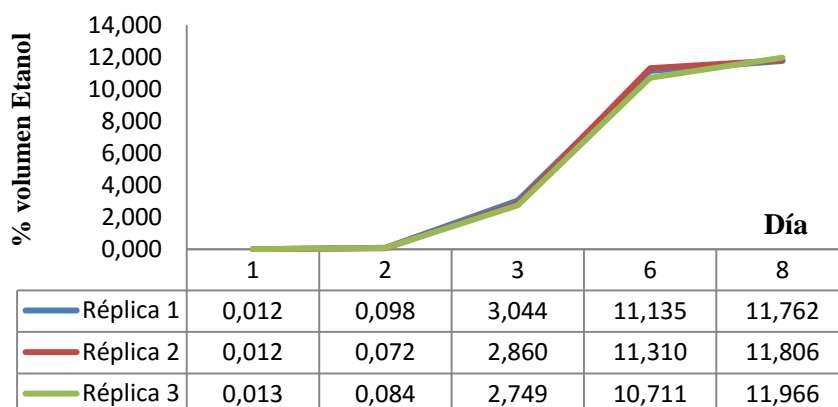


Figura 11. Porcentaje de etanol obtenido en los días 1, 2, 3, 6 y 8 con co-inoculación de levadura nativa 1 y *Saccharomyces cerevisiae*.

A la vista de la figura las tres réplicas se comportan de una forma similar, alcanzando valores finales de etanol muy similares, y que se aproximan al valor del GAP calculado inicialmente. Se observa que los dos primeros días de fermentación, que son en los que solo está presente la levadura nativa, la producción de etanol es muy baja, y no es hasta que se inocula la *Saccharomyces* que se aprecia un aumento considerable en la producción de etanol.

En cuanto a los resultados que presenta el tratamiento de la levadura nativa 2 con la *Saccharomyces* se obtiene la Figura 12.

### Nativa 2 + *Saccharomyces*

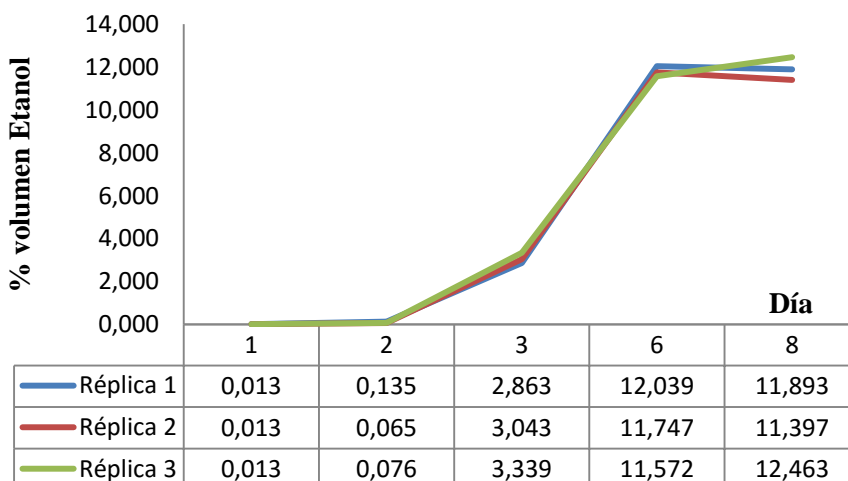


Figura 12. Porcentaje de etanol obtenido en los días 1, 2, 3, 6 y 8 con co-inoculación de levadura nativa 2 y *Saccharomyces cerevisiae*.

En este segundo caso, los porcentajes de etanol finales difieren un poco entre las tres réplicas. La réplica número 2 queda por debajo del GAP, mientras que la réplica 3 lo supera. Como ocurre con el tratamiento de la levadura nativa 1, no es hasta que se inocula la levadura *Saccharomyces* que se observa un aumento considerable en la producción de etanol.

El tercer tratamiento es el primero de los controles de la fermentación alcohólica. Con este control se han de comparar los dos tratamientos anteriores, ya que se tiene comprobado que la *Torulaspota* es capaz de realizar la primera fase de la fermentación alcohólica.

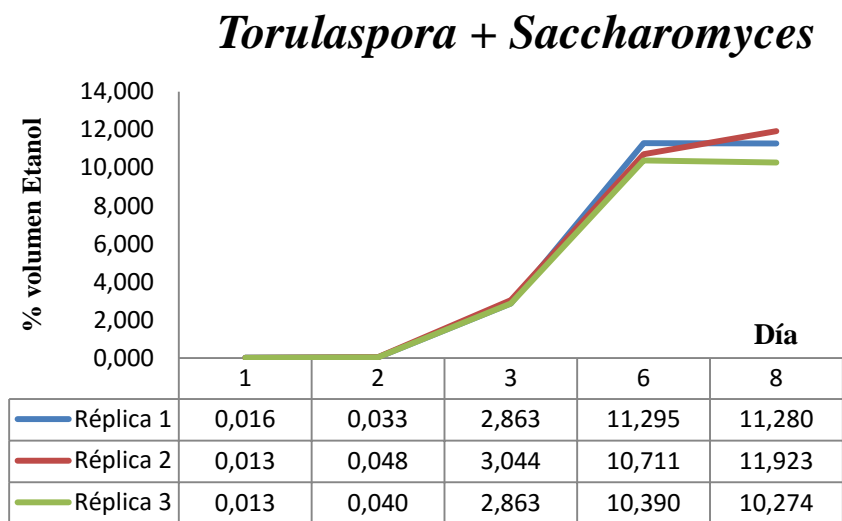


Figura 13. Porcentaje de etanol obtenido en los días 1, 2, 3, 6 y 8 con co-inoculación de levadura *Torulaspota delbrueckii* y *Saccharomyces cerevisiae*.

Por un lado la réplica 3 llega a obtener un porcentaje de etanol bajo con respecto a las otras dos réplicas y con respecto al GAP, esto puede deberse a que todavía se podría haber alargado la fermentación un tiempo más hasta alcanzar mayor concentración de etanol, hecho que se podrá contrastar viendo la población de levaduras.

Por otro lado, los valores de etanol de los días 1 y 2 de la fermentación son similares a los obtenidos tanto para la nativa 1 como para la nativa 2, lo que indica que tienen un comportamiento parecido, al ser todas levaduras no-*Saccharomyces*.

Para tener una mayor certeza de que el curso de la fermentación es correcto, se hace un segundo control. Este control consiste en una fermentación llevada a cabo solo por la levadura *Saccharomyces*, y los datos recogidos han sido los siguientes:

### Saccharomyces

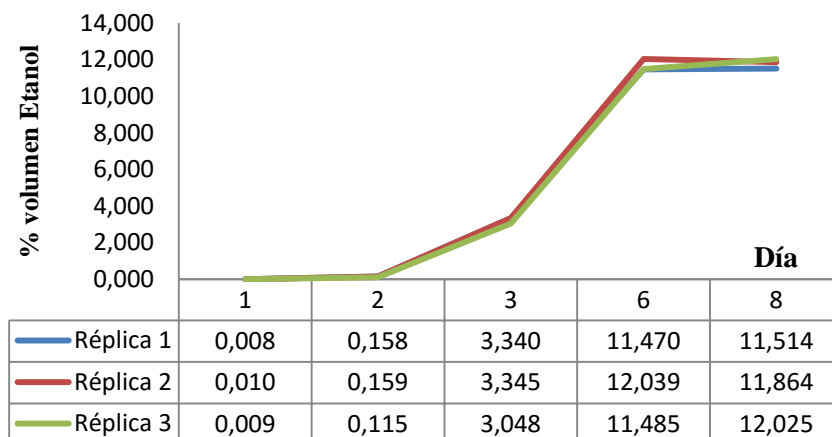


Figura 14. Porcentaje de etanol obtenido en los días 1, 2, 3, 6 y 8 con *Saccharomyces cerevisiae*.

Cabe destacar que las mediciones de absorbancia obtenidas tienen asociado un error, esto es debido a que el espectrofotómetro era muy antiguo y los valores variaban mucho, teniendo que hacer una media de entre todos los valores que aparecían para una sola medición. Es por ello que en algunos resultados se aprecia que para el día 6 de fermentación se tiene un mayor grado alcohólico que en el día 8.

Para hacer una mejor comparativa de los resultados, se ha hecho una media de las tres réplicas de cada tratamiento, y los cuatro tratamientos han sido graficados conjuntamente.

### Comparación tratamientos

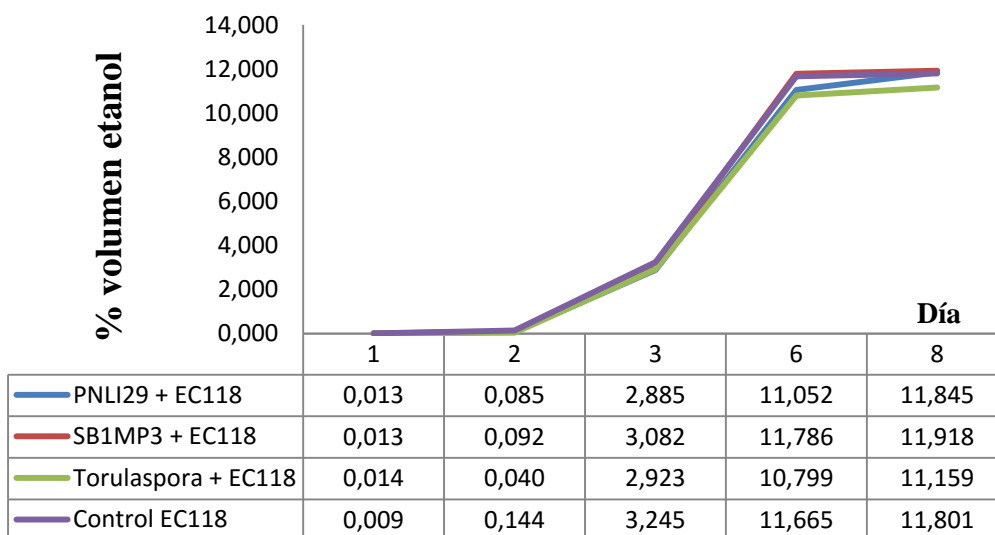


Figura 15. Comparación del porcentaje de etanol obtenido para cada día de los cuatro tratamientos realizados.

Haciendo un análisis de esta comparación se aprecia que para el primer día de fermentación, las levaduras no-*Saccharomyces* consiguen producir una mayor cantidad de etanol que la *Saccharomyces*. Por otro lado las levaduras nativas han conseguido duplicar la producción de

etanol que presenta la levadura no-*Saccharomyces* de control, la *Torulaspota*, en el segundo día de fermentación. En conjunto las fermentaciones han seguido una trayectoria similar con respecto a la producción de etanol.

Con todo ello podemos afirmar, a falta de confirmar mediante técnicas de caracterización de microorganismos, que las levaduras nativas objeto de estudio han sido capaces de llevar a cabo la primera fase de fermentación alcohólica y que la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (EC118) ha sido la encargada de llevar a término dichas fermentaciones.

### 4.3 SEGUIMIENTO DE LA POBLACIÓN DE LEVADURAS

Otra de las técnicas que se han llevado a cabo para observar el transcurso de las fermentaciones ha sido el seguimiento de la población de levaduras al microscopio, con la ayuda de la cámara de Neubauer.

El seguimiento se ha realizado tanto a las células vivas como a las muertas, y por consiguiente también a las células totales. Todo ello mediante una tinción con violeta de cristal, para conseguir diferenciar las células viables de las no viables.

Las muestras analizadas corresponden a los días:

- Día 1: 24 horas desde el inicio de la fermentación
- Día 2: 48 horas desde el inicio de la fermentación
- Día 3: 24 horas después de la co-inoculación con *Saccharomyces* y tercer día de fermentación
- Día 6: sexto día de fermentación
- Día 8: último día de fermentación

Primero se representa la población de células totales de los cuatro tratamientos, siendo cada valor una media de las tres réplicas de cada uno de los tratamientos, Figura 16.

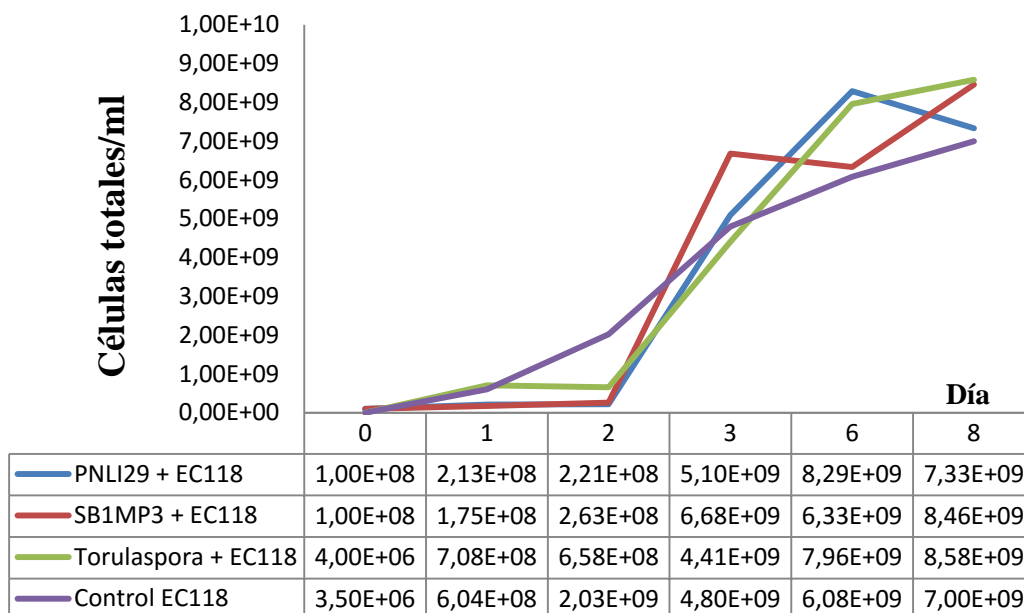


Figura 16. Número de células totales por mililitro para cada día de cada uno de los cuatro tratamientos realizados.

A la vista de la Figura 16, lo que obtenemos es un análisis de la población total de levaduras. Para el tratamiento 1 (levadura nativa 1 + *Saccharomyces*) hasta el día dos de fermentación no se observa como comienza la fase de crecimiento exponencial, que coincide con el momento en el que ese tratamiento es co-inoculado con *Saccharomyces*. Lo mismo ocurre con el tratamiento 2 (levadura nativa 2 + *Saccharomyces*), en los dos primeros días de fermentación la población total de levaduras es muy baja con respecto a los controles, tratamientos 3 y 4 (*Torulaspora* + *Saccharomyces* y *Saccharomyces* respectivamente). A pesar de ello es importante analizar tanto la población de células vivas como muertas ya que eso va a dar información de si las levaduras nativas de estudio han conseguido adaptarse bien al medio y reproducirse.

Los estudios de células viables y no viables se presentan en las Figuras 17 y 18.

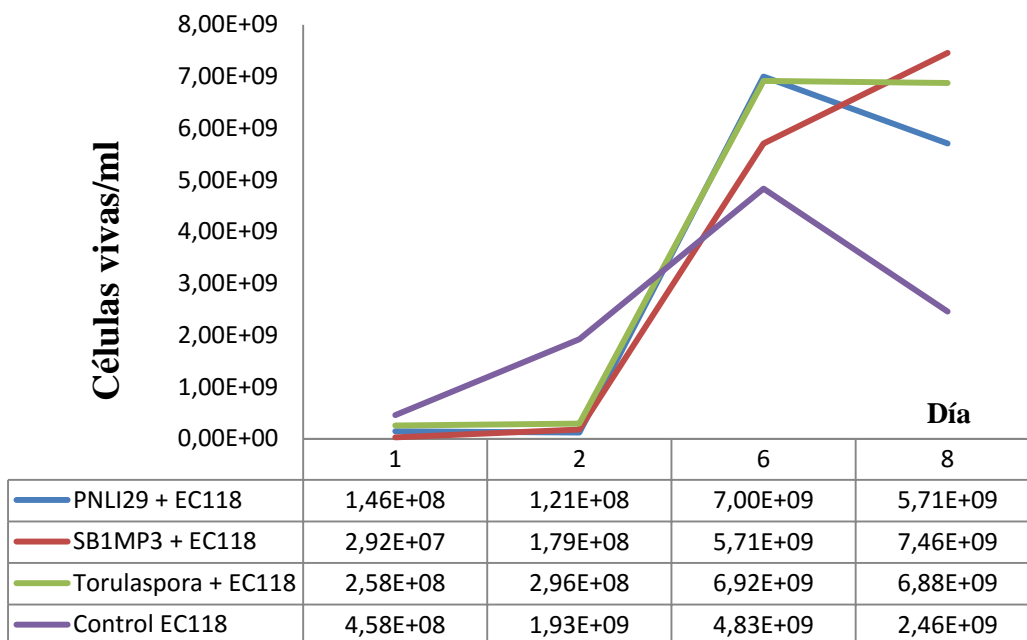


Figura 17. Número de células vivas por mililitro para cada día de cada uno de los cuatro tratamientos realizados.

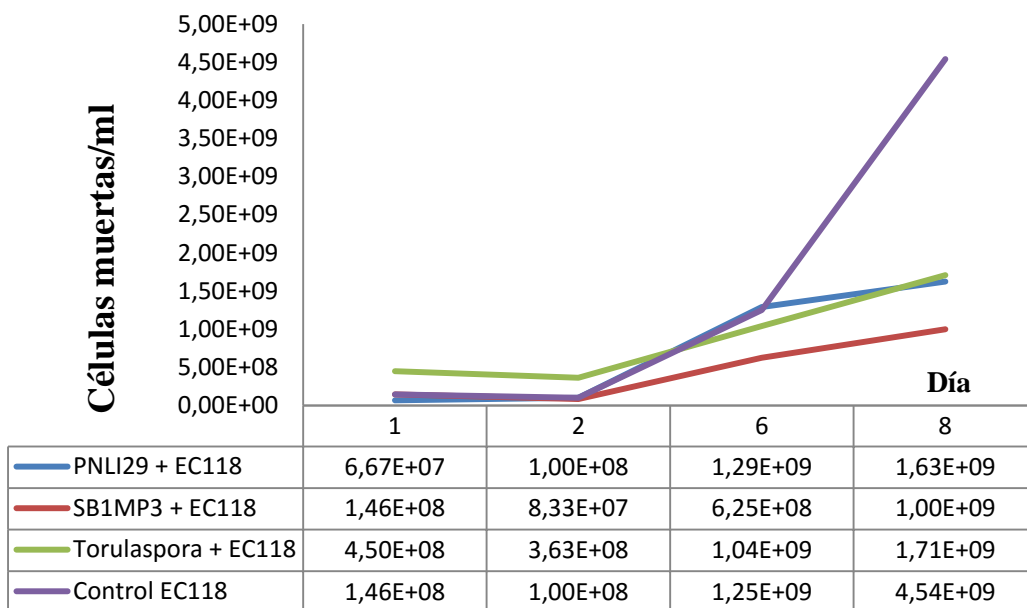


Figura 18. Número de células muertas por mililitro para cada día de cada uno de los cuatro tratamientos realizados.

Aquí comienzan a darse las grandes diferencias entre los tratamientos que contienen levaduras no-*Saccharomyces* y el control que no las contiene.

Con respecto a la población de células viables, partiendo de una concentración de  $10^8$  células/ml de levaduras nativas, estas se reproducen pero a una tasa muy baja en los dos primeros días de fermentación, cosa que ocurre también en el tratamiento con la *Torulaspora*. Como bien se ha dicho antes, no es hasta el tercer día de inoculación que comienza a verse un aumento exponencial del número de células vivas. En el caso del tratamiento 4 (*Saccharomyces*) el crecimiento exponencial comienza casi desde el primer día.

Al haber poca población viable durante los dos primeros días de fermentación en los tratamientos 1, 2 y 3, los nutrientes no se consumen a tanta velocidad como ocurre en el tratamiento 4 de control. Esta es la razón por la que comienza a aumentar exponencialmente la población de células muertas en el tratamiento 4, antes que en los otros tres. Por ello los tratamientos con las células nativas se comparan en este punto con el tratamiento de control número 3.

De este seguimiento de la población podemos concluir que la velocidad de crecimiento de las levaduras no-*Saccharomyces* es más lenta que la de las *Saccharomyces*. A pesar de ello las levaduras nativas observadas siguen aproximadamente el mismo patrón que la *Torulaspora* comercial, por lo que se puede afirmar, en conjunto con los resultados obtenidos para el seguimiento de etanol, que las levaduras nativas han sido capaces de realizar una correcta fermentación alcohólica en su etapa más temprana, y que las co-inoculaciones han sido exitosas.

#### 4.4 CONDICIONES AL FINAL DE LA FERMENTACIÓN

Ya finalizadas las fermentaciones se ha de hacer un estudio de las condiciones finales que presenta el vino tanto de acidez total como de sulfuroso libre y total. Todo ello mediante las valoraciones pertinentes detalladas en el apartado 3.4 del presente proyecto.

##### 4.4.1 Acidez total al final de la fermentación

Mediante la realización de las valoraciones con NaOH a todas las fermentaciones realizadas se obtienen los siguientes datos de acidez total:

Tratamiento	ml NaOH	g Sulfúrico/l	g Ác.Tartárico/l	Media g Ác.Tartárico/l
Nativa 1+ <i>Sacch.</i>	5,0	4,900	7,497	
Nativa 1+ <i>Sacch.</i>	4,5	4,410	6,747	7,572
Nativa 1+ <i>Sacch.</i>	5,1	4,998	7,647	
Nativa 2+ <i>Sacch.</i>	5,0	4,900	7,497	
Nativa 2+ <i>Sacch.</i>	5,3	5,194	7,947	7,747
Nativa 2+ <i>Sacch.</i>	5,2	5,096	7,797	
<i>Torulaspora</i> + <i>Sacch.</i>	5,3	5,194	7,947	
<i>Torulaspora</i> + <i>Sacch.</i>	5,1	4,998	7,647	7,697
<i>Torulaspora</i> + <i>Sacch.</i>	5,0	4,900	7,497	
<i>Saccharomyces</i>	4,7	4,606	7,047	
<i>Saccharomyces</i>	4,9	4,802	7,347	7,247
<i>Saccharomyces</i>	4,9	4,802	7,347	

Tabla 11. Resultados de acidez total.

El dato resaltado en rojo es un dato dudoso, debido probablemente a algún error experimental en la realización de la valoración o en la manipulación de alguno de los reactivos, por ello al realizar la media es un dato que se rechaza.

Analizando los datos de acidez obtenidos, los tratamientos que contienen las levaduras no-*Saccharomyces* consiguen obtener un vino final con una mayor acidez. Se consigue llegar a un valor más alto con la levadura nativa 2 que con la nativa 1.

#### 4.4.2 Sulfuroso libre y total al final de la fermentación

Con una valoración con Yodo de los productos finales de fermentación se obtienen los datos de sulfuroso de la Tabla 12.

Tratamiento	ml Yodo	mg/l SO <sub>2</sub> libre	mg/l SO <sub>2</sub> total	media mg/l SO <sub>2</sub> libre	media mg/l SO <sub>2</sub> total
Nativa 1+ <i>Sacch.</i>	0,5	12,800	38,400		
Nativa 1+ <i>Sacch.</i>	0,4	10,240	30,720	<b>11,520</b>	<b>34,560</b>
Nativa 1+ <i>Sacch.</i>	0,7	17,920	53,760		
Nativa 2+ <i>Sacch.</i>	0,6	15,360	46,080		
Nativa 2+ <i>Sacch.</i>	0,6	15,360	46,080	<b>15,360</b>	<b>46,080</b>
Nativa 2+ <i>Sacch.</i>	0,6	15,360	46,080		
<i>Torulaspota</i> + <i>Sacch.</i>	0,7	17,920	53,760		
<i>Torulaspota</i> + <i>Sacch.</i>	0,5	12,80	38,400	<b>12,800</b>	<b>38,400</b>
<i>Torulaspota</i> + <i>Sacch.</i>	0,5	12,80	38,400		
<i>Saccharomyces</i>	0,6	15,360	46,080		
<i>Saccharomyces</i>	0,6	15,360	46,080	<b>15,360</b>	<b>46,080</b>
<i>Saccharomyces</i>	0,7	17,920	53,760		

Tabla 12. Resultados sulfuroso libre y total.

Los datos en rojo son valores discordantes que se rechazan a la hora de hacer las medias. Son debidos a errores experimentales durante la valoración ya que ésta se realizaba por medio de una jeringuilla y era necesario tener un buen pulso para que fuese cayendo gota a gota.

Los datos de sulfuroso libre están todos por encima de los 10 mg/l, se obtiene una mayor cantidad para la co-inoculación de la levadura nativa 2 y la menor cantidad va asociada al tratamiento con la levadura nativa 1.

## 4.5 ESTUDIO DE LAS MUESTRAS

Una vez llegados a este punto, resta cerciorarse de que han sido estas levaduras, las inoculadas, y no otras las que han realizado las fermentaciones, ya que podrían haber sido contaminados los tratamientos con otro microorganismo y los datos obtenidos no serían los derivados de una fermentación con los microorganismos seleccionados en un primer lugar. Para ello se llevará a cabo una caracterización de las levaduras presentes en las muestras de los días:

- Día 1: 24 horas desde el inicio de la fermentación
- Día 3: 24 horas después de la co-inoculación con *Saccharomyces* y tercer día de fermentación
- Día 6: sexto día de fermentación
- Día 8: último día de fermentación

Primero se realiza la extracción del ADN de todas las muestras mediante el kit de extracción Power Soil DNA Isolation (Mo-Bio Laboratories, Inc.), y el ADN extraído se conserva a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Posteriormente se realiza la PCR (amplificación) de todas las muestras de ADN extraído y se observan los resultados en un gel de poliacrilamida mediante electroforesis (200 Voltios, 20 minutos). Para todas las muestras en cada pocillo del gel de poliacrilamida se cargan  $4\ \mu\text{l}$  de amplificado junto con otros  $4\ \mu\text{l}$  de tampón de carga. Los tamaños de las bandas han sido estimados comparando la migración electroforética, con la migración de un ADN estándar con un rango de tamaño de 100 – 1500 pares de bases (100pb ladder).

Los geles se revelan con una solución de plata obteniendo los siguientes tamaños de bandas de los amplificados:

### Día 1 de fermentación

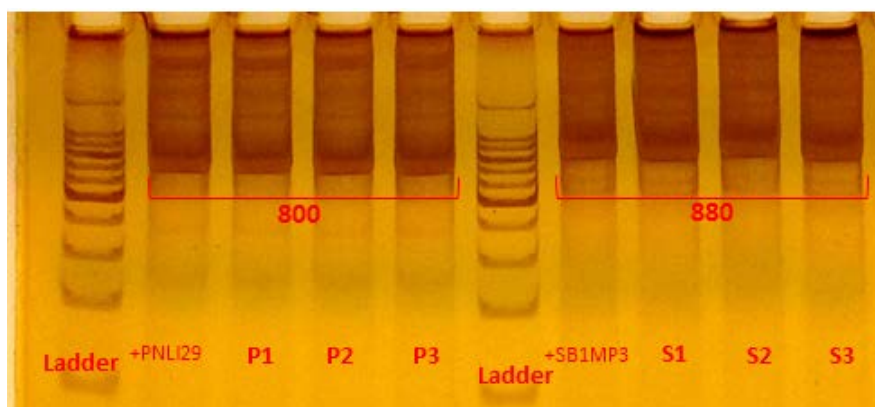


Figura 19. Resultados obtenidos en la extracción de ADN y posterior amplificación correspondiente a las muestras de los tratamientos que contienen las levaduras nativas recogidas el primer día de fermentación, sobre un gel de poliacrilamida.

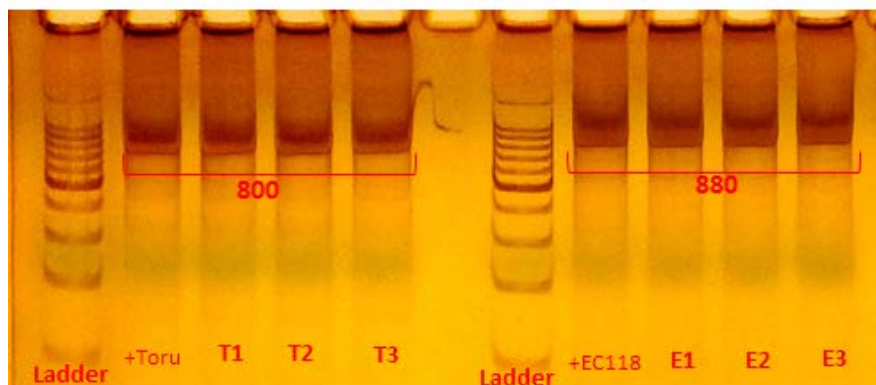


Figura 20. Resultados obtenidos en la extracción de ADN y posterior amplificación correspondiente a las muestras de los tratamientos que contienen los controles, recogidas el primer día de fermentación, sobre un gel de poliacrilamida.

En la primera imagen tenemos el ladder en el primer pocillo, seguido del positivo de la levadura nativa 1, PNLI 29, a continuación las tres réplicas con la inoculación de dicha levadura. Después se repite el mismo esquema con la segunda levadura nativa, la 2, SB1MP3, y las tres réplicas que la contienen.

En la segunda imagen se tiene la misma secuencia que en la primera imagen pero con las levaduras no *Saccharomyces* comercial, *Torulaspota* y después el control con la *Saccharomyces* comercial, EC118.

Los tamaños de los productos de amplificación para todas las muestras presentan la misma migración de bandas que sus correspondientes positivos, ya que en este primer día solo hay una levadura inoculada en cada muestra. Esto es, las réplicas P1, P2 y P3 coinciden con el positivo de la nativa1, y así ocurre con las demás. El tamaño de las amplificaciones para las levaduras *Torulaspota* y nativa 1 (PNLI29) es de 800 pb (pares de bases) aproximadamente, mientras que para la nativa 2 (SB1MP3) y para la *Saccharomyces* (EC118) es de aproximadamente 880 pb. Con ello se afirma que las especies presentes en las muestras son las que se habían inoculado y no están contaminadas con otros microorganismos. Por lo tanto la fermentación hasta este punto ha sido llevada a cabo por las levaduras deseadas.

Por otro lado los tamaños de las amplificaciones para la *Torulaspota* y para la *Saccharomyces* coinciden con los tamaños encontrados en la bibliografía para las mismas especies, confirmando que los resultados obtenidos son fiables.

### Día 3 de fermentación

24 horas después de haber realizado la co-inoculación con *Saccharomyces* comercial (EC118) los resultados de las amplificaciones son los siguientes:

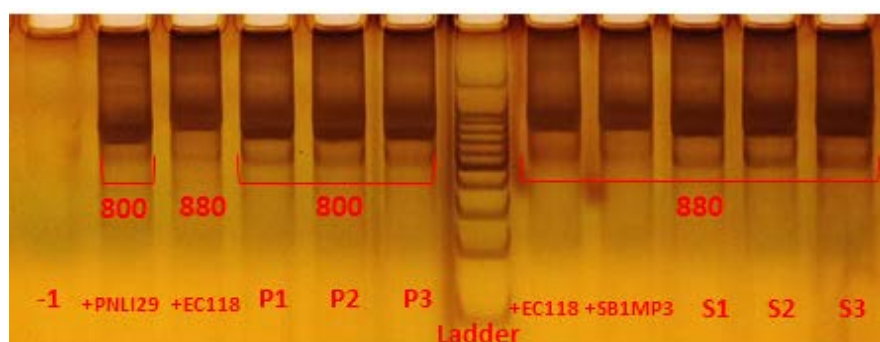


Figura 21. Resultados obtenidos en la extracción de ADN y posterior amplificación correspondiente a las muestras de los tratamientos que contienen las levaduras nativas recogidas el tercer día de fermentación, sobre un gel de poliacrilamida.

El pocillo que contiene “-1” hace referencia al negativo, analizado para comprobar que el “mix de PCR” no estuviera contaminado. A continuación de éste se encuentran los positivos de la levadura nativa 1 (PNLI 29), y de la *Saccharomyces* comercial (EC118), seguidos de las tres réplicas que contienen la co-inoculación de esos dos mismos positivos (P1, P2 y P3). De igual forma ocurre con los siguientes positivos que se encuentran después del ladder, en este caso con la nativa 2 (SB1MP3), la *Saccharomyces* comercial otra vez y las tres réplicas que contenían dicha co-inoculación (S1, S2 y S3).

Los tamaños de los productos de amplificación para las réplicas P1, P2 y P3 coinciden con el positivo de la nativa 1 (800 pb aproximadamente), y no con el positivo de la *Saccharomyces* (880 pb). En el caso de las réplicas S1, S2 y S3 el tamaño de las amplificaciones aproximadamente es de 880 pb, por lo que coinciden tanto con el positivo de la *Saccharomyces* como con el de la nativa 2.

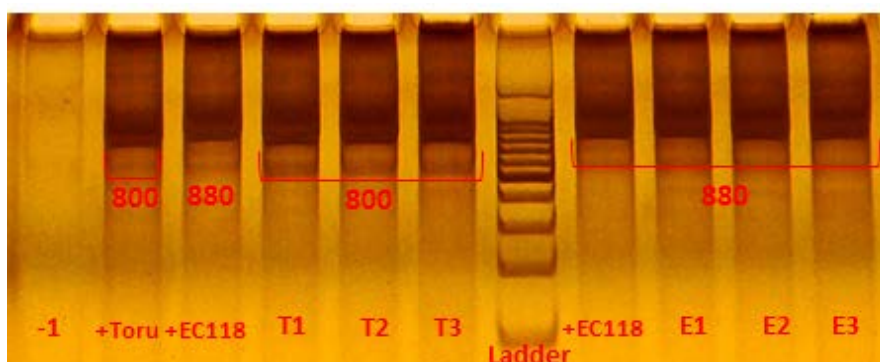


Figura 22. Resultados obtenidos en la extracción de ADN y posterior amplificación correspondiente a las muestras de los tratamientos que contienen los controles, recogidas el tercer día de fermentación, sobre un gel de poliacrilamida.

Aquí están representados los dos tratamientos de control, el primero es la co-inoculación de no-*Saccharomyces* comercial (*Torulaspóra*) y *Saccharomyces* comercial (EC118), con los positivos y las tres réplicas (T1, T2 y T3) y después del ladder está el control con solo la *Saccharomyces* comercial (EC118), el positivo y las tres réplicas (E1, E2 y E3).

Se observa que como las bandas de los productos de amplificación obtenidos para las réplicas T1, T2 y T3 coinciden con el tamaño de banda de la *Torulaspóra* (800 pb aproximadamente), y que las réplicas E1, E2 y E3 coinciden con el tamaño que presenta la *Saccharomyces* comercial (880 pb aproximadamente).

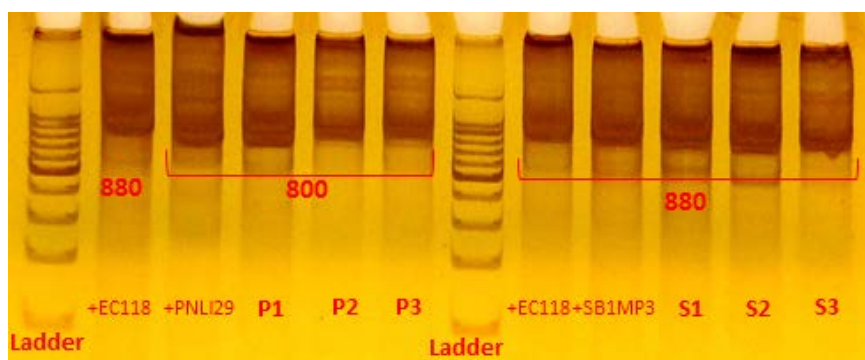
Día 6 de fermentación

Figura 23. Resultados obtenidos en la extracción de ADN y posterior amplificación correspondiente a las muestras de los tratamientos que contienen las levaduras nativas recogidas el sexto día de fermentación, sobre un gel de poliacrilamida.

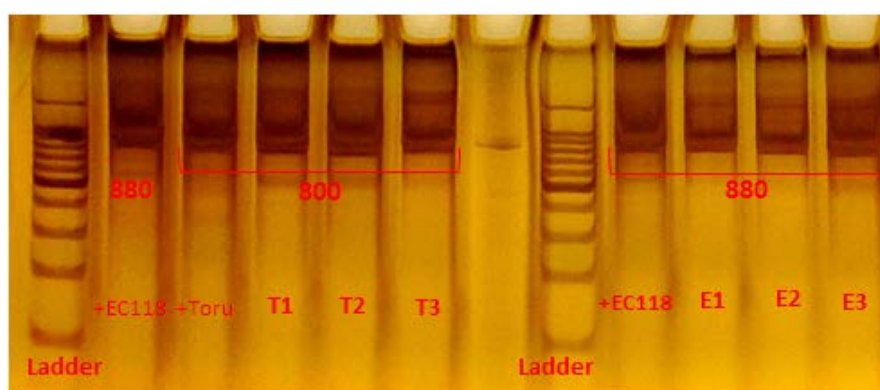


Figura 24. Resultados obtenidos en la extracción de ADN y posterior amplificación correspondiente a las muestras de los tratamientos que contienen los controles, recogidas el sexto día de fermentación, sobre un gel de poliacrilamida.

Llegados a este punto de la fermentación, se observa en la figura 24 como en los tratamientos con la nativa 1, PNLI29, los amplificadores de ADN de las réplicas tienen un tamaño de 800 pb aproximadamente que correspondería al tamaño esperado por la levadura nativa. Con respecto a la segunda levadura nativa, las réplicas de ese tratamiento siguen dando un tamaño de amplificado de 880 pb aproximadamente que coinciden con los positivos tanto de la propia nativa, como de la *Saccharomyces* comercial.

Para el segundo gel, los tamaños de amplificado obtenidos tanto en las réplicas de los tratamientos como en los positivos coinciden con los esperados tanto como para la *Saccharomyces* comercial como para la *Torulaspora*.

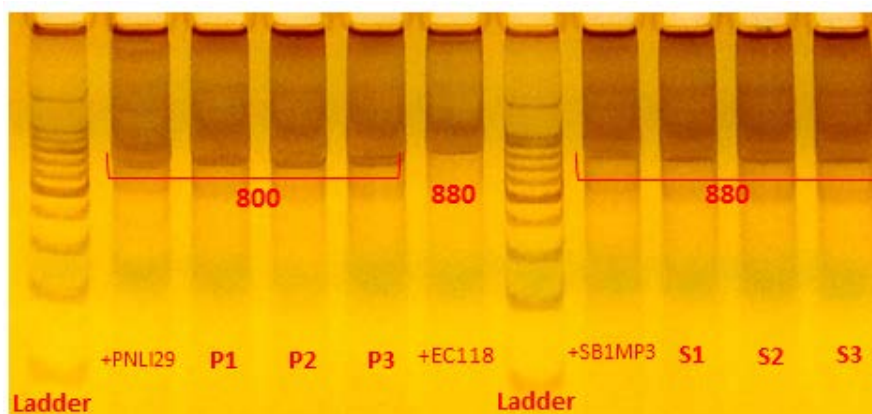
Día 8 de fermentación

Figura 25. Resultados obtenidos en la extracción de ADN y posterior amplificación correspondiente a las muestras de los tratamientos que contienen las levaduras nativas recogidas el octavo día de fermentación, sobre un gel de poliacrilamida.

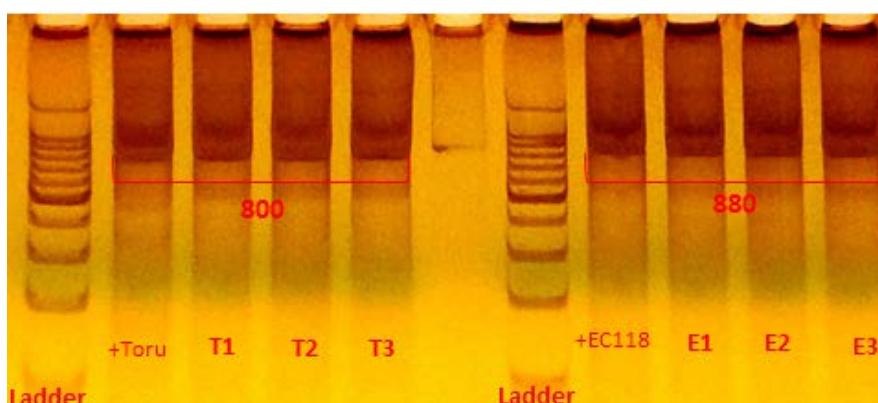


Figura 26. Resultados obtenidos en la extracción de ADN y posterior amplificación correspondiente a las muestras de los tratamientos que contienen los controles, recogidas el octavo día de fermentación, sobre un gel de poliacrilamida.

En los resultados para el último día de fermentación, se aprecia que todos los tratamientos coinciden en el tamaño con sus positivos respectivos. En el primer gel coincide el tamaño de las tres réplicas que contienen la co-inoculación de la nativa 1 con el positivo de la misma, y lo mismo ocurre con las tres réplicas que contienen la co-inoculación de la nativa 2 y su positivo, que presentan un tamaño de 880 pb aproximadamente, igual que el positivo de la *Saccharomyces* comercial.

Para realmente identificar qué especie es la que se encuentra presente en cada una de las muestras se acude a la longitud de los fragmentos de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP). Técnica que consiste en la diferenciación de los microorganismos mediante el análisis de los patrones de ruptura que son generados en un lugar específico del genoma del organismo, cuando éste es cortado mediante endonucleasas o enzimas de restricción.

Para llevar a cabo el RFLP, se han realizado ensayos previos solo con los positivos utilizando 2 µl de amplificado junto con 0,1 µl de enzima, el resultado visto sobre un gel de poliacrilamida mediante electroforesis muestra que parte del producto queda sin digerir, por

lo que se han tenido que realizar una dilución de cada amplificado de: 1µl de amplificado en 4µl de agua libre de nucleasas, y además aumentar la concentración de enzima, utilizando 0,3µl de enzima HINF I, para cada muestra. Esto es debido a una pérdida de la actividad de la enzima por disminución prolongada de la temperatura de almacenamiento.

Por lo tanto para este caso el mix de RFLP utilizado para cada muestra ha sido el siguiente:

- 2µl de la dilución de amplificado
- 0,3µl de enzima HINF I
- 1µl de buffer de enzima HINF I
- 6,7µl de agua libre de nucleasas

El tiempo de digestión ha sido de 2 horas y 25 minutos a una temperatura de 37°C, la temperatura óptima de acción de la enzima. En cada pocillo del gel de poliacrilamida se cargan los 10 µl de cada muestra (todo el volumen digerido) junto con 5 µl de tampón de carga y después de correr el gel a 150 Voltios durante 45 minutos el gel se revela mediante una solución con bromuro obteniendo las siguientes figuras. Los tamaños de las bandas de los fragmentos de restricción han sido estimados comparando la migración electroforética, con la migración de un ADN estándar con un rango de tamaño de 100 – 1500 pares de bases (100pb ladder).

#### Día 1 de fermentación

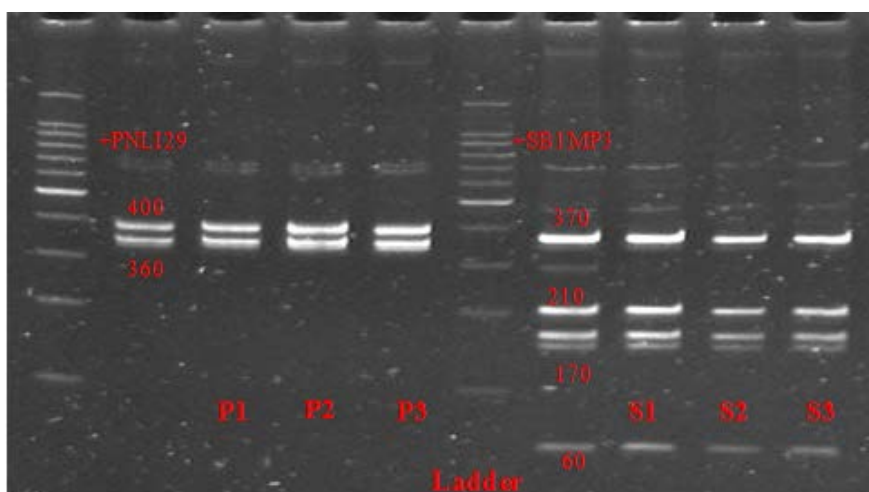


Figura 27. Resultados obtenidos en la digestión del ADN amplificado correspondiente a las muestras de los tratamientos que contienen las levaduras nativas recogidas el primer día de fermentación, sobre un gel de poliacrilamida.

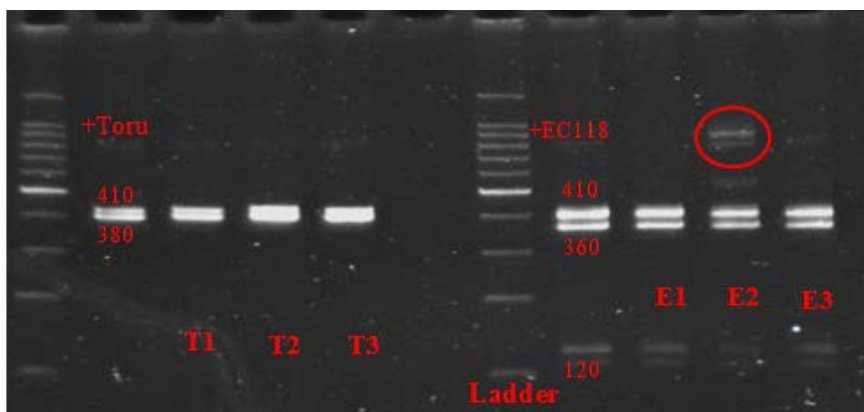


Figura 28. Resultados obtenidos en la digestión del ADN amplificado correspondiente a las muestras de los tratamientos que contienen los controles, recogidas el primer día de fermentación, sobre un gel de poliacrilamida.

A la vista de las imágenes, en este primer día de fermentación, 24 horas después de haber inoculado las levaduras pertinentes en cada tratamiento, cada una de las réplicas coincide en los fragmentos de restricción con el positivo de la levadura que se le inoculó por lo que se tiene la certeza de que no se contaminaron las muestras con ningún otro microorganismo. Por otro lado los fragmentos de restricción obtenidos tanto para la *Torulasporea* como para la *Saccharomyces* coinciden con los esperados según los datos bibliográficos encontrados para la enzima HINF I.

En la figura 28 está rodeada en rojo una banda que hace referencia a que ha quedado producto sin digerir a pesar de haber diluido el amplificado y añadido más enzima.

Día 3 de fermentación

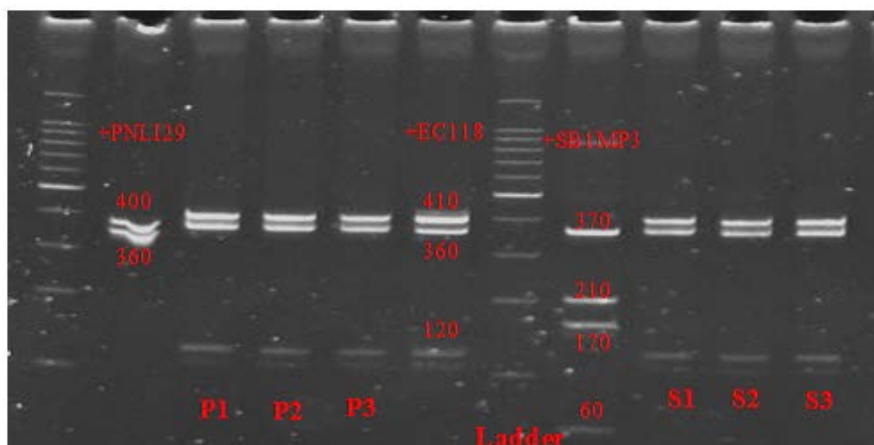


Figura 29. Resultados obtenidos en la digestión del ADN amplificado correspondiente a las muestras de los tratamientos que contienen las levaduras nativas recogidas el tercer día de fermentación, sobre un gel de poliacrilamida.

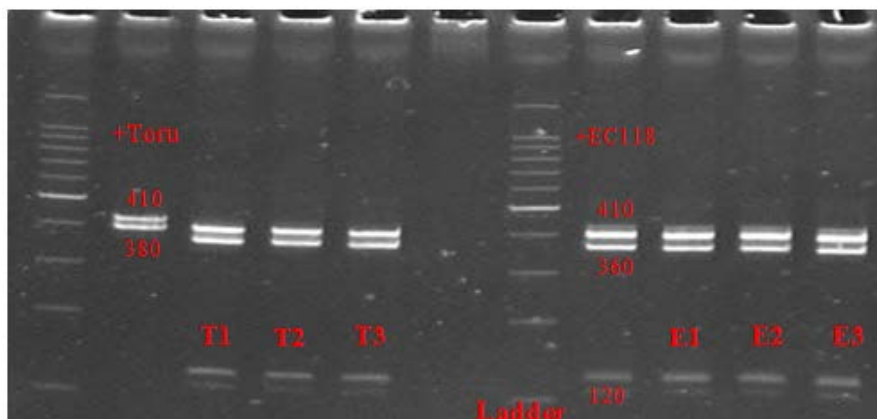


Figura 30. Resultados obtenidos en la digestión del ADN amplificado correspondiente a las muestras de los tratamientos que contienen los controles, recogidas el tercer día de fermentación, sobre un gel de poliacrilamida.

Para el tercer día de fermentación, 24 horas después de haber realizado la co-inoculación con la *Saccharomyces* comercial, obtenemos que los cortes que dan los fragmentos de restricción de todas las réplicas de los distintos tratamientos coinciden con el positivo de la *Saccharomyces* comercial, y no con los positivos de las levaduras no-*Saccharomyces*, que era lo que parecía por los resultados obtenidos del PCR.

Día 6 de fermentación

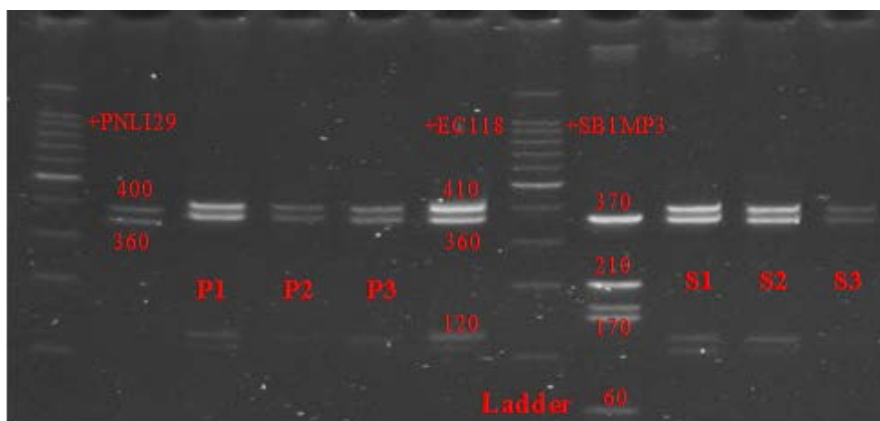


Figura 31. Resultados obtenidos en la digestión del ADN amplificado correspondiente a las muestras de los tratamientos que contienen las levaduras nativas recogidas el sexto día de fermentación, sobre un gel de poliacrilamida.

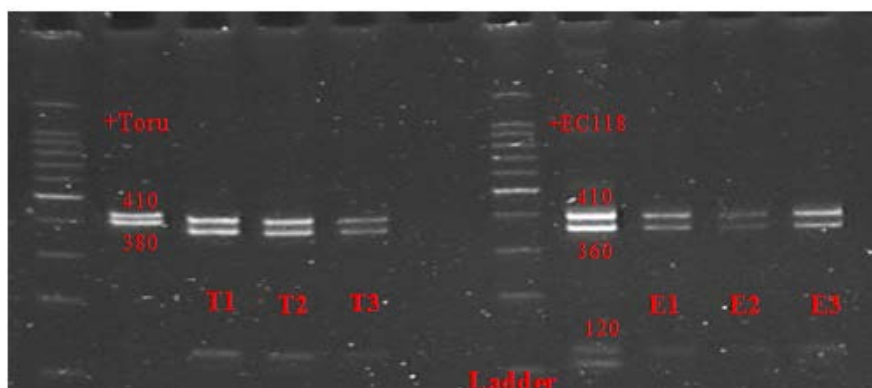


Figura 32. Resultados obtenidos en la digestión del ADN amplificado correspondiente a las muestras de los tratamientos que contienen los controles, recogidas el sexto día de fermentación, sobre un gel de poliacrilamida.

Tras 6 días de fermentación la levadura que está presente en todos los tratamientos según la migración de los fragmentos de restricción obtenidos es la *Saccharomyces* comercial, EC118.

Día 8 de fermentación

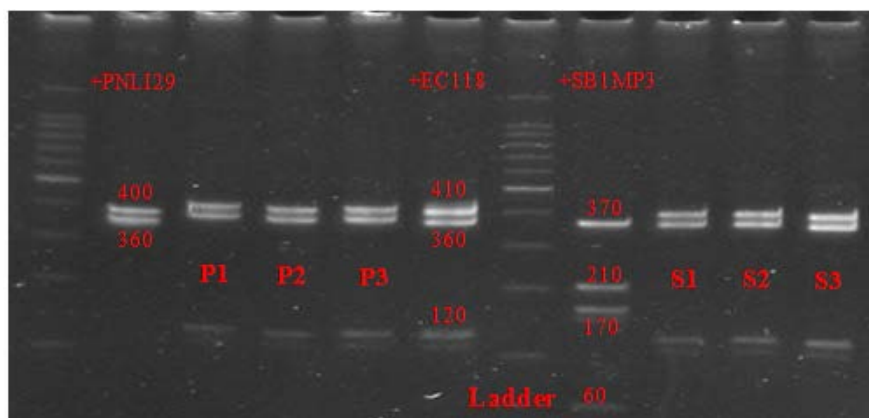


Figura 33. Resultados obtenidos en la digestión del ADN amplificado correspondiente a las muestras de los tratamientos que contienen las levaduras nativas recogidas el octavo día de fermentación, sobre un gel de poliacrilamida.

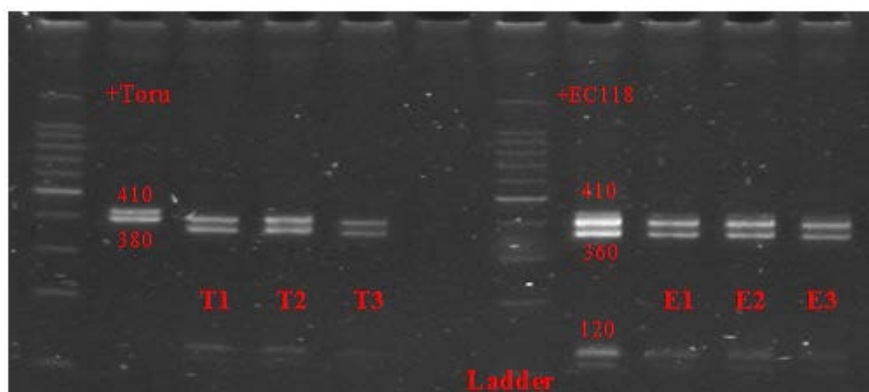


Figura 34. Resultados obtenidos en la digestión del ADN amplificado correspondiente a las muestras de los tratamientos que contienen los controles, recogidas el octavo día de fermentación, sobre un gel de poliacrilamida.

El último día de fermentación muestra que la levadura *Saccharomyces* comercial es la que está presente en todas las muestras de DNA extraídas, amplificadas y digeridas.



# Capítulo 5.

# CONCLUSIONES



En este proyecto se ha hecho una evaluación de dos levaduras nativas chilenas en microfermentaciones vínicas, mediante la co-inoculación de dichas levaduras nativas junto con una levadura *Saccharomyces* comercial, *Saccharomyces cerevisiae*.

Realizando un seguimiento de las fermentaciones mediante conteo de la población de células al microscopio y también mediante el contenido en etanol, se ha observado que las levaduras han conseguido realizar la fermentación del mosto de uva, llegando a un contenido en etanol similar al previsto inicialmente mediante el cálculo del GAP.

Por otro lado al comparar las fermentaciones realizadas por las levaduras nativas con las fermentaciones realizadas por la co-inoculación de la no-*Saccharomyces* comercial, *Torulaspota delbrueckii*, junto con la *Saccharomyces* comercial, se ha observado que las levaduras nativas se han comportado de la misma forma que la no-*Saccharomyces* comercial, obteniendo niveles de etanol iguales o superiores.

Por último se ha comprobado mediante la amplificación (PCR) y digestión (RFLP) del ADN extraído de las muestras de fermentación, que han sido las levaduras inoculadas y no otras las que han estado presentes en todo momento durante el proceso de fermentación.

Con todo ello se puede asegurar que las levaduras a estudiar:

- Levadura nativa 1: código PNLI29 desde Limari identificada como *Lachancea thermotolerans*
- Levadura nativa 2: código SB1MP3 desde Maipo identificada como *Hanseniospora uvarum*

Han realizado con éxito la primera etapa de la fermentación del mosto Sauvignon Blanc, pudiendo con ello aportar aromas característicos al vino, ya que son capaces de liberar terpenos y tioles mediante las  $\beta$ -glucosidasas, que se podrán estudiar realizando el perfil aromático de las muestras. Estudiando qué aporta cada una de las levaduras nativas al aroma del vino se conseguirán unos vinos de mayor calidad, específicos de una región y reproducibles a gran escala.



# Capítulo 6.

## LINEAS FUTURAS



En base a los resultados obtenidos se debe proseguir con un estudio de los compuestos aromáticos de las fermentaciones realizadas, para con ello poder conocer qué compuestos son los que han aportado las levaduras nativas seleccionadas para este estudio. Además se deberá realizar el mismo ensayo a escala mayor con el fin de verificar si los resultados son extrapolables a volúmenes más grandes de vino.

Este estudio se ha realizado en base a la producción de vino blanco, utilizando un mosto de uva Sauvignon Blanc, por lo que se hace necesario realizar el mismo estudio, con las mismas levaduras nativas no-*Saccharomyces*, para observar qué aportan en este caso y si son capaces de realizar la fermentación alcohólica. La principal diferencia entre estos vinos, blanco y tinto, es que para obtener el vino tinto se han de realizar dos fermentaciones consecutivas, la primera la alcohólica y la segunda maloláctica. Seguido del estudio también se realizará un estudio de los compuestos aromáticos y se compararán dichos resultados con los obtenidos en el presente proyecto.

Si todos los resultados son favorables y se consiguen obtener aromas en el vino final, característicos de las levaduras nativas seleccionadas, se podrá comercializar vino, que fermentado mediante la co-inoculación de levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*, consiga diferenciarse según la región de la que provengan esas levaduras nativas. Finalmente es el consumidor el que va a poder elegir entre una variedad de finos diferenciados según la región de la que provengan las levaduras no-*Saccharomyces*, utilizadas en la etapa más temprana de la fermentación alcohólica.



# Capítulo 7.

## IMPACTO SOCIAL Y MEDIOAMBIENTAL



Con este proyecto se pretende lograr una diferenciación en cuanto a las características sensoriales del vino según la levadura nativa utilizada. Con ello el consumidor va a poder distinguir entre vino de una región y de otra, pudiendo comprar el que más se adapte a sus gustos. Cuando el consumidor compra un vino local o importado este acto conlleva implicaciones sociales, ambientales y económicas. Esta compra favorece el desarrollo económico, la creación de empleo, el mantenimiento de comunidades rurales y de la zona productora así como el mantenimiento de actividades o sectores relacionados como son el de la maquinaria agrícola, envases, transportes, etc.

A estos efectos tanto sociales como económicos se suman los impactos ambientales que de forma general se producen en el sector industrial, y por lo tanto en una bodega también, y que son los siguientes:

#### 1. Consumo de recursos naturales

Se hace necesario encontrar un equilibrio adecuado entre la protección del medio ambiente, el progreso económico y el desarrollo social. El concepto de sostenibilidad está basado en la obtención de un elevado volumen de bienes de consumo teniendo presente siempre un respeto por el medio ambiente durante las técnicas de elaboración. Uno de los impactos ambientales más significativos que producen las empresas del sector vinícola es el gran volumen de agua que se consume durante el proceso de producción. Las bodegas presentan datos de consumos de agua tremendamente elevados, este consumo es un consumo que varía muy considerablemente de unos meses a otros, una gran mayoría del volumen consumido se utiliza en operaciones de limpieza de tolvas, despalilladoras, depósitos, bombas y tuberías de vendimias, además del agua empleada en la refrigeración de los depósitos. Las bodegas consumen agua en casi todas las fases del proceso de producción.

España en comparación con las bodegas de otros países europeos se consume un volumen de agua muy superior al necesario de 3 a 6 litros de agua por litro de vino elaborado, debido al bajo coste que presenta actualmente el agua.

En cuanto a la energía, ésta se consume en todas las fases de elaboración de vino, se alimenta con energía la maquinaria y se emplea en iluminación de naves, almacenes, oficinas y aseos, desde la entrada de las uvas por las tolvas de recepción, despalillado, remontados, prensado, hasta envasado y etiquetado finales. En muchas ocasiones se desaprovecha parte de la energía al dejar lámparas encendidas en áreas vacías, o maquinaria conectada sin que se vaya a usar. La electricidad es la fuente más importante de emisión de gases de efecto invernadero, por lo que es muy importante controlar su consumo.

#### 2. Emisiones a la atmósfera

Las emisiones de gases a la atmósfera que se desprenden en las bodegas no son consideradas un impacto negativo significativo. Estas emisiones son generadas en su mayoría por las calderas, que emplean combustibles fósiles para calentar las naves, aunque existen varias operaciones del proceso de elaboración de vino que desprenden emisiones a la atmósfera. De entre los compuestos emitidos por las bodegas destacan

los Compuestos Orgánicos Volátiles (COVs), como el etanol que se genera en varios puntos del proceso de producción de vino, que es emitido mayormente al ser arrastrado por las burbujas de CO<sub>2</sub>. Tanto el CO<sub>2</sub> como los COVs y el SO<sub>2</sub> emitidos por las bodegas, no tienen una importancia significativa por ser moderado por el volumen de compuestos que se emiten al exterior, pero sí que se debe tener una vigilancia sobre ellos por la relevancia que tienen desde el punto de vista de la seguridad e higiene en el trabajo.

El mayor peligro dentro de una bodega tanto para los trabajadores como para la atmosfera es el gas carbónico que es desprendido durante el proceso de fermentación. La emisión de CO<sub>2</sub> es la principal fuente de contaminación atmosférica, al ser un gas más denso que el aire, se acumula en las partes bajas y mal ventiladas de la bodega y constituye un grave peligro para los operarios de una bodega.

Otra de las operaciones que se llevan a cabo en la producción de vino es el sulfitado, en el que hay que tener especial atención y manejarlo con precaución debido al peligro que puede causar en la salud de los trabajadores y sobre el medio ambiente, ya que el producto disuelto en agua u otros líquidos reacciona desprendiendo gas sulfuroso, tóxico tanto para la salud como para el entorno.

### 3. Ruido

A pesar de que las industrias de producción de vino presentan bajos índices de contaminación acústica, llevan a cabo métodos con el fin de contrarrestar los ruidos. Los principales focos de emisión de ruidos y vibraciones están localizados en la tolva, la despalladora y en la línea de embotellado.

### 4. Vertidos

Los vertidos industriales líquidos de los que se deshacen las productoras de vino tras su proceso de producción presentan un alto potencial de contaminaciones más o menos severas en cauces de ríos, acuíferos subterráneos y demás ecosistemas acuáticos. Los vertidos incontrolados de una bodega generalmente no contienen sustancias tóxicas pero contienen una gran concentración de materia orgánica causante del fenómeno conocido como eutrofización, aumento de nutrientes en el agua especialmente de compuestos de nitrógeno y fósforo que fomentan el crecimiento acelerado de las algas y especies vegetales superiores que impiden o dificultan el paso de luz solar al agua impidiendo con ello la fotosíntesis de las plantas acuáticas productoras de oxígeno, lo que afecta directamente a la calidad del agua así como a los organismos que en ella viven. En las bodegas se generan diferentes tipos de vertidos, que se clasifican en:

- Aguas de proceso: generadas durante el proceso de producción y cuya carga contaminante depende de la actividad industrial.
- Aguas fecales: generadas en los aseos.
- Aguas blancas o limpias: aguas que al no haber sido contaminadas pueden verterse sin tener que ser depuradas.

Por ello las bodegas necesitan un sistema de saneamiento capaz de depurar las aguas generadas que necesiten ser depuradas.

#### 5. Residuos

Se entiende por residuo a todo material que resulta de un proceso de fabricación, transformación, utilización, consumo o limpieza, que queda como inservible destinándose al abandono. Se ha de diferenciar entre residuo y subproducto. En todas las fases de elaboración de vino se generan residuos o subproductos, que dependen directamente del proceso productivo realizado y de las materias primas que han sido utilizadas. Los más significativos son: restos de uvas en malas condiciones, frutos verdes o demasiado maduros, restos de hojas y otras partes de la vid, raspón o escobajo, restos de aditivos empleados en la fermentación, SO<sub>2</sub>, envases de productos, orujos, cristales de bitartrato potásico y soluciones de limpieza. Los subproductos generados en las bodegas, si no son aprovechados como materia prima en otro proceso, son catalogados como residuos con el inconveniente medioambiental que ello conlleva. Los residuos peligrosos que no son gestionados correctamente destruyen o afectan gravemente a los hábitats naturales donde se vierten, contaminando los cauces de agua mediante difusión e interfieren en los procesos de depuración biológica.



# **Capítulo 8.**

# **PLANIFICACIÓN**

# **TEMPORAL Y**

# **PRESUPUESTO**



## 8.1 PLANIFICACIÓN TEMPORAL

El proyecto se ha llevado a cabo en el Laboratorio de Biotecnología del Campus Sur, Mecesus en dependencias del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), Universidad de Chile. Este proyecto ha tenido una duración de 7 meses, comenzando en Febrero de 2016 y finalizando en Septiembre de 2016.

En primer lugar se buscó bibliografía acerca de los vinos en Chile, de la fermentación alcohólica y de las levaduras. A continuación se realizó un aprendizaje de las técnicas de laboratorio que se iban a utilizar en el proyecto, seguidas de una estimación de los materiales que iban a ser necesarios durante toda la experiencia. Una vez asimilado el ritmo de trabajo se procedió a realizar una primera fermentación de prueba con un mosto concentrado para visualizar las fases de la fermentación e ir practicando los ensayos de seguimiento de dicha fermentación.

Finalizada la fermentación de prueba y con una estructura clara de la dinámica de trabajo que conlleva el seguimiento de los parámetros de una fermentación se comenzaron las fermentaciones con las levaduras nativas, objetos de estudio de este proyecto. Se realizó un seguimiento diario de la fermentación obteniendo datos de porcentaje de etanol y de población de levaduras, y recogiendo muestras los días impares para posteriores análisis.

Una vez finalizada la fermentación alcohólica se continuó analizando las muestras de los días impares de fermentación y comparando los resultados obtenidos con los esperados, obteniendo las conclusiones pertinentes para cada caso. Finalmente se comenzó a redactar el presente documento.

Las tareas realizadas que se muestran de forma esquemática a continuación y posteriormente en la Figura 35 se representan junto a su duración en el diagrama de Gantt.

- **Documentación previa**
  - ✓ Recopilación de bibliografía
  - ✓ Lectura de bibliografía
- **Diseño de los experimentos**
  - ✓ Elección tratamientos a realizar
  - ✓ Elección del control de los tratamientos
  - ✓ Preparación del material necesario
- **Realización de ensayos de prueba**
  - ✓ Preparación del mosto
  - ✓ Fermentación alcohólica con levadura *Saccharomyces*
  - ✓ Control de la fermentación y recopilación de muestras
  - ✓ Análisis de muestras, obtención de resultados y conclusiones
- **Realización de los ensayos**
  - ✓ Preparación del mosto de Sauvignon Blanc Limari, mediciones iniciales
  - ✓ Comienzo de la Fermentación alcohólica con co-inoculación de levaduras

- ✓ Control de la fermentación y recopilación de muestras
- ✓ Análisis de muestras, obtención de resultados y conclusiones finales
- **Análisis de las muestras**
  - ✓ Extracción de ADN de las muestras
  - ✓ Realización de PCR al ADN extraído de las muestras
  - ✓ Realización del RFLP a los resultados del PCR.
- **Análisis de los resultados**
  - ✓ Estudio de los resultados
  - ✓ Obtención de conclusiones
- **Redacción del PFC**
  - ✓ Organización de la memoria
  - ✓ Recopilación de artículos
  - ✓ Lectura bibliográfica
  - ✓ Introducción, materiales y métodos
  - ✓ Resultados, discusión y conclusiones
  - ✓ Planificación temporal y presupuesto
  - ✓ Revisión y modificación
- **Entrega proyecto fin de carrera**

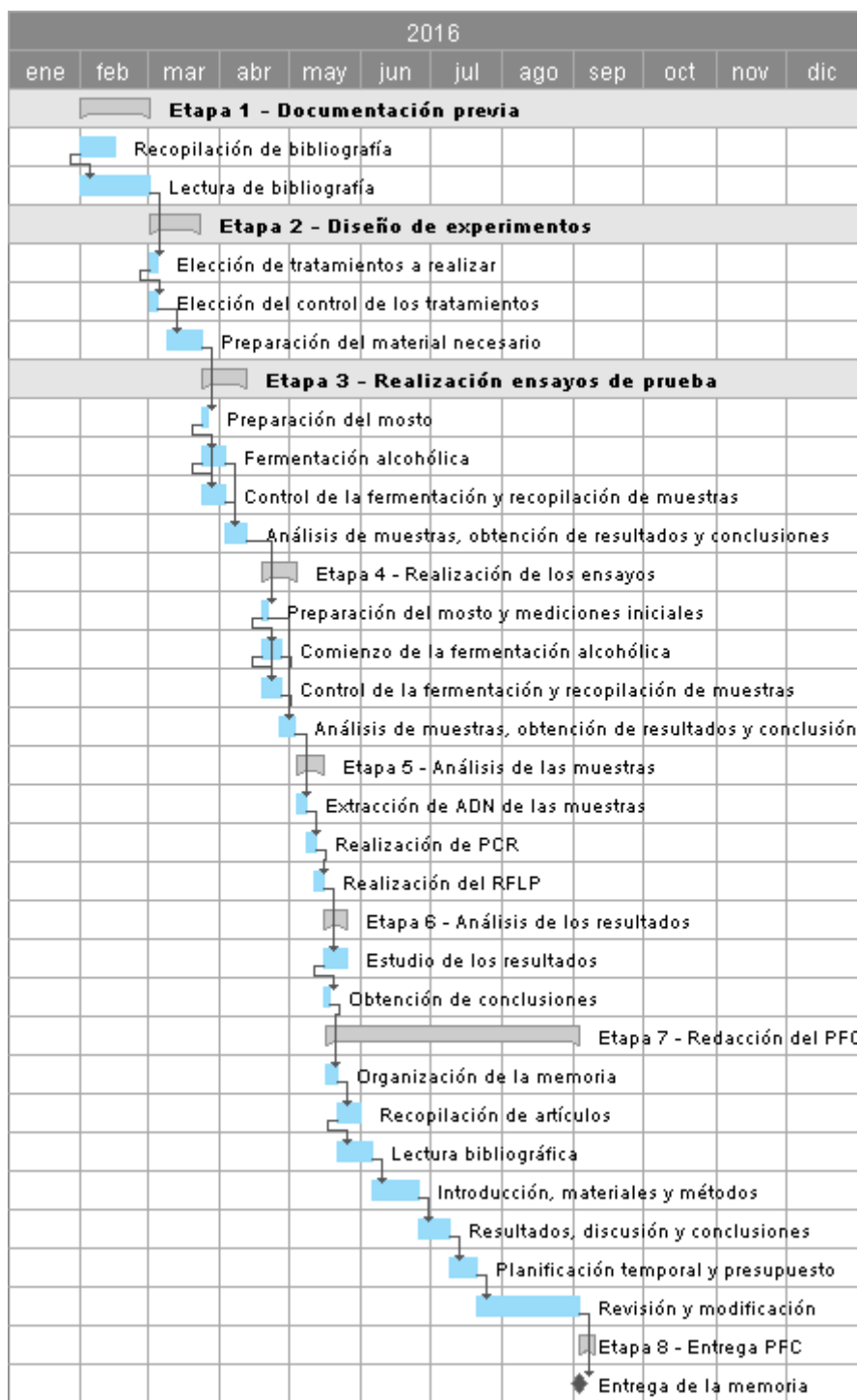


Figura 35. Diagrama de Gantt: planificación temporal del trabajo.

## 8.2 PRESUPUESTO

El presupuesto del proyecto se determina teniendo en cuenta los costes relacionados con el trabajo realizado por el personal implicado, el coste de las materias primas y el coste de los equipos empleados a los que se suman unos costes de bibliografía y unos costes

indirectos que corresponden al empleo de electricidad, agua, servicios auxiliares, etc. A pesar de que el proyecto se ha realizado en Chile los precios han sido calculados en euros ya que muchas de las materias primas se compran en el extranjero.

### 8.2.1 Costes de personal

Los costes que supone el personal implicado se determinan, teniendo en cuenta que el equipo de trabajo está formado por los tutores y el alumno del Proyecto Fin de Carrera, de la siguiente manera:

- El alumno ha dedicado aproximadamente 24,5 h a la semana a un coste de 8 €/h durante los 7 meses de duración del proyecto, lo que supone un coste de:

$$\text{Coste total alumno} = 24,5 \frac{\text{horas}}{\text{semana}} \times 4 \frac{\text{semanas}}{\text{mes}} \times 7 \text{ meses} \times 8,00 \frac{\text{€}}{\text{hora}}$$

$$\text{Total alumno} = 5.488,00 \text{ €}$$

- Los tutores del proyecto han trabajado en conjunto 3 h a la semana a un coste de 30 €/h, tanto en la enseñanza del trabajo de laboratorio, como apoyando en la realización del mismo y estableciendo los objetivos, suma un coste de:

$$\text{Coste total tutores} = 3 \frac{\text{horas}}{\text{semana}} \times 4 \frac{\text{semanas}}{\text{mes}} \times 7 \text{ meses} \times 30,00 \frac{\text{€}}{\text{hora}}$$

$$\text{Total tutores} = 2.520,00 \text{ €}$$

### 8.2.2 Costes de material

A continuación se detallan los costes de material, de reactivos más significativos y de los microorganismos utilizados.

Material	Coste	Material	Coste
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35,00 €	Puntas de pipeta	65,00 €
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	40,00 €	Enzima Go Taq	90,55 €
Metabisulfito de potasio	5,62 €	Enzima Proteinasa k	130,00 €
Nutrientes fermentación	20,00 €	Enzima Hinf I	120,00 €
Guantes látex	5,20 €	Cubetas plástico	76,00 €
Tubos plástico	30,75 €	Cubreobjetos	7,00 €
Kit medición etanol	282,00 €	Kit extracción ADN	274,00 €
Ladder 100pb	60,00 €	Primers	40,00 €
<b>Coste total material</b>		<b>1281,12 €</b>	

Tabla 13. Costes de material.

### 8.2.3 Costes de equipos

El coste derivado del uso de los equipos se puede ver en la Tabla 30. El coste de los equipos se calcula teniendo en cuenta el coste de cada equipo, su amortización y las horas que han sido utilizados. Para el equipamiento del laboratorio se considera una amortización de 10 años, por lo que el coste derivado de su uso se calcula dividiendo el coste total del equipo por la amortización y multiplicándolo por el periodo de tiempo que han sido utilizados.

$$\text{Coste derivado de equipo} = \frac{\text{Coste total}}{\text{Amortización}} \times \text{Tiempo de uso}$$

El coste total de los equipos empleados en la realización del proyecto suma una cantidad de 2.046,17 €

Equipo	Coste total	Coste derivado
pH-metro	148,00 €	7,40 €
Microscopio	1.595,00 €	79,75 €
Cámara de Neubauer	46,00 €	2,30 €
Termociclador	4.820,00 €	241,00 €
Equipo de electroforesis	2.210,15 €	110,51 €
Estufa de cultivo	1.148,00 €	57,40 €
Baño termostatzado	4.815,90 €	240,80 €
Centrífuga	1.735,00 €	86,75 €
Vórtex	1.980,00 €	99,00 €
Agitador rotativo	350,35 €	17,52 €
Autoclave	15.800,00 €	790,00 €
Equipo de agua ultra pura	5.415,00 €	270,75 €
Espectrofotómetro	750,00 €	37,50 €
Refractómetro	110,00 €	5,50 €
<b>Coste total equipos</b>		<b>2.046,18 €</b>

Tabla 14. Coste de equipos.

### 8.2.4 Costes indirectos

Los costes indirectos de este proyecto hacen referencia a los gastos de electricidad, agua, internet, impresiones, gas, etc. Y se ha estimado que suponen un 20% respecto al coste total del proyecto.

Además se incluyen en este apartado los gastos de bibliografía. El total de los costes bibliográficos es de 1.200,00 €. Se ha considerado un coste de 30 € por artículo consultado, aunque en este caso los artículos han sido facilitados y sufragados por el Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA).

### 8.2.5 Costes totales proyecto

El presupuesto final del proyecto se muestra a continuación en la Tabla 15. En la Figura 36 se muestran los porcentajes que representa cada uno de los costes con respecto al total.

Concepto	Coste
Coste alumno	5.488,00 €
Coste tutor	2.520,00 €
Total personal	<b>8.008,00 €</b>
Coste material	1.281,12 €
Coste equipos	2.046,17 €
Total material y equipos	<b>3.327,29 €</b>
Coste bibliografía	1.200,00 €
Costes administración y trabajo	2.507,06 €
Total costes indirectos	3.707,06 €
Total	<b>15.042,35 €</b>
IVA 21%	3.158,89 €
<b>Total proyecto</b>	<b>18.201,24 €</b>

Tabla 15. Presupuesto final del proyecto.

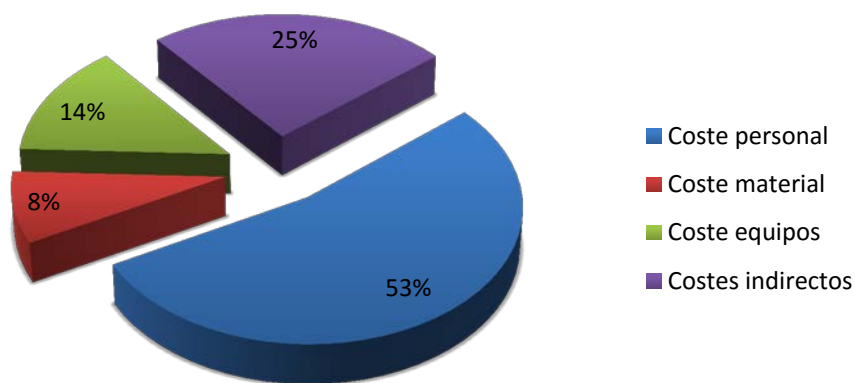


Figura 36. Diagrama circular de los costes desglosados del proyecto en porcentajes.

# Capítulo 9.

# BIBLIOGRAFÍA



1. Abbott JA (1999) Quality measurement of fruits and vegetables. *Post. Biol. Technol.* 15: 207-225.
2. Aguilera, A., Benítez, T. 1985. Role of mitochondria in ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 142:389-392.
3. Akubor PI, Obio SO, Nwodomere KA, & Obiomah E (2003) Production and quality evaluation of banana wine. *Plant Foods for Human Nut.* 58: 1-6.
4. Akubor PI (1996) The suitability of African bush mango juice for wine production. *Plant Foods Human Nut.* 49: 213-219.
5. Alexandre, H., Rosusseau, I., Charpenter, C. 1994. Ethanol adaptation mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 20:173-183.
6. Amerine, A. M., Berg, H. V., Kunkee, R. E., Ough, C. S., Singleton, V. L., Webb, A. D. 1980. *The Technology of winemaking* (4<sup>th</sup> ed.). Westport, CT. AVI Technical Books Inc.
7. Amerine, M. A., Kunkee, R.E. 1968. Microbiology of winemaking. *Ann. Rev. Microbiol.* 22:323-358.
8. Amerine, M. A., Roessler, E. B. 1983. *Wines, their sensory evaluation*. W. H. Freeman & Company, New York.
9. Anfang, N., M. Brajkovich y M. R. Goddard. 2009. Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in Sauvignon Blanc. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 15(1):1-8.
10. Aranda, A., Querol, A., del Olmo, M. 2002. Correlation between acetaldehyde and ethanol resistance and expression of HSP genes in yeast strains isolated during the biological aging of sherry wines. *Arch. Microbiol.* 177:304-312.
11. Aryan, A. P., Wilson, B., Strauss, C.R., Williams, P. J. 1987. The properties of glycosidases of *Vitis vinifera* and a comparison of their  $\beta$ -glucosidase activity with that of exogenous enzymes. An assessment of possible applications in enology. *Am. J. Enol. Vitic.* 38:182-188.
12. Baumes, R., Cordonnier, R., Nitz, S., Drawert, F. 1986. Identification and determination of volatile constituents in wines from different vine cultivars. *J. Sci. Food Agric.* 37:972-943.
13. Barnett, J. A., Payne, R. W., Yarrow, D. 1990. *Yeasts: characteristics and identification*, 2<sup>nd</sup> ed., Cambridge, Cambridge University Press.
14. Barre, P., Vézinhel, F., Dequin, S., Blondin, B. 1993. Genetic improvement of wine yeast, pp. 421-447. In Fleet, G.H. (ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic.
15. Becker, J. V. W., Armstrong, G.O., van der Merwe, M. J., Lambrechts, M. G., Vivier, M. A., Pretorius, I. S. 2003. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the synthesis of the wine-related antioxidant resveratrol. *FEMS Yeast Res.* 4:79-85.
16. Belanic, A., Gunata, Z., Vallier, M-J., Agosin, E. 2003.  $\beta$ -Glucosidase from the grape native yeast *Debaromyces vanriijiae*: purification, characterization, and its effect on monoterpene content of a Musca grape juice. *J. Agric. Food Chem.* 51: 1453-1459.
17. Bell, T. A. y Etchells, J. L. 1956. Pectin hydrolysis by certain salt-tolerant yeasts. *Appl. Microbiol.* 4: 196-202.

18. Beltrán, G., Torrija, M. J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., Rozes, N., Más, A. 2002. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study. *Syst. Appl. Microbiol.* 25: 287-293.
19. Bely, M., P. Stoeckle, I. Masneuf-Pomared y D. Dubourdieu. 2008. Impact of mixed *Torulaspota delbrueckii-Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 122:312-320.
20. Benito, S., Morata, A., Palomero, F., González, C., Suárez-Lepe, J. A. (2011). Formation of vinylphenolic pyranoanthocyanins by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia guilliermondii* in red wines produced following different fermentation strategies. *Food Chemistry*, 124, 15-23.
21. Boulton, R. B. Singleton, V. L., Bisson, L. F., Kunkee, R. E. (ed.) 1996. Principles and practices of winemaking. Chapman, New York.
22. Brandt WB, Kelpin DLF, van Leeuwen MMI & Kooijman ALMS (2004) Modelling microbial adaptation to changing availability of substrates. *Water Res.* 38: 1003-1013.
23. Chambers, R.S., Broughton, M. J., Cannon, R.D., Carne, A., Emerson, G. W., Sullivan, P. A. 1993. A  $\beta$ -D-glucanase of *Candida albicans*: purification of the enzyme and molecular cloning of the gene. *J. Gen. Microbiol.* 139:325-334.
24. Charoenchai, C., Fleet, G. H., Henschke, P. A., Todd, B. E. N. 1997. Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Aust. J. Grape Wine Res.* 3: 2-8.
25. Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J., Pons, M. 1992. The origin of ethylphenols in wines. *J. Sci. Food Agric.* 60:178-184.
26. Chatonnet, P., Viala, C., Dubourdieu, D. 1997. Influence of polyphenolic components of red wines on the microbial synthesis of volatile phenols. *Am. J. Enol. Vitic.* 48:443-448.
27. Cheng S., C. Fockler, W.M. Barnes y R. Higuchi. 1994. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91: 5695-5699.
28. Cheng S., Y. Chen, A.J. Monforte, R. Higuchi y B. Van Houten. 1995. Template integrity is essential for PCR amplification of 20 to 30 kb sequences from genomic DNA. *PCR Methods and Applications* 4: 294-298.
29. Clemente-Jiménez JM, Mingorance-Cazorla L, Martínez-Rodríguez S, Las Heras-Vázquez FJ & Rodríguez-Vico F (2005) Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 98: 301-308.
30. Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni L., Mannazzu, I., Ciani, M. (2011). Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*, 28, 873-882.
31. Connell, L., Stender, H., Edwards, C. G. 2002. Rapid detection and identification of *Brettanomyces* from winery air samples based on peptide nucleic acid analysis. *Am. J. Enol. Vitic.* 53:322-324.
32. Cooper, T. G. 1982<sup>a</sup>. Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, pp. 39-99- En Strathern, J. N., Jones, E. W., Broach, J. B. (eds.), *The Molecular Biology of the yeast Saccharomyces. Metabolism and Gene Expression*. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.

33. Deák, T., Beuchat, L. R. 1996. Handbook of food spoilage yeasts. CRC Press.
34. Degré, R., Thomas, D. Y., Ash, J., Mailhiot, K., Morin, A., Dubord, C. 1989. Wine yeast strain identification. *Am. J. Enol. Vitic.* 40:309-315.
35. Delcroix, A., Gunata, Z., Sapis, J. C., Salmon, J. M., Bayonove, C. 1994. Glycosidase activities of three enological yeast strains during winemaking: effect on the terpenol content of Muscat wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 40:309-315.
36. Delfini, C., Cervetti, F. 1991. Metabolic and technological factors affecting acetic acid production by yeasts during alcoholic fermentation. *Vitic. Enol. Sci.* 46:142-150.
37. Delfini, C., Gaia, P., Bardi, L., Mariscalco, G., Conteiro, M. 1991. Production of benzaldehyde, benzyl alcohol and benzoic acid by yeasts and *Botrytis cinérea* isolated from grape musts and wines. *Vitic.* 30:253-263.
38. Dias, L., Dias, S., Sancho, T., Stender, H., Querol, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V. 2003. Identification of yeasts isolated from wine-related environments and capable of producing 4-ethylphenol. *Food Microbiol.* 20:567-574.
39. Dizy, M., Bisson, L. F. 2000. Proteolytic activity of yeasts strains during grape juice fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 51:155-167.
40. Duarte, F. L., Pais, C., Spencer-Martins, I., Leão, C. 1999. Distinctive electrophoretic isoenzyme profiles in *Saccharomyces cerevisiae sensu stricto*. *Int. J. System. Bacteriol.* 49:1907-1913.
41. Dubois, P. 1983. Volatile phenols in wine. En: Piggot, J. R. (ed.) *Flavour of distilled beverages, origin and development*. Ellis Horwood Chichester pp. 110-119.
42. Egli, C. M., Edinger, W. D., Mittrakul, C. M., Henick-Kling, T. 1998. Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. *J. Appl. Microbiol.* 85:779-789.
43. Erten, H. 2002. Relations between elevated temperatures and fermentation behaviour of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* associated with winemaking in mixed cultures. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18:373-378.
44. Erlich H. A. 1989. *PCR Technology: Principles and applications for DNA amplification*. Stockton Press, Nueva York, EE.UU.
45. Espinosa L. 2007. Guía práctica sobre la técnica de PCR. En: Eguiarte L., V. Souza y X. Aguirre (comps.). *Ecología molecular*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad e Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, D. F., México, pp. 517-526.
46. Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A. 1999. Identification of yeast by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49:329-337.
47. Esteve-Zarzoso, B., Peris-Torán, M. J., García-Maiquez, E., Uruburu, F., Querol, A. 2001. Yeast population dynamics during the fermentation and biological aging of sherry wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2056-2061.
48. Etievant, P.X. 1981. Volatile phenol determination in wine. *J. Agric. Food Chem.* 29:65-67.
49. Etievant, P.X. 1991. Wine. En: Maarse (ed.) *Volatile compounds in foods and beverages*. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 483-578.

50. Farkas, J. 1988. *Technology and Biochemistry of wine*. Gordon and Breach. Nueva York.
51. Farkas, I., Hardy, T. A., Goebel, M. G., Roach, P. J. 1991. Two glycogen synthase isoforms in *Saccharomyces cerevisiae* are coded by distinct genes that are differentially controlled. *J. Biol. Chem.* 266:15602-15607.
52. Fernández, M., Úbeda, J. F., Briones, A. I. 2000. Typing of non-*Saccharomyces* yeasts with enzymatic activities. *Int. J. Food Microbiol.* 59:29-36.
53. Fernández-González, M., Di Stefano, R., Briones, A. 2003. Hydrolysis and transformation of terpene glycosides from Muscat must by different yeasts species. *Food Microbiol.* 20:35-41.
54. Ferraro, L., Fatichenti, F., Ciani, M. 2000. Pilot scale vinification process using immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochem.* 35:1125-1129.
55. Ferreira V (2002) Uva, levadura, y aditivos de fermentación. ¿Quién es quién en la formación de los aromas del vino blanco? Perspectivas de control y mejora. XX Congreso Internacional del Cava, Sant Sadurní d'Anoia, España.
56. Ferreira, V., Fernández, P., Peña, C., Escudero, A., Cacho, J. F. 1995. Investigation on the role played by fermentation esters in the aroma of Young spanish wines by multivariate analysis. *J. Sci. Food Agric.* 67:381-392.
57. Fleet, G. H. 1990. Growth of yeasts during wine fermentation. *J. Wine Research* 1:211-223.
58. Fleet, G. H. 1992. Spoilage yeasts. *Crit. Rev. Biotechnol.* 12:1-44.
59. Fleet, G. H., Heard, G. 1993. Yeast growth during fermentation, pp. 27-57. En Fleet, G. (ed.) *Wine microbiology and biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Switzerland.
60. Fugelsang, K. C. 1996. *Zygosaccharomyces bailii*, a spoilage yeast isolated from wine. CATI August 1996.
61. Fugelsang, K. C. 1997. *Wine microbiology*. Chapman & Hall, New York.
62. Fugelsang, K. C. 1998. *Zygosaccharomyces bailii*, a spoilage yeast isolated from grape juice. CATI September 1998.
63. Ganga, M. A., Aravena, A., Rebolledo, H., Fonseca, F., Quezada, E., Martínez, C., Carriles, P., Heras, J. M., Ortiz-Julien, A. (2013). Aplicación de levaduras no convencionales en enología. Cultivos secuenciales de *Metschnikowia pulcherrima* / *Saccharomyces cerevisiae*.
64. García, A., Carcel, C., Dulau, L., Samson, A., Aguera, E., Agosin, E., Gunata, Z. 2002. Influence of a mixed culture with *Debaryomyces vanriji* and *Saccharomyces cerevisiae* on the volátiles of a Muscat wine. *J. Food Sci.* 67:1138-1143.
65. Genovés, S., Gil, J. V., Manzanares, P., Aleixandre, J. L. Vallés, S. 2003. *Candida molischiana*  $\beta$ -glucosidase production by *Saccharomyces cerevisiae* and its application in winemaking. *J. Food Sci.* 68:2096-2100.
66. Gil, J. V., Mateo, J. J., Jiménez, M., Pastor, A., Huerta, T. 1996. Aroma compounds in wine as influenced by apiculate yeasts. *J. Food Sci.* 61:1247-1249.

67. Guillamón, J. M., Querol, A., Jiménez, M., Huerta, T. 1993. Phylogenetic relationships among wine yeast strains based on electrophoretic whole-cell protein patterns. *Int. J. Food Microbiol.* 18:115-125.
68. Guillamón, J. M., Sabaté, J., Barrio, E., Cano, J., Querol, A. 1998. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch. Microbiol.* 169:387-392.
69. Guiudici, P., Romano, P., Zambonelli, C. 1990. A biometric study of higher alcohol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Can. J. Microbiol.* 36:60-64.
70. Guiudici, P., Zambonelli, C., Kunkee, R. E. 1993. Increased production of n-propanol in wine yeast strains having an impaired ability to form hydrogen sulphide. *Am. J. Enol. Vitic.* 44:123-127.
71. Gunata, Y. Z. 1984. Recherches sur la fraction liée de nature glycosidique de l'arôme du raisin: importance des terpenylglycosides, action des glycosidases. Tesis Doctoral, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier.
72. Ilabaca, C., Jara, C., Romero, J. 2014. The rapid identification of lactic acid bacteria present in Chilean winemaking processes using culture-independent analysis. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile, Chile.
73. Jara, C., Laurie, F., Mas, A., Romero, J. 2014. Microorganismos que dejan huella. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile, Chile.
74. Kulkarni, P., Loira, I., Morata, A., Tesfaye, W., González, M. C., Suárez-Lepe, J. A. (2015). Use of non-*Saccharomyces* yeast strains coupled with ultrasound treatment as a novel technique to accelerate ageing on lees of red wines and its repercussion in sensorial parameters. *LWT - Food Science and Technology*, 64, 1255-1262.
75. Liu, L., Loira, I., Morata, A., Suárez-Lepe, J. A., González, M. C., Rauhut, D. (2015). Shortening the ageing on lees process in wines by using ultrasound and microwave treatments both combined with stirring and abrasion techniques. *European Food Research and Technology*. DOI 10.1007/s00217-015-2566-z
76. Loira, I., Morata, A., Comuzzo, P., González, M. C., Calderón, F., Suárez-Lepe, J. A. (2015). Use of *Schizosaccharomyces pombe* and *Torulaspota delbrueckii* strains in mixed and sequential fermentations for improving red wine sensory quality. *Food Research International*, 76, 325-333.
77. Loira, I., Vejarano, R., Bañuelos, M. A., Morata, A., Tesfaye, W., Uthurry, C., Villa, A., Cintora, I., Suárez-Lepe, J. A. (2014). Influence of sequential fermentations with *Torulaspota delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on wine quality. *LWT - Food Science and Technology*, 59, 915-922.
78. Maarse, H., Visscher, C. A. 1989. Volatile compounds in alcoholic beverages-qualitative and quantitative data. TNO-CIVO Food Analysis Institute, Zeist, Holanda.
79. Malacrino, P., Zapparoli, G., Torriani, S., Dellaglio, F. 2001. Rapid detection of viable yeasts and bacteria in wine by flow cytometry. *J. Microbiol. Methods* 45:127-134.
80. Malfeito-Ferreira, M., Tareco, M., Loureiro, V. 1997. Fatty acid profiling: a feasible typing system to trace yeast contamination in wine bottling plants. *Int. J. Food Microbiol.* 38:143-155.

81. Mansfield, A. K., Zoecklein, B. W., Whiton, R. S. 2002. Quantification of glycosidase activity in selected strains of *Bettanomyces bruxellensis* and *Oenococcus oeni*. *Am. J. Enol. Vitic.* 53:303-307.
82. Manzanares, P., Ramón, D., Querol, A. 1999. Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the production of  $\beta$ -D-xylosidase activity. *Int. J. Food Microbiol.* 46:105-112.
83. Manzanares, P., Rojas, V., Genovés, S., Vallés, S. 2000. A preliminary search for anthocyanin- $\beta$ -D-glucosidase activity in non-*Saccharomyces* wine yeast. *Int. J. Food Sci. Technol.* 35:95-103.
84. Marais, J. 1983. Terpenes in the aroma of grapes and wine. A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 4:49-58.
85. Marais, J. 1990. Wine aroma composition. *Food Rev.* 17:18-21.
86. Martini, A., Ciani, M., Scorzetti, G. 1996. Direct enumeration and isolation of wine yeasts from grapes surfaces. *Am. J. Enol. Vitic.* 47:435-440.
87. Martini, A., Vaughan-Martini, A. V. 1990. Grape must fermentation, past and present. p. 105-123. En J. F. T. Spencer, D. M. Spencer (eds). *Yeast Technology*. Springer-Verlag, Berlin.
88. Massoutier, C., Alexandre, H., Feuillat, M., Charpentier, C. 1998. Isolation and characterization of cryotolerant *Saccharomyces* strains. *Vitis.* 37:55-59.
89. Mateo, J. J., Jiménez, M., Huerta, T., Pastor, A. 1991. Contribution of different yeasts isolated from musts of Monastrell grapes to the aroma of wine. *Int. J. Food Microbiol.* 14:153-160.
90. McKay, A. M. 1990. Degradation of polygalacturonic acid by *Saccharomyces cerevisiae*. *Lett. Appl. Microbiol.* 11:41-44.
91. McMahan, H., Zoecklein, B. W., Fugelsang, K., Jasinski, Y. 1999. Quantification of glycosidase activities in selected yeasts and lactic acid bacteria. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23:198-203.
92. Mendes-Ferreira, A., Clímaco, M. C., Mendes Faia, A. 2001. The role of non-*Saccharomyces* species in realising glycosidic fraction of grape aroma components. A preliminary study. *J. Appl. Microbiol.* 91:67-71.
93. Milanovic, V., Ciani, M., Oro, L., Comitini, F. (2012). *Starmarella bombicola* influences the metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* at pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase level during mixed wine fermentation. *Microbial Cell Factories*, 11-18.
94. Morata, A., Benito, S., Loira, I., Palomero, F., González, M. C., Suárez-Lepe, J. A. (2012). Formation of pyranoanthocyanins by *Schizosaccharomyces pombe* during the fermentation of red must. *International Journal of Food Microbiology*, 159, 47-53.
95. Morata, A., Loira, I., Vejarano, R., Bañuelos, M. A., Sanz, P. D., Otero, L., Suárez-Lepe, J. A. (2015). Grape processing by high hydrostatic pressure: effect on microbial populations, phenol extraction, and wine quality. *Food and Bioprocess Technology*, 8, 277-286.
96. Morata, A., Suárez Lepe, J. A. (2016). New biotechnologies for wine fermentation and ageing. En: *Advances in Food Biotechnology*. Editor: Prof V Ravishankar Rai. John Wiley & Sons, Ltd. West Sussex, United Kingdom, pp. 287-301.

97. Moreno, J. J., Millán, C., Ortega, J. M., Medina, M. 1991. Analytical differentiation of wine fermentations using pure and mixed yeast cultures. *J. Indust. Microbiol.* 7:181-190.
98. Nykänen, L., Nykänen, I., Suomalainen, H. 1977. Distribution of esters produced during sugar fermentation between the yeast cell and the médium. *J. Inst. Brew.* 83:32-34.
99. Ough, C. S., Cook, J. A., Lider, L. A. 1968. Rootstock-scion interactions concerning winemaking. Wine compositional and sensory changes attributed to rootstock and fertilizar differences. *Am. J. Enol. Vitic.* 19:254-265.
100. Palomero, F., Morata, A., Benito, S., Calderón, F., Suárez-Lepe, J. A. (2009). New genera of yeasts for over-lees aging of red wine. *Food Chemistry*, 112, 432-441.
101. Plata, C., Millán, C., Mauricio, J. C., Ortega, J. M. 2003. Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiol.* 20:217-224.
102. Radler, F. 1993. Yeasts-metabolism of organic acids pp. 165-182. En G. H. Fleet (ed). *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur.
103. Rankine, B. C. 1967. Formation of higher alcohols by wine yeasts and relationship to taste thresholds. *J. Sci. Food Agric.* 18:583-589.
104. Rankine, B. C., Pocock, K. F. 1969. Phenylethanol and n-hexanol in wines: influence of yeast strain grape variety and other factors; and thresholds. *Vitis* 8:23-37.
105. Rapp, A. 1998. Volatile flavour of wine. Correlation between instrumental analysis and sensory perception. *Nahrung* 42:351-363.
106. Rapp, A., Mandery, H. 1986. Wine aroma. *Experientia* 42:873-884.
107. Rapp, A., Versini, G. 1991. Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wine. En Rantz (ed). *Proceedings of the International symposium on nitrogen in grapes and wine*. Davis, CA. American Society for Enology and Viticulture, pp 156-164.
108. Ratledge, C., Evans, C. T. 1989. Lipids and their metabolism. En *The yeasts*, vol III. Academic Press Ltd. Pp 367-455.
109. Ravaglia, S., Delfini, C. 1993. Production of médium chain fatty acids and their ethyl esters by yeast strains isolated from musts and wines. *Ital. J. Food Sci.* 5:21-36.
110. Ribereau-Gayon, P., Glories, Y., Maugean, A., Dubordieu, D. 1998. *Chimie du vin, stabilisation et traitements*. Tome 2. Dunod, Paris.
111. Riccio, P., Rossana, R., Vinella, M., Domizio, P., Zito, F., Sansevrino, F., D'Elia, A., Rosi, I. 1999. Extraction and immobilization in one sep of two  $\beta$ -glucosidases released from a yeast strain of *Debaryomyces hansenii*. *Enzyme Microb. Technol.* 24:123-129.
112. Rojas V, Gil JV, Piñaga F & Manzanares P (2001) Studies on acetate ester production by nonSaccharomyces wine yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 70: 283-289.
113. Rosi, I., M. Vinella y P. Domizio. 1994. Characterization of  $\beta$ -glucosidase activity in yeast of oenological origin. *Journal of Applied Bacteriology* 77(5):519-527.
114. Spagna, G., Barbagallo, R. N., Palmeri, R., Restuccia, C., Giudici, P. (2002). Properties of endogenous  $\beta$ -glucosidase of a *Pichia anomala* strain isolated from Sicilian musts and wines. *Enzyme and Microbial Technology*, 31, Pages 1036-1041.
115. Suárez Lepe, J. A., Morata, A. (2015). *Levaduras para vinificación en tinto*. Antonio Madrid Vicente Ediciones. Madrid, España.

116. Suárez-Lepe, J. A., Morata, A. (2012). New trends in yeast selection for winemaking. *Trends in Food Science & Technology*, 23, 39-50.
117. Suárez-Lepe, J. A., Palomero, F., Benito, S., Calderón, F., Morata, A. (2012). Oenological versatility of *Schizosaccharomyces* spp. *European Food Research and Technology*, 235, 375-383.
118. Torija, M. J., N. Rozès, M. Poblet, J. M. Guillamón y A. Mas. 2001. Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie van Leeuwenhoek* 79(3-4):345-352.
119. Toro ME & Vázquez F (2002) Fermentation behaviour of controlled mixed and sequential cultures of *Candida cantarellii* and *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 351-358.
120. Viana, F., J. V. Gil, S. Genovés, S. Vallés y P. Manzanares. 2008. Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. *Food Microbiology* 25(6):778-785.
121. Viana, F., J. V. Gil, S. Vallés y P. Manzanares. 2009. Increasing the levels of 2-phenylethyl acetate in wine through the use of a mixed culture of *Hanseniaspora osmophila* and *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology* 135(1):68-74.
122. Zironi, R., P. Romano, G. Suzzi, F. Battistutta y G. Comi. 1993. Volatile metabolites produced in wine by mixed and sequential cultures of *Hanseniaspora guilliermondii* or *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech. Letters* 15:235-238.
123. Zott, K., C. Miot-Sertier, O. Claisse, A. Lonvaud-Funel y I. Masneuf-Pomarede. 2008. Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. *International Journal of Food Microbiology* 125(2):197-203.

# Capítulo 10.

## ABREVIATURAS/ NOTACIÓN



°C: grado centígrado

µg: microgramo

µl: microlitro

ADH: alcohol deshidrogenasa

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADP: adenosín difosfato

AgNO<sub>3</sub>: nitrato de plata

APS: persulfato amónico

ATP: adenosín trifosfato

C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH: etanol

C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>: glucosa

cm: centímetro

CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono

COVs: Compuestos Orgánicos Volátiles

g: gramo

GAP: grado alcohólico probable

h: hora

H<sub>2</sub>O: agua

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: ácido sulfúrico

hl: hectolitro

HO: homotálico

ho: heterotálico

kg: kilogramo

l: litro

LSA: levaduras secas activas

mg: miligramo

MgCl<sub>2</sub>: cloruro de magnesio

ml: mililitro

mm: milímetro

mmol: milimol

mtDNA: genoma mitocondrial

N<sub>2</sub>: nitrógeno

NADH: dinucleótido de nicotinamida-adenina

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NaOH: hidróxido de sodio

nm: nanómetro

OIV: Organización Internacional de la Viña y el Vino

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

pb: pares de bases

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RNA: ácido ribonucleico

SO<sub>2</sub>: anhídrido sulfuroso

TBE: Disolución tampón formada por Tris, EDTA y borato

TEMED: N,N,N',N'-tetrametilendiamina

YPD: medio de cultivo compuesto por dextrosa, peptona, extracto de levadura y agar si el medio de cultivo se desea sólido.

# Capítulo 11.

## ÍNDICE DE FIGURAS



Figura 1. División geográfica de los valles de cultivo de uva en Chile.....	18
Figura 2. Baño termostatzado laboratorio MECESUP, Chile.....	57
Figura 3. Cámara de Neubauer.....	61
Figura 4. Retícula de cámara de Neubauer.....	61
Figura 5. Centrífuga laboratorio MECESUP, Chile.....	68
Figura 6. Descripción gráfica PCR.....	71
Figura 7. Termociclador ESCO laboratorio MECESUP, Chile.....	72
Figura 8. Funcionamiento de las enzimas de restricción.....	74
Figura 9. Equipo de electroforesis bidimensional.....	76
Figura 10. Llenado de los pocillos del gel de poliacrilamida.....	77
Figura 11. Porcentaje de etanol obtenido en los días 1, 2, 3, 6 y 8 con co-inoculación de levadura nativa 1 y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	83
Figura 12. Porcentaje de etanol obtenido en los días 1, 2, 3, 6 y 8 con co-inoculación de levadura nativa 2 y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	83
Figura 13. Porcentaje de etanol obtenido en los días 1, 2, 3, 6 y 8 con co-inoculación de levadura <i>Torulaspora delbrueckii</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	84
Figura 14. Porcentaje de etanol obtenido en los días 1, 2, 3, 6 y 8 con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	85
Figura 15. Comparación del porcentaje de etanol obtenido para cada día de los cuatro tratamientos realizados.....	85
Figura 16. Número de células totales por mililitro para cada día de cada uno de los cuatro tratamientos realizados.....	87
Figura 17. Número de células vivas por mililitro para cada día de cada uno de los cuatro tratamientos realizados.....	88
Figura 18. Número de células muertas por mililitro para cada día de cada uno de los cuatro tratamientos realizados.....	88
Figura 19. Resultados obtenidos en la extracción de ADN y posterior amplificación correspondiente a las muestras de los tratamientos que contienen las levaduras nativas recogidas el primer día de fermentación, sobre un gel de poliacrilamida.....	91
Figura 20. Resultados obtenidos en la extracción de ADN y posterior amplificación correspondiente a las muestras de los tratamientos que contienen los controles, recogidas el primer día de fermentación, sobre un gel de poliacrilamida.....	92
Figura 21. Resultados obtenidos en la extracción de ADN y posterior amplificación correspondiente a las muestras de los tratamientos que contienen las levaduras nativas recogidas el tercer día de fermentación, sobre un gel de poliacrilamida.....	93
Figura 22. Resultados obtenidos en la extracción de ADN y posterior amplificación correspondiente a las muestras de los tratamientos que contienen los controles, recogidas el tercer día de fermentación, sobre un gel de poliacrilamida.....	93
Figura 23. Resultados obtenidos en la extracción de ADN y posterior amplificación correspondiente a las muestras de los tratamientos que contienen las levaduras nativas recogidas el sexto día de fermentación, sobre un gel de poliacrilamida.....	94
Figura 24. Resultados obtenidos en la extracción de ADN y posterior amplificación correspondiente a las muestras de los tratamientos que contienen los controles, recogidas el sexto día de fermentación, sobre un gel de poliacrilamida.....	94

Figura 25. Resultados obtenidos en la extracción de ADN y posterior amplificación correspondiente a las muestras de los tratamientos que contienen las levaduras nativas recogidas el octavo día de fermentación, sobre un gel de poliacrilamida. ....	95
Figura 26. Resultados obtenidos en la extracción de ADN y posterior amplificación correspondiente a las muestras de los tratamientos que contienen los controles, recogidas el octavo día de fermentación, sobre un gel de poliacrilamida. ....	95
Figura 27. Resultados obtenidos en la digestión del ADN amplificado correspondiente a las muestras de los tratamientos que contienen las levaduras nativas recogidas el primer día de fermentación, sobre un gel de poliacrilamida. ....	96
Figura 28. Resultados obtenidos en la digestión del ADN amplificado correspondiente a las muestras de los tratamientos que contienen los controles, recogidas el primer día de fermentación, sobre un gel de poliacrilamida. ....	97
Figura 29. Resultados obtenidos en la digestión del ADN amplificado correspondiente a las muestras de los tratamientos que contienen las levaduras nativas recogidas el tercer día de fermentación, sobre un gel de poliacrilamida. ....	97
Figura 30. Resultados obtenidos en la digestión del ADN amplificado correspondiente a las muestras de los tratamientos que contienen los controles, recogidas el tercer día de fermentación, sobre un gel de poliacrilamida. ....	98
Figura 31. Resultados obtenidos en la digestión del ADN amplificado correspondiente a las muestras de los tratamientos que contienen las levaduras nativas recogidas el sexto día de fermentación, sobre un gel de poliacrilamida. ....	98
Figura 32. Resultados obtenidos en la digestión del ADN amplificado correspondiente a las muestras de los tratamientos que contienen los controles, recogidas el sexto día de fermentación, sobre un gel de poliacrilamida. ....	98
Figura 33. Resultados obtenidos en la digestión del ADN amplificado correspondiente a las muestras de los tratamientos que contienen las levaduras nativas recogidas el octavo día de fermentación, sobre un gel de poliacrilamida. ....	99
Figura 34. Resultados obtenidos en la digestión del ADN amplificado correspondiente a las muestras de los tratamientos que contienen los controles, recogidas el octavo día de fermentación, sobre un gel de poliacrilamida. ....	99
Figura 35. Diagrama de Gantt: planificación temporal del trabajo. ....	119
Figura 36. Diagrama circular de los costes desglosados del proyecto en porcentajes. ....	122

# Capítulo 12.

## ÍNDICE DE TABLAS



Tabla 1. Concentraciones de los principales ácidos grasos volátiles producidos durante la fermentación alcohólica y aroma característico. ....	42
Tabla 2. Concentraciones de los principales alcoholes superiores producidos durante la fermentación alcohólica y aroma característico. ....	42
Tabla 3. Concentración en vino y aroma característico de los principales ésteres producidos durante la fermentación alcohólica. ....	43
Tabla 4. Concentración en vino y aroma característico de los principales compuestos carbonílicos producidos durante la fermentación alcohólica. ....	44
Tabla 5. Concentración en vino y aroma de los principales compuestos azufrados producidos por levaduras durante la fermentación alcohólica. ....	44
Tabla 6. Esquema de los tratamientos realizados. ....	56
Tabla 7. Esquema de realización de ensayo de medición de etanol con kit enzimático. ....	59
Tabla 8. Resultados acidez total. ....	81
Tabla 9. Resultados sulfuroso total y libre. ....	81
Tabla 10. Concentraciones de cada levadura para cada uno de los tratamientos de fermentación. ....	82
Tabla 11. Resultados de acidez total. ....	89
Tabla 12. Resultados sulfuroso libre y total. ....	90
Tabla 13. Costes de material. ....	120
Tabla 14. Coste de equipos. ....	121
Tabla 15. Presupuesto final del proyecto. ....	122





