



---

# Universidad de Valladolid

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE  
INGENIERÍAS AGRARIAS

GRADO EN ENOLOGÍA

## **Evaluación del potencial enológico del empleo de cultivos mixtos con levaduras no-*Saccharomyces* seleccionadas en la elaboración de Verdejo**

Alumna:

Fernández Estévez, Irene

Tutoras:

Ruipérez Prádanos, Violeta  
Vila Crespo, Josefina

Palencia, 2020.

## ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. ANTECEDENTES DEL ESTUDIO .....	5
4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	5
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
5.1 Microorganismos.....	6
5.1.1. Levaduras.....	6
5.1.2. Mantenimiento y cultivo de los microorganismos .....	6
5.2 Escalado de levaduras .....	7
5.3 Medios de cultivo.....	7
5.3.1. Mosto.....	7
5.3.2. Medio YEPD .....	7
5.3.3. Medio de lisina modificado.....	8
5.4 Procesado de la vendimia y preparación del mosto.....	8
5.5 Siembra y fermentación de los mostos.....	8
5.6 Seguimiento de la fermentación alcohólica.....	8
5.7 Toma de muestras durante el proceso fermentativo.....	9
5.7.1. Recuentos de población de levaduras .....	9
5.7.2. Estudios de implantación de levaduras .....	9
5.8 Analíticas del mosto y del vino .....	11
5.8.1. Analítica básica.....	11
5.9 Análisis estadístico.....	13
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
6.1 Justificación de la elección de levaduras.....	13
6.2 Cinética fermentativa.....	13
6.3 Control de la población de levaduras.....	16
6.4 Identificación de levaduras .....	18
6.4.1. Identificación de levaduras por medio de lisina .....	18
6.4.2. Identificación de levaduras por secuenciación .....	19
6.4.3. Identificación de levaduras por PCR .....	19
6.5 Analítica básica .....	22
7. CONCLUSIONES .....	26
8. REFERENCIAS .....	27
ANEXOS	

## 1. RESUMEN

Aunque tradicionalmente se han empleado levaduras del género *Saccharomyces* en los procesos de vinificación, la tendencia de los últimos años dentro de la industria enológica ha sido optar por la utilización de levaduras no-*Saccharomyces* en la elaboración de los vinos, buscando de este modo mejorar diferentes aspectos de los mismos. Se han llevado a cabo numerosas investigaciones, centrándose principalmente en el estudio de estas levaduras durante las primeras fases de la fermentación y obteniéndose resultados muy positivos, demostrando que pueden llegar a ser consideradas como elementos de un elevado interés enológico.

En el presente estudio se han realizado una serie de vinificaciones mediante la siembra secuencial de diferentes levaduras no-*Saccharomyces* y *Sacharomyces* previamente aisladas, seleccionadas y caracterizadas tanto enzimática como bioquímicamente, para evaluar sus características enológicas en bodega. Estas levaduras proceden de un mismo viñedo de la variedad Verdejo perteneciente a una bodega de la D.O. Rueda, aisladas durante las vendimias de los años 2010 a 2012.

## ABSTRACT

Although yeasts of the *Saccharomyces* genus have traditionally been used in winemaking processes, the trend in the last few years in wine industry has been to opt for the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking, thus seeking to improve different aspects of the wines. A great deal of research has been carried out, focusing mainly on the study of these yeasts during the first phases of fermentation and very positive results have been obtained, showing that they can be considered as elements of high oenological interest.

In the present study, some vinifications have been carried out through sequential inoculation of different non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts previously isolated, selected and characterized enzymatically and biochemically, in order to be able to verify in the winery their enological characteristics. These yeasts come from the same Verdejo variety vineyard belonging to a winery from D.O. Rueda, isolated during the 2010 to 2012 harvests.

## 2. INTRODUCCIÓN

La fermentación alcohólica es el proceso mediante el cual las levaduras transforman el azúcar del mosto, generando etanol y dióxido de carbono, además de otros metabolitos secundarios que contribuyen a modificar las características sensoriales del vino (Gutiérrez, A., Boekhout, T., Gojkovic, Z., Katz, M., 2018). Aunque el inicio de la fermentación es liderado por una amplia población de levaduras del género no-*Saccharomyces*, éstas mueren progresivamente con el aumento de la concentración de etanol en el medio, a la vez que se imponen aquellas que tienen mayor poder fermentativo, generalmente *Saccharomyces cerevisiae* (Bagheri, B., Zambelli, P., Vigentini, I., Bauer, F.F., Setati, M.E., 2018), que es la principal responsable de este proceso.

Durante muchos años, las levaduras del género no-*Saccharomyces* han sido consideradas como microorganismos perjudiciales. Sin embargo, recientemente, debido a sus contribuciones en la calidad de los vinos, el interés por estas especies se ha visto incrementado (Roca-Mesa, H., Sendra, S., Mas, A., Beltran, G., 2020). Este interés se centra, principalmente, en aquellas cepas que predominan en los inicios de la fermentación y que aparecen en una proporción significativa durante esta fase (Mateus, D., Sousa, S., Rogerson, F.S., 2020).

Tradicionalmente, se han llevado a cabo fermentaciones espontáneas con el objetivo de que levaduras no-*Saccharomyces* condujeran las primeras etapas del proceso, puesto que pueden introducir variaciones sensoriales en el vino que resulten de interés para la industria enológica (Oliverira, I. & Ferreira, V., 2019). A este respecto, se considera que, generalmente, las fermentaciones mixtas desarrolladas con diferentes cepas y especies de levaduras en el inicio del proceso, mejoran ciertas características del vino como la complejidad, la sensación en boca o el perfil aromático (Petruzzi, L., et al., 2017), que se ve modificado en función del método de inoculación y las condiciones de fermentación (Nisiotou, A., Mallouchos, A., Tassou, C., Banilas, G., 2019). Actualmente, la siembra de cultivos puros de levaduras en el mosto proporciona un mayor control del proceso y garantiza una fermentación rápida y completa; como resultado, facilita la reproducibilidad del producto final y le otorga calidad (Gutiérrez, A., et al., 2018).

Recientemente, los productores de vino han comenzado a dar importancia a la elaboración de vinos de calidad que pongan de manifiesto las características geográficas de la zona de origen (Padilla, B. et al., 2016). Tanto el clima, como el suelo y la variedad de la uva definen el *terroir* de cada zona vitícola (Padilla, B. et al., 2016), pero en base a estas condiciones climáticas también puede verse afectado el *terroir microbiológico*, como puede ser a través de la humedad relativa o las lluvias, teniendo estos factores gran influencia en la carga microbiológica de levaduras no-*Saccharomyces* (Jara, C., Laurie, V. F., Mas, A. & Romero, J., 2016). Es por esto por lo que el perfil obtenido en diferentes zonas vitícolas varía y no se encuentran zonas con perfiles idénticos, aunque sí puedan observarse ciertas similitudes (Jara, C. et al., 2016).

Con el objetivo de poder reflejar un *terroir* determinado, es necesario poder reproducir de forma industrial esa huella microbiana que aparece a lo largo del proceso fermentativo, de modo que se eviten los riesgos tanto microbiológicos como tecnológicos que pueden llegar a ser frecuentes en las fermentaciones espontáneas (Padilla, B. et al., 2016). Es por eso que se han realizado gran número de estudios con el fin de obtener aislados de levaduras no convencionales que impriman el carácter de la tierra en los vinos.

De forma paralela a la búsqueda de identidad por parte de los productores, también los consumidores han comenzado a demandar vinos novedosos (Petruzzi, L. et al., 2017), reprobando la falta de complejidad, tipicidad y distinción de algunos de ellos (Binati, R. L., 2019). Las levaduras del género no-*Saccharomyces* poseen actividades enzimáticas

que pueden contribuir en muchos de los parámetros de calidad final del vino (Petruzzi, L. et al., 2017). Sin embargo, estas levaduras no pueden fermentar hasta conseguir consumir la totalidad de los azúcares presentes en el mosto, por lo que deben ser inoculados posteriormente con una levadura del género *Saccharomyces* (Petruzzi, L. et al., 2017; Lin, M. M. et al, 2019).

El potencial enzimático de estas levaduras las convierte en una herramienta muy útil para mejorar las características organolépticas de los vinos, a pesar de su bajo poder fermentativo (Belda, I. et al., 2016). Estas levaduras pueden liberar al medio gran cantidad de enzimas hidrolíticas, contribuyendo significativamente a aumentar la complejidad de los vinos (Belda, I. et al., 2016). Aunque *Saccharomyces cerevisiae* también es capaz de liberar enzimas que puedan transformar compuestos neutros en aromáticos (Maturano, Y. P. et al., 2012), actividades enzimáticas como la  $\beta$ -glucosidasa están íntimamente ligadas a levaduras no-*Saccharomyces* (Lin, M. M. et al, 2019).

Actividades como la  $\beta$ -glucosidasa,  $\beta$ -liasa y proteasa son consideradas como propiedades de interés enológico (Lin, M. M. et al, 2019). La actividad  $\beta$ -glucosidasa está ampliamente extendida entre la mayor parte de las levaduras, aunque cabe destacar la sintetizada por parte de las especies de *Hanseniaspora* spp. y por *Wickerhamomyces anomalus* (Belda, I. et al., 2016), en las cuales se ha detectado una actividad dominante (Swangkeaw, J., Vichitphan, S., Butzke, C. E. & Vichitphan, K., 2010). Esta actividad es la principal responsable de la liberación de terpenos a partir de sus precursores glicosilados, por lo que tanto *Hanseniaspora* spp. como *W. anomalus* pueden constituir una herramienta muy útil en vinificación (Belda, I. et al., 2016). Además, en el caso de *W. anomalus*, se ha observado una menor represión como consecuencia de unos niveles altos de glucosa o etanol en el medio (Belda, I. et al., 2016).

En cuanto a la actividad  $\beta$ -liasa, responsable de poner de manifiesto el aroma varietal de los vinos, se ha demostrado que el género *Hanseniaspora* es aquel en que mayor actividad presenta, destacando *H. osmophila*, con los valores más elevados del género (Belda, I. et al., 2016). Esta podría ser una alternativa frente a la problemática que se presenta debido a la represión que sufre esta actividad en el caso de *S. cerevisiae* con niveles elevados de nitrógeno (Belda, I. et al., 2016).

Respecto a la actividad proteasa, ampliamente generalizada en las poblaciones microbianas de los mostos, se ha observado cómo las especies de *Hanseniaspora* spp. son aquellas en las que se encuentra en mayor porcentaje y cómo *W. anomalus* refleja una actividad muy elevada (Belda, I. et al., 2016). Esto podría constituir una nueva forma de prevención para las precipitaciones proteicas de los vinos, hasta ahora controladas con bentonita. Sin embargo, la bentonita generalmente influye de forma negativa en las características sensoriales de los vinos, por lo que el empleo de levaduras con actividad proteasa podría suponer una nueva alternativa a este problema (Belda, I. et al., 2016).

Las actividades enzimáticas de las levaduras pueden verse afectadas por diferentes parámetros ambientales, como pueden ser el pH y la temperatura o la presencia de inhibidores como los azúcares o el etanol (Maturano, Y. P. et al., 2012). Si bien el contenido en glucosa no afecta negativamente a estas actividades (Maturano, Y. P. et al., 2012), tanto el etanol como el pH o el contenido en compuestos nitrogenados sí lo hacen. Las enzimas  $\beta$ -glucosidasa producidas particularmente por *Wickerhamomyces* spp. y *Hanseniaspora* spp., han reflejado actividad positiva en presencia de valores estándar tanto de pH como de etanol en el medio (López, M. C., Mateo, J. J. & Maicas, S., 2015), por lo que estos géneros son altamente prometedores. Por su parte, la cinética de la síntesis de estas enzimas es máxima cuando se han agotado los nutrientes. Generalmente, las enzimas son sintetizadas en el momento en que las levaduras se encuentran en la fase de crecimiento exponencial y la concentración de estos nutrientes es el factor metabólico limitante (López, M. C., 2015). La percepción en

nariz de los aromas liberados como resultado de la mencionada actividad enzimática, tanto directamente como por vía retronasal, es una de las principales características para la distinción de los vinos (Swangkeaw, J., 2010). Esta percepción depende en gran medida de la matriz del vino, de modo que la apreciación de muchos de los compuestos minoritarios puede verse enmascarada por la presencia de otros mayoritarios, como ésteres o alcoholes superiores (Ruiz, J. et al., 2018).

La variedad de uva Verdejo presenta un perfil muy complejo, con una gran riqueza aromática. El perfil sensorial de los vinos Verdejo, evaluado por paneles de catadores expertos, ha sido definido como fresco, cítrico, frutal, con notas de manzana verde y descriptores de frutas tropicales (Sánchez-Palomo, E., Alonso-Vilegas, R. & Gonzáles Viñas, M. A., 2014). Por lo tanto, los aromas varietales de Verdejo, tiólicos y terpénicos principalmente, derivan de precursores no volátiles liberados durante la fermentación (Ruiz, J. et al., 2018) por el conjunto de enzimas descritas anteriormente.

Con el objetivo de alcanzar la máxima expresión de estos aromas varietales, el empleo de diferentes cepas de levaduras no-*Saccharomyces* en combinación con otras de la especie *S. cerevisiae*, puede ser una alternativa (Ruiz, J. et al., 2018), puesto que no todas las cepas pertenecientes a una misma especie proporcionan las características deseadas al vino (Lin, M. M. et al, 2019). De hecho, de la combinación de las cepas empleadas en la fermentación dependerá el buen desarrollo de la misma, puesto que durante este proceso las levaduras, además de etanol, producen metabolitos secundarios, algunos de ellos ácidos grasos de cadena corta o media, que pueden convertirse en compuestos inhibidores para el desarrollo de otras especies, incluida *S. cerevisiae* (Albergaria, H., Francisco, D., Gori, K., Arneborg, N. & Gírio, F., 2009). La producción de estos metabolitos varía significativamente con cada especie y cepa (Albergaria, H. et al., 2009).

Del mismo modo en que las cepas de levadura elegidas son decisivas tanto para el transcurso de la fermentación como para los aromas producidos, también lo son las condiciones de cultivo de las levaduras. Cada variación en estas condiciones conduce a un perfil aromático particular (Maturano, Y. P. et al., 2012). Por ello, es necesario, por un lado, definir las estrategias de inoculación a seguir y, por otro, conocer tanto las interacciones que se vayan a producir entre las diferentes cepas que van a llevar a cabo la fermentación como el impacto de la actividad enzimática en el perfil aromático del vino (Maturano, Y. P. et al., 2012).

Sin embargo, todos los resultados obtenidos en laboratorio y recogidos en la bibliografía han de ser puestos en práctica y corroborados en un ambiente con condiciones no estériles, de modo que se determine si las levaduras estudiadas se comportan del mismo modo en bodega (Lin, M. M. et al, 2019).

### 3. ANTECEDENTES DEL ESTUDIO

Este estudio forma parte de un proyecto de investigación realizado en la E.T.S. de Ingenierías Agrarias de Palencia basado en la selección de levaduras autóctonas de un viñedo de la variedad Verdejo en la D.O. Rueda durante las vendimias de 2010 a 2012.

El aislamiento de las levaduras se realizó en diferentes fases de la vinificación en bodega: mosto de uva recién estrujado (MURE), mosto desfangado (MDB), inicio de fermentación (IFB), fermentación tumultuosa (FTB) y final de fermentación (FFB).

Con el objetivo de obtener aislados puros de estas levaduras se realizaron siembras en masa de los mostos. Estas siembras se incubaron entre 48-72 h a una temperatura de 28 °C y posteriormente, seleccionando una sola colonia cada vez, se realizaron pases a placas sembrados en estría.

Del total de los 484 aislados obtenidos, sólo 55 de ellos pertenecían a levaduras del género no-*Saccharomyces*. Para la identificación a nivel de especie de las levaduras no-*Saccharomyces* se realizaron análisis moleculares en el Laboratorio de Técnicas Moleculares perteneciente al Laboratorio de Técnicas Instrumentales (L.T.I) de la Universidad de León.

Una vez aisladas e identificadas, se seleccionaron únicamente las levaduras no-*Saccharomyces* que podían ser de interés para la vinificación (*Wickerhamomyces anomalus*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia guilliermondii*, *Hanseniaspora osmophila*, *Hanseniaspora meyeri* y *Torulaspota delbrueckii*). Las levaduras seleccionadas fueron caracterizadas tanto enzimática como bioquímicamente, de manera que se identificaron aquellas con un potencial enzimático para la mejora de las características organolépticas (Izquierdo, L., 2019).

Por otro lado, la caracterización molecular de las levaduras pertenecientes al género *Saccharomyces* se realizó mediante el análisis de ADN mitocondrial, lo que determinó la presencia de 54 aislados genéticamente diferentes. Para este trabajo se seleccionaron aquellas que aparecían mayoritariamente en todas las etapas del proceso de vinificación, en las tres parcelas estudiadas y durante las dos vendimias en las que se realizó el muestreo.

### 4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El siguiente estudio tiene como objetivo conocer y valorar el interés enológico de diferentes cepas de levaduras *S. cerevisiae* y no-*Saccharomyces* aisladas en un mismo viñedo de la D.O. Rueda. La aptitud enológica de estas cepas se definirá en base a las características de los vinos obtenidos como resultado de diferentes vinificaciones de la variedad Verdejo llevadas a cabo mediante inoculación secuencial.

Para ello, se proponen una serie de objetivos específicos:

- Estudio de la cinética fermentativa de las vinificaciones con diferentes cepas de *S. cerevisiae* y comparación con las realizadas mediante inoculación secuencial no-*Saccharomyces* / *Saccharomyces*.
- Estudios de implantación de las levaduras en diferentes fases de la vinificación.
- Estudio de los parámetros finales de los vinos obtenidos mediante la realización de una analítica básica.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Microorganismos

#### 5.1.1. Levaduras

Para la realización de este estudio se utilizaron dos cepas de levaduras no-*Saccharomyces* y dos cepas de *S. cerevisiae* procedentes del aislamiento realizado previamente de la vinificación de Verdejo en una bodega de la D.O. Rueda. Las levaduras no-*Saccharomyces* empleadas, *Wickerhamomyces anomalus* (WA) y *Hanseniaspora osmophila* (HO), fueron elegidas de entre un total de 36 cepas en un estudio anterior (Izquierdo, L., 2019), puesto que presentaron características enológicas de interés. Las fermentaciones secuenciales se llevaron a cabo con dos cepas de *S. cerevisiae* procedentes del aislamiento de la vinificación de Verdejo de la D.O. Rueda, SC1 y SC2. Como control, se utilizó la cepa comercial WAM (Lallemand), aislada también a partir de mosto Verdejo de la misma D.O. Paralelamente a las fermentaciones secuenciales, se realizaron vinificaciones sólo con *S. cerevisiae* WAM (Lallemand), SC1 y SC2.



Figura 1. Tubos de agar inclinado con los aislados de cada una de las cepas de levadura que se emplearon en el estudio.

#### 5.1.2. Mantenimiento y cultivo de los microorganismos

Con el objetivo de evitar contaminaciones, todos los procesos de manipulación de levaduras se llevaron a cabo en una cabina de flujo laminar (INDELAB).

Para el cultivo de microorganismos se empleó medio sólido YEPD (descrito en 5.3.2) en placas de Petri o agar inclinado. Una vez se hubieron realizado las siembras, éstas se incubaron en la estufa a una temperatura de 21 °C.

Para conseguir la biomasa necesaria para realizar las siembras que darían comienzo a la fermentación alcohólica se realizó un escalado de levaduras, descrito en 5.2.



## 5.2 Escalado de levaduras

El escalado de levaduras es el método por el cual se busca conseguir la cantidad de biomasa suficiente para poder sembrar posteriormente los mostos del estudio. Este escalado se llevó a cabo con mosto de la variedad Verdejo obtenido en la vendimia de 2018 y congelado hasta su utilización.

El escalado se realizó en dos etapas y en una proporción de 1:10, para asegurar una concentración de levaduras adecuada para la inoculación de los ensayos. En primer lugar, se sembraron tubos de ensayo y se llevaron a la estufa a 21 °C. Posteriormente, estos tubos se llevaron a matraces Erlenmeyer, con los que se sembraron después los botellones para los ensayos de vinificación.

## 5.3 Medios de cultivo

### 5.3.1. Mosto

El mosto utilizado en el escalado de levaduras se obtuvo de uva de la variedad Verdejo, recogida de la vendimia del año 2018, procesada en la bodega de la E.T.S. de Ingenierías Agrarias de Palencia y congelado hasta su uso. Este mosto fue esterilizado a vapor fluyente durante 20 minutos antes de su inoculación.

Por otro lado, el mosto destinado a las fermentaciones se obtuvo del procesado de la uva (5.4) de variedad Verdejo proveniente de un viñedo ubicado en el municipio de Trigueros del Valle, perteneciente a la D.O. Cigales, y recogido en la vendimia de 2019. Este mosto fue analizado por duplicado en base a las metodologías descritas en 5.8.1, obteniéndose como resultados: densidad 1190 g/L; 24 °Brix; grado alcohólico probable 15,0 %vol.; pH 3,33; acidez total =4,1 ± 0,1 g/L; SO<sub>2</sub> libre =14 ± 1 mg/L y SO<sub>2</sub> total = 27 ± 2 mg/L.

### 5.3.2. Medio YEPD

Este medio (extracto de levadura-peptona-dextrosa) se usó para la conservación de las levaduras en tubos de ensayo y para la realización de diferentes siembras, tanto en masa como en estría, con el objetivo de realizar recuentos o estudios moleculares de levaduras del mosto-vino en cada momento.

Se trata de un medio general para el crecimiento de levaduras elaborado a partir de 20 g/L de glucosa (Labkem), 20 g/L de peptona (Panreac), 10 g/L de extracto de levadura (Labkem) y 20 g/L de agar (BD Bacto™Agar). Previamente a su utilización, el medio fue esterilizado en autoclave durante 15 minutos a una temperatura de 121 °C.

Las muestras fueron diluidas varias veces en función de las necesidades y de la etapa en que se tomaron. Posteriormente, las diluciones más representativas se sembraron en profundidad en placas de Petri y se dejaron crecer en estufa a 21 °C hasta que las colonias se hubieron desarrollado lo suficiente. En el caso de las muestras destinadas al estudio molecular, con el objetivo de conseguir cultivos puros, se escogieron al azar varias colonias (la cantidad fue variable en función de la etapa de la fermentación y del tipo de tratamiento que se fuese a realizar posteriormente) y se sembraron en estría en placas de Petri individuales, también en medio YEPD.

### 5.3.3. Medio de lisina modificado

Para comprobar la presencia de levaduras no-*Saccharomyces*, previa secuenciación, se utilizó el medio de lisina, que permite únicamente el crecimiento de aquellas levaduras pertenecientes al género no-*Saccharomyces* (Resolución OIV/OENO 206/2010).

Este medio se elaboró en base a la Resolución OIV/OENO 206/2010, cuya modificación es la esterilización a vapor fluyente durante 20 minutos de una única solución con todos los componentes: 1,18% (p/v) base carbonatada de levaduras (Panreac), 0,25% (p/v) lisina-HCl (Panreac) y 2% (p/v) agar (BD Bacto™ Agar).

## 5.4 Procesado de la vendimia y preparación del mosto

La recepción de la uva se realizó en la bodega de la ETSIIAA de Palencia, donde se procesó según lo descrito a continuación. En primer lugar, se despallilló mediante una despalladora de paletas sin dañar la uva. Posteriormente, esta uva sufrió un ligero estrujado con una estrujadora de rodillos. Por último, se procedió al prensado, en el que se empleó una prensa horizontal de membrana parietal a una presión de 1,6 bar., repitiendo el proceso un total de 3 veces.

Una vez obtenido el mosto, se sulfitó a razón de 20 mg/L de sulfuroso libre y se llevó a una cámara de refrigeración a 4 °C de temperatura durante 24 h para su desfangado.

## 5.5 Siembra y fermentación de los mostos

Tras el desfangado del mosto, y habiendo esterilizado previamente los botellones en los que se iban a realizar las fermentaciones, se procedió a su trasiego y repartición en los 18 recipientes. El contenido de cada uno de ellos fue, aproximadamente, de 4 L.

En el momento en que el mosto estuvo atemperado, se llevó a cabo la siembra de las levaduras *S. cerevisiae* (WAM, SC1 y SC2) en los depósitos control y de las no-*Saccharomyces* (WA y HO) en los depósitos correspondientes. Los ensayos se realizaron por duplicado. Los botellones se recubrieron de papel de aluminio con el objetivo de evitar oxidaciones por la iluminación y evitar también la entrada de cualquier tipo de insecto u objeto por las boquillas de los mismos.

Transcurridas 48 h de la primera siembra, se procedió a la inoculación de las levaduras *S. cerevisiae* en los depósitos destinados a la fermentación con cultivo mixto de levaduras *S. cerevisiae* y no-*Saccharomyces*.



Figura 2. Depósito de fermentación.

## 5.6 Seguimiento de la fermentación alcohólica

Con el fin de controlar la fermentación y de poder conocer la cinética fermentativa al final del proceso, se llevaron a cabo consecutivas mediciones tanto de temperatura como de densidad de los mostos durante el proceso.

Con el objetivo de no contaminar las muestras con otras levaduras, y puesto que el volumen con el que se trabajó era pequeño, se decidió medir la densidad mediante pesadas consecutivas de un volumen de 10 mL. Las medidas obtenidas sirvieron de

orientación para conocer el estado del proceso fermentativo e identificar el final del mismo cuando se lograra una estabilidad en los datos de densidad.

## 5.7 Toma de muestras durante el proceso fermentativo

### 5.7.1. Recuentos de población de levaduras

A lo largo del proceso fermentativo se realizaron tomas de muestras para conocer el orden de población de levaduras en el mosto-vino. Estos muestreos se realizaron mediante la siembra en profundidad en placas de diferentes diluciones del mosto. Las diluciones decimales seriadas se realizaron en solución salina peptonada (1 g/L peptona (Panreac), 8 g/L cloruro sódico (Sigma), pH 7,0 ± 0,2).

Tras dejar crecer las levaduras sembradas en medio YEPD, se realizó el recuento de las colonias y se pudo estimar la población (UFC/mL) en cada uno de los depósitos y en cada una de las fases de la fermentación.

Estas muestras se tomaron al inicio de fermentación (transcurridas 48 h), a mitad de fermentación (coincidiendo con la fase de fermentación tumultuosa) y, por último, una vez que esta hubo finalizado, con el objetivo de conocer la población residual de levaduras presentes en los vinos.



Figura 3. Placa de Petri con medio YEPD que ha sido sembrada en profundidad.

### 5.7.2. Estudios de implantación de levaduras

Con el objetivo de comprobar la especie predominante en la fermentación del mosto en cada momento, se realizaron varios análisis en diferentes etapas del proceso fermentativo:

#### 5.7.2.1 Toma de muestras

Una vez transcurridas 48h de la siembra de levaduras *S. cerevisiae* en los depósitos control y de no-*Saccharomyces* en el resto, se tomaron muestras con el fin de comprobar su correcta implantación. Se tomaron 6 muestras de cada uno de los depósitos sembrados con *S. cerevisiae* y 6 muestras de dos de los depósitos al azar sembrados tanto con *W. anomalus* como con *H. osmohila*, obteniéndose un total de 60 colonias para analizar (36 de *S. cerevisiae* y 24 de no-*Saccharomyces*).

Las muestras pertenecientes a las inoculaciones secuenciales (no-*Saccharomyces*) se enviaron a secuenciar al L.T.I. de León y, paralelamente, se sembraron en medio de lisina en el laboratorio. La secuenciación desarrollada en el L.T.I. de León se basó en la amplificación del ADN de cada uno de los aislados, amplificándose la región de interés (D1/D2). Posteriormente, esta región se purificó y se procedió a su secuenciación. La identificación de las levaduras se realizó mediante comparación con las bases de datos.

Por otro lado, las muestras de *S. cerevisiae* se conservaron en medio YEPD hasta su estudio mediante PCR en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Valladolid mediante la técnica PCR Interdelta.

Durante la fase tumultuosa de la fermentación se tomaron muestras de 3 colonias de cada uno de los 6 los depósitos inoculados con *S. cerevisiae*, con el objetivo de poder comprobar posteriormente mediante PCR el desarrollo de la fermentación.

Una vez finalizada la fermentación se tomaron muestras de nuevo. De forma paralela a las siembras en medio YEPD, se realizaron siembras en medio de lisina para comprobar que el género de las levaduras que terminaron la fermentación de los vinos pertenecían a la especie *S. cerevisiae*. Estas muestras se analizaron también mediante PCR en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Valladolid.

En este caso, se tomaron tres muestras de cada uno de los 18 depósitos que habían realizado la fermentación, obteniéndose un total de 54 levaduras (18 de los depósitos control y 36 de los depósitos con siembra secuencial).

#### 5.7.2.2 Análisis molecular

Para la amplificación por PCR de la región Interdelta 1-2 se utilizaron los primers Delta 12 (5'-TCA ACA ATG GAA TCC CAA C-3') y Delta 21(5'-CAT CTT AAC ACC GTA TAT GA-3') 1  $\mu$ M. Como reactivos se emplearon: buffer PCR+MgCl<sub>2</sub> 1X, Dream Taq Polimerasa 1 U/reacción (Thermo Scientific) y dNTPs MIX 0,8 mM hasta completar un volumen de reacción de 25  $\mu$ L.

Las condiciones de termociclado (Mastercycler Eppendorf) fueron de 1 ciclo a 95 °C durante 4 min, 35 ciclos a 95 °C durante 30 s, 46 °C durante 30 s y 72 °C durante 90 s y un último ciclo a 72 °C durante 10 min.

Los productos de la PCR-Interdelta 1-2 se resolvieron en un gel de agarosa al 2 % (p/v) en TAE (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) 1X, de dimensiones 15x18 cm, con tres peines de 20 pocillos. Se utilizó TAE 1X como buffer de electroforesis y se aplicó una corriente de 120 V. El tiempo estimado de electroforesis fue de 2 h. En cada uno de los peines del gel se reservaron dos pocillos, uno al inicio y otro al final del carril, para el marcador de peso molecular 100 bp ladder (BIOTOOLS).

Posteriormente a la electroforesis, se realizó una tinción del gel con GelRed 10000X (Biotium) a una concentración final de 1X.

La visualización de los geles de agarosa y la captura de imágenes se realizó con el equipo Gel ChemiDoc (Bio-Rad), asociado al software Quantity One (Bio-Rad).

## **5.8 Analíticas del mosto y del vino**

### **5.8.1. Analítica básica**

#### **5.8.1.1 Acidez total y pH**

Las medidas de pH se realizaron mediante pH-metro (CRISON) a 20 °C de acuerdo con la resolución OIV-MA-AS313-15 del 2011 (Barceló, G., 1990). En cuanto a la determinación de la acidez total, se llevó a cabo siguiendo el método potenciométrico (OIV/OENO380/2009), por el cual se procedió a la valoración de la muestra de mosto o vino con NaOH 0,1 N hasta que el pH-metro marcara pH =7,00. De ambos parámetros se realizaron mediciones por duplicado.

La acidez total se expresa en g/L de ácido tartárico.

#### **5.8.1.2 Acidez volátil**

Una vez finalizada la fermentación alcohólica se determinó la acidez volátil por el método de García Tena (Barceló, G., 1990). Este método se basa en una destilación fraccionada de un volumen de 11 mL de vino recogiendo dos porciones de destilado. La primera, de 5,1 mL, se retira. La segunda, de 3,2 mL, se valora con NaOH 0,01 N. Para realizar el método se utilizó un destilador automático GAB. Las medidas se realizaron por duplicado.

La acidez volátil se expresa como g/L de ácido acético.

#### **5.8.1.3 Sulfuroso libre y total**

Tanto el sulfuroso libre como el total se realizaron utilizando un analizador de sulfuroso automático (SO<sub>2</sub>-MATIC, CRISON). Se trata de un analizador que lleva a cabo el método Ripper automatizado. En este caso las mediciones también fueron llevadas a cabo por duplicado. Se expresan como mg/L de SO<sub>2</sub>.

#### **5.8.1.4 Azúcares reductores**

El total de azúcares reductores presentes en el vino se determinó según el procedimiento de Rebelein (Barceló, G., 1990), que consiste en provocar la reacción de los azúcares con las sales cúpricas en una solución alcalina y en presencia de calor.

El procedimiento consiste en añadir 2 mL de vino (agua destilada en caso del blanco), 1 mL de solución cúprica y 5 mL de solución alcalina de sal de Seignette, además de introducir también en el matraz perlas de vidrio. Esta disolución ha de hervir durante 2 minutos y enfriarse bajo un chorro de agua fría. A continuación, se añaden los reactivos según indica la metodología: 10 mL de KI 30%, 10 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 16% (p/v) y 2 mL de almidón 2%. Por último, se valora con Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> hasta obtener un viraje de la solución a un color marfil.

El resultado de azúcares reductores de la muestra se obtuvo de la diferencia del volumen de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> gastado en la valoración del blanco y la de la muestra de vino, expresada en g/L de azúcar residual.

En este caso, y siguiendo la legislación de la D.O. Rueda, que estipula en su pliego de condiciones (PDO-ES-A0889) que en cuanto al parámetro de azúcares totales registrarán

las limitaciones fijadas por la normativa comunitaria (Resolución OENO 377/2009), se considerará un vino seco siempre y cuando contenga una cantidad inferior a los 5 g/L.



Figura 4. Resultado color marfil de azúcares reductores por método Rebelein.



Figura 5. Coloración roja que indica azúcares reductores >28 g/L.

#### 5.8.1.5 Grado alcohólico

Al recibir la uva de la vendimia se estimó el grado alcohólico probable que podría alcanzar el vino una vez hubiera finalizado la fermentación mediante el método refractométrico (Barceló, G., 1990).

El grado alcohólico de los vinos se determinó mediante ebulloimetría (Barceló, G., 1990). Este método se fundamenta en la diferencia entre los puntos de ebullición del agua (100 °C) y del alcohol (78 °C). Consiste en determinar el punto de ebullición del agua destilada y de las muestras de vino y, llevando estos valores a las regletas de lectura directa, leer el grado alcohólico del vino. En este caso, debido a la alta precisión del método ( $\pm 0,1$  °C), únicamente se realizó una repetición.

#### 5.8.1.6 Nitrógeno fácilmente asimilable

El nitrógeno fácilmente asimilable (NFA) se determinó siguiendo el método Sorensen (Barceló, G., 1990), por el cual el nitrógeno amónico y  $\alpha$ -amino reacciona con formaldehído liberando 2 protones, valorados con hidróxido sódico. En primer lugar, se ajusta el pH de la solución de formaldehído con NaOH 0,1 N hasta llegar a pH 8,5. Una muestra de 10 mL de vino se ajusta también a pH 8,5 con NaOH 0,1 N. Una vez ajustada la muestra, se añaden 4 mL de formaldehído y se homogeneiza la solución. Transcurrido 1 minuto a temperatura ambiente se procede a la valoración de la mezcla, de nuevo con NaOH 0,1 N.

El NFA, expresado en mg de N/L es el resultado de multiplicar por 14 el índice de formol, donde:

$$\text{Índice de formol} = \text{mL NaOH gastados} \cdot 0,1 \cdot f \cdot 1000 / V_{\text{vino}}$$

## 5.9 Análisis estadístico

El tratamiento estadístico se llevó a cabo utilizando el programa Statgraphics Centurion XVII (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, USA), mediante la realización de un análisis de varianza (ANOVA) ( $p < 0,05$ ). Las diferencias entre muestras estadísticamente significativas se determinaron por el test LSD de Fisher (Least Significant Difference) ( $< 0,05$ ). Los datos se expresan como la media aritmética  $\pm$  desviación de la muestra.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Justificación de la elección de levaduras

Para este estudio se eligieron tres cepas diferentes de levaduras del género *S. cerevisiae* (SC1, SC2 y WAM) y dos del género no-*Saccharomyces* (HO y WA) con el objetivo de realizar combinaciones entre ellas y estudiar tanto su comportamiento en bodega durante el proceso fermentativo como las características físico-químicas de los vinos obtenidos.

Las cepas *S. cerevisiae* se eligieron, principalmente, por aparecer de forma mayoritaria durante las dos vendimias realizadas, en todas las parcelas muestreadas y a lo largo de todas las fases de fermentación del mosto. La frecuencia de aparición de las cepas SC1 y SC2 en los aislados fue del 31% y 21% del total de los aislados, respectivamente. Por otro lado, la cepa WAM se escogió por conocer su comportamiento en bodega y por presentar características probadas para la vinificación en blancos.

Por su parte, las cepas de levaduras no-*Saccharomyces*, previamente estudiadas en nuestro laboratorio, se seleccionaron en base a las actividades enzimáticas que presentan, así como por su carácter *killer* y por su buena cinética fermentativa (Izquierdo, I., 2019).

Tabla 1. Características principales de las levaduras HO y WA escogidas para el estudio. La actividad enzimática positiva aparece reflejada con + y la negativa con -.

	Actividad proteasa	Actividad $\beta$ -liasa	Actividad $\beta$ -glucanasa	Actividad $\beta$ -glucosidasa	Carácter <i>killer</i>	% vol. alcanzable
HO	+	+	-	-	Neutra	11,6
WA	+	+	+	+	Neutra	2,5

### 6.2 Cinética fermentativa

El estudio de la cinética fermentativa de las levaduras se realizó determinando la densidad de los mostos de forma periódica. Puesto que se conocía la aptitud de las cepas de *S. cerevisiae* en cuanto al arranque y evolución de la fermentación, se compararon los datos de estas levaduras con los obtenidos en las inoculaciones secuenciales con HO y WA.

Si bien a través de este método no se obtuvieron los datos de densidad reales, se pudo conocer la tendencia de este parámetro y estimar el fin de fermentación cuando los valores alcanzasen la estabilidad. Se priorizó mantener los depósitos sin contaminaciones por otras levaduras, que hubieran sesgado los resultados del estudio.

La temperatura de fermentación, tomada siempre en el momento de la medida de las densidades, osciló a lo largo del proceso desde los 10 °C al inicio de la misma hasta los 22 °C al final. Estos valores de temperatura tan dispares se explican debido a la imposibilidad del control de la temperatura en los botellones durante la fermentación y a las bajadas importantes de la temperatura ambiente durante las noches en la bodega. Sin embargo, el proceso se llevó a cabo a una temperatura de 16 °C de media.

En base a uno de los principales objetivos de la elaboración de Verdejo, como es la conservación de los aromas de los vinos elaborados, se plantearon fermentaciones llevadas a cabo a una temperatura relativamente baja (Gamero, A., Tronchoni, J., Querol, A. & Belloch, C., 2013). Es por esta razón por la que la fermentación se vio ralentizada, siendo la actividad de las levaduras más lenta de la que hubiese podido ser a una temperatura mayor (Pizarro, F. et al., 2007), alcanzando los 27 días.

La figura 6 muestra el transcurso del proceso fermentación. La primera medición se realizó transcurridas 24 h desde la siembra de los mostos y el primer descenso significativo de densidad tuvo lugar durante las siguientes 24 h. Este descenso se llevó a cabo de manera similar independientemente del tipo de levadura que se hubo inoculado. Durante este inicio de fermentación la temperatura del mosto aún era considerablemente baja; sin embargo, la respuesta de las levaduras fue positiva.

La variación de densidad durante este primer período de la fermentación fue similar en los casos de las levaduras *S. cerevisiae* y *H. osmophila*, pero ligeramente menor en el caso de los mostos fermentando con *W. anomalus*. Se observó cómo, en el caso de los mostos destinados a la inoculación del cultivo mixto con la levadura WAM, la densidad disminuyó en un orden de 130 g/L para las muestras sembradas con el control WAM y con HO, pero de sólo 95 g/L en el caso de WA. Del mismo modo ocurrió con los mostos del cultivo mixto con SC1, en los que el control de SC1 y los depósitos de HO consiguieron disminuir la densidad en 120 puntos, mientras que en el caso de WA la bajada fue de 100 g/L. Por último, en el caso de los cultivos con SC2 el descenso fue prácticamente idéntico con todas las fermentaciones. En consecuencia, se puede afirmar que, aunque con un inicio de fermentación similar, el comportamiento más semejante al llevado a cabo por *S. cerevisiae* fue el de *H. osmophila*, presentando *W. anomalus* descensos de densidad ligeramente inferiores.

Tras las primeras 48h de fermentación con las levaduras no-*Saccharomyces* se sembraron las cepas de *S. cerevisiae*, a partir de ese momento la densidad decreció de forma más discreta y constante y se prolongó durante 20 días. El último día en que se tomó muestra de las densidades se registraron ligeras oscilaciones en los valores, observándose un aumento en gran parte de las muestras. Es por ello que se decidió reubicar los depósitos para obtener una temperatura ambiente más elevada y poder, de este modo, asegurar el fin de fermentación. Por tanto, el día 27 de fermentación se confirmó el final del proceso fermentativo.

En cuanto a este final de fermentación, se observó en los tres ensayos control que *S. cerevisiae* presentó los valores de densidad más bajos, mientras que los cultivos mixtos de *H. osmophila* fueron los más elevados. Atendiendo a los valores obtenidos, los mostos fermentados únicamente con *S. cerevisiae* y aquellos fermentados por inoculación secuencial con *W. anomalus* presenta unos valores de densidad de en torno a los 970 g/L, mientras que en el caso de *H. osmophila* es del orden 980 g/L. Puesto que en un primer momento no se pudo garantizar que los depósitos sembrados con HO hubieran terminado la fermentación, se procedió al análisis de azúcares reductores para confirmarlo, obteniéndose valores superiores a 28 g/L en todas las muestras.



### Cinética fermentativa

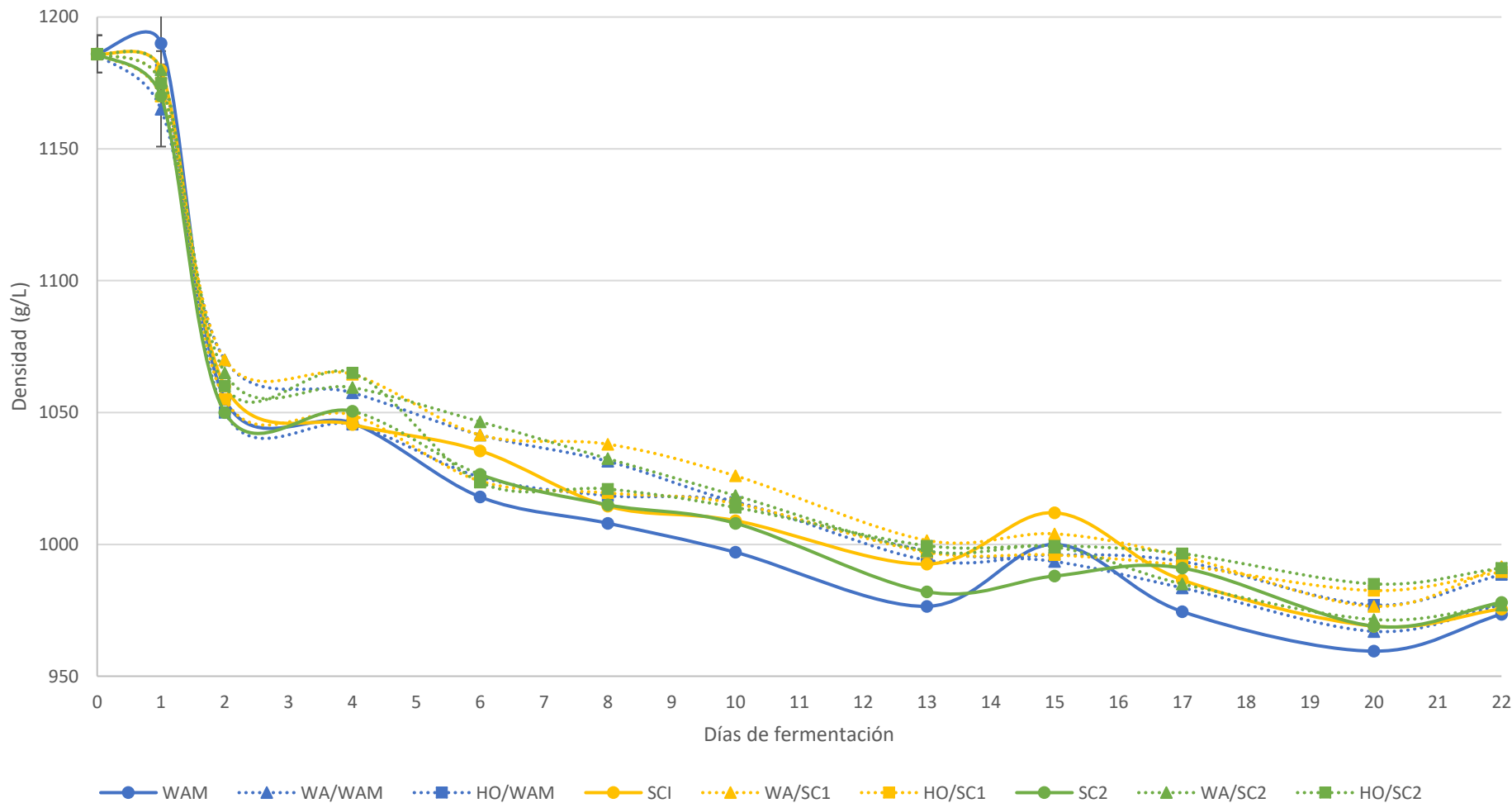


Figura 6. Evolución de densidad (g/L) durante el proceso de fermentación de los mostos sembrados con los controles *S. cerevisiae* y los cultivos mixtos con no-Saccharomyces. Los datos fueron tomados por duplicado.

### 6.3 Control de la población de levaduras

En diferentes etapas del proceso fermentativo se tomó muestra del mosto-vino para estudiar la población microbiana del mismo y poder controlar su evolución. El procedimiento llevado a cabo para el estudio de estas poblaciones fue la siembra de muestra de mosto o vino en profundidad en placas de Petri con medio YEPD. Tras dejar crecer las placas en una estufa a 21 °C, se procedió al recuento de las colonias de levadura. En base a la fase de fermentación en que se tomase la muestra, se realizaron diferentes diluciones del mosto o vino, sembrando las más representativas y recontando aquellas que presentaran un número de colonias comprendido entre 10 y 300 (RESOLUCION OENO 17/2003).

El día en que se sembraron todos los depósitos, con objeto de comprobar si la población presente en los pies de cuba se correspondía con la esperada, se tomó la primera muestra. Los pies de cuba con que se iban a realizar posteriormente las inoculaciones en los botellones contenían una cantidad de levaduras del orden de  $10^8$  UFC/mL.

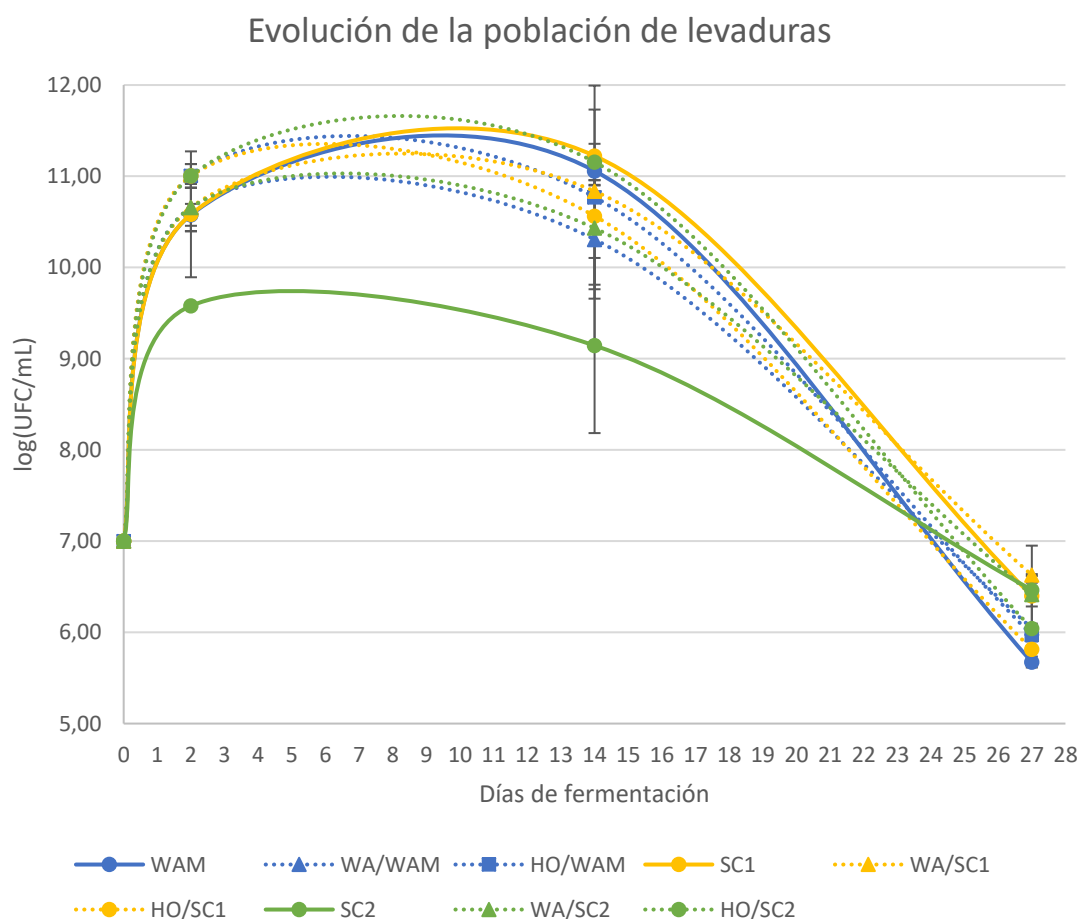


Figura 7. Representación de la evolución de la población de los diferentes cultivos de levaduras en los mostos.

La primera siembra de levaduras, el día 0 de fermentación, se llevó a cabo inoculando una cantidad estimada del orden de  $10^7$  UFC/mL.

La siguiente toma de muestra se realizó a las 48h, previa a la siembra de las levaduras *S. cerevisiae* en los depósitos destinados a la inoculación secuencial.

En este caso, los datos obtenidos de los depósitos sembrados con las levaduras no-*Saccharomyces* no difieren entre sí, pero sí se encuentran diferencias en los valores de SC2 frente al resto de levaduras *S. cerevisiae* (WAM y SC1), con  $10^9$  UFC/mL de la primera en comparación con un orden de  $10^{10}$  UFC/mL del resto.

El siguiente muestreo se realizó en plena fermentación alcohólica, transcurridos 6 días de la primera siembra. En este momento, y hasta el final, la fermentación debería haber sido conducida por *S. cerevisiae*.

A partir de este punto, se observa una mayor uniformidad en cuanto a las poblaciones, oscilando todas ellas entre  $10^{10}$  y  $10^{11}$  UFC/mL. Sin embargo, de los depósitos fermentando con SC2 contenían una cantidad aproximada de levaduras de  $10^9$  UFC/mL.

Por último, se tomó la última muestra transcurridos 27 días, sin haber sulfitado aún los vinos. Con ella se pretendió comprobar que la población de levaduras había descendido considerablemente, puesto que las condiciones del medio se habían convertido, progresivamente, en desfavorables y una gran parte de ellas habría muerto (Bagheri, B. et al., 2017). Los datos obtenidos fueron de un descenso generalizado de en torno al 50% de la población, situándose los recuentos en el orden de  $10^6$  UFC/mL.

Realizando una comparativa desde el punto de vista de la evolución de la población de levaduras por cultivos mixtos, se puede observar cómo, por un lado, WAM, sembrada en el depósito control, incrementó su población en aproximadamente un 21% durante la primera etapa. Esta población aumentó ligeramente hasta la fermentación tumultuosa, para disminuir una vez esta hubo terminado. Por otro lado, las levaduras no-*Saccharomyces* avanzaron de forma paralela, detectándose un crecimiento importante en el inicio y manteniéndose activas hasta la siembra de WAM. Tanto WAM como los cultivos de ésta con WA o HO finalizaron con valores muy similares, habiendo disminuido sus poblaciones en un 36%, 44% y 42%, respectivamente.

La evolución de SC1 es muy similar a la de WAM, aumentando progresivamente hasta producirse la fermentación tumultuosa, con una población del orden de  $10^{11}$  UFC/mL para finalizar en  $10^6$  UFC/mL. Por su parte, tras el crecimiento inicial, los cultivos mixtos con WA y HO se mantuvieron en niveles de  $10^{10}$  UFC/mL hasta el fin de fermentación. En esta fase WA/SC1 se encontraba prácticamente en la misma proporción que SC1, pero HO/SC1 terminó el proceso con un 10% menos de células en el medio.

En cuanto a las levaduras inoculadas secuencialmente con SC2, se observaron ciertas diferencias. En este caso, SC2 únicamente disminuyó a lo largo de todo el proceso de fermentación, sin superar el rango de  $10^{10}$  UFC/mL del inicio, presentando una población 10 veces menor en fermentación tumultuosa. Por su parte, el cultivo mixto WA/SC2 mantuvo unos niveles constantes a lo largo de todo el proceso. Por último, HO/SC2 creció un 8% desde su siembra hasta la fermentación tumultuosa. Finalmente, una vez hubo terminado la fermentación, la cantidad de las tres cepas fue muy similar, del orden de  $10^6$  UFC/mL.

En general, se observa cómo el crecimiento de las levaduras *S. cerevisiae* fue ligeramente menor al comienzo de la fermentación que el que se produjo en los depósitos destinados al cultivo mixto, tanto en WA como en HO, lo que confirma un rápido arranque de la fermentación y la aptitud de estas cepas para su uso como cultivo iniciador. Sin embargo, esto no condicionó el comportamiento de las levaduras no-*Saccharomyces* en las fases posteriores, puesto que no siguieron el mismo patrón entre sí.

## 6.4 Identificación de levaduras

Con el objetivo de comprobar tanto el comportamiento como el tipo de levadura predominante en cada una de las diferentes fermentaciones llevadas a cabo, se realizaron estudios moleculares a partir de muestras tomadas en las principales fases del proceso fermentativo.

Las muestras se tomaron transcurridas las 48h del inicio de fermentación y al final de la misma. El muestreo se llevó a cabo tomando un volumen de mosto-vino de cada depósito del que se quisieron realizar los análisis.

### 6.4.1. Identificación de levaduras por medio de lisina

Tanto al inicio como al final de la fermentación se realizaron pases por medio de lisina para confirmar o descartar que la levadura fuera no-*Saccharomyces* en función de si se observaba crecimiento o no, respectivamente, puesto que se trata de una prueba que permite identificar el género de las levaduras estudiadas.

La primera siembra en medio lisina se realizó a partir de muestra tomada a las 48 h del inicio de la fermentación. Una vez seguido el procedimiento indicado anteriormente, y habiendo tomado un total de 24 levaduras (6 colonias de un depósito con WA y 6 de otro con HO, por duplicado) de los depósitos sembrados con no-*Saccharomyces*, se realizó la siembra en superficie en las placas de Petri con medio de lisina. El resultado fue positivo (figura 8) para las 24 levaduras, confirmando por lo tanto que todas ellas pertenecían al género no-*Saccharomyces*.

El siguiente pase por medio de lisina se llevó a cabo en el final de fermentación, habiendo tomado un total de 54 levaduras (3 colonias por cada uno de los 18 depósitos fermentando). En este caso, ninguna de las placas presentó crecimiento (figura 9), por lo que se determinó la correcta implantación del género *Saccharomyces*, que aparece como predominante al final de la fermentación.



Figura 8. Resultado positivo para el crecimiento de levadura en medio de lisina.



Figura 9. Resultado negativo para el crecimiento de levadura en medio de lisina.

#### 6.4.2. Identificación de levaduras por secuenciación

Para confirmar la implantación de las levaduras no-*Saccharomyces* inoculadas, se procedió a identificar la presencia de las especies sembradas con un análisis molecular mediante secuenciación. De la secuenciación de las muestras de levadura tomadas tras las primeras 48 h de fermentación, se obtuvo como resultado la confirmación de la presencia, en todos los casos, de *W. anomalus* o *H. osmophila*, según correspondiese (Anexo 2). La secuenciación consigue determinar la especie de levadura de cada una de las muestras, por lo que gracias a esta técnica se pudo confirmar la correcta implantación de las levaduras no-*Saccharomyces* inoculadas en los depósitos.

#### 6.4.3. Identificación de levaduras por PCR

Mediante PCR Interdelta se estudiaron a nivel de cepa las levaduras obtenidas de los depósitos sembrados con *S. cerevisiae* a las 48 h y a mitad de fermentación. En la etapa de final de fermentación se estudiaron tanto las levaduras de los depósitos sembrados con *S. cerevisiae* como de aquellos que contenían cultivos mixtos. Al inicio de la fermentación se tomaron 6 muestras de cada uno de los depósitos sembrados con *S. cerevisiae* y de 2 depósitos inoculados tanto con HO como con WA escogidos al azar. A mitad de fermentación se escogieron 3 colonias procedentes de cada uno de los depósitos fermentando con *S. cerevisiae*. Se decidió no realizar la PCR de los mostos que contenían también no-*Saccharomyces*, puesto que hubiera supuesto un problema técnico, dado que se consideró que la población de levaduras era muy elevada y existía una alta combinación de *S. cerevisiae* y no-*Saccharomyces*. Esto hubiese dificultado la estimación de los porcentajes de cada especie de levadura presentes en los mostos. Por otro lado, la técnica que se llevó a cabo para analizar por PCR estas levaduras estaba preparada para llevarla a cabo con levaduras del género *Saccharomyces*, y podría haber dado lugar a errores. Respecto a las muestras tomadas a final de fermentación (3 colonias de cada uno de los 18 depósitos), se procedió a la identificación por PCR Interdelta del total de 54 aislados de levadura. Los resultados obtenidos fueron positivos en prácticamente la totalidad de los casos. Sin embargo, hubo excepciones en dos de los duplicados fermentando con los cultivos mixtos con SC1 y SC2.

Por un lado, en una de las repeticiones de las fermentaciones llevadas a cabo con la levadura SC1, dos de las muestras tomadas en la fase de final de fermentación con HO, se detectó un patrón de levadura que no se correspondía con la cepa *S. cerevisiae* SC1 (tabla 3). No obstante, este patrón no aparece en las muestras tomadas del depósito en que se realizó el ensayo por duplicado. Por lo tanto, este patrón no identificado apareció representado en un 33% del total de aislados identificados en la misma fase y con el mismo cultivo de levaduras.

Por otro lado, 3 de los 6 aislados de una de las repeticiones sembradas con SC2 durante las 48 primeras horas de la fermentación presentaron patrones que no se correspondieron con los esperados (tabla 4). Los resultados de la PCR Interdelta mostraron dos patrones de SC1 y un patrón desconocido (P2); sin embargo, teniendo en cuenta que se trataba de la fase inicial de la fermentación, y puesto que la población de especies de levaduras es muy elevada en los mostos durante esta etapa, no se consideró problemático. Asimismo, se comprobó cómo la levadura encargada de finalizar la fermentación fue la cepa esperada. Por lo tanto, P2 representa un 8% del total de los aislados obtenidos a partir de las muestras tomadas de ambas repeticiones del ensayo durante la misma fase de fermentación.

Tabla 2. Resultados de PCR Interdelta y PCR ITS de los aislados de levaduras presentes en los vinos elaborados a partir de las inoculaciones secuenciales llevadas a cabo con WAM. Se indica como WAM<sub>a</sub> haciendo referencia a uno de los duplicados del ensayo. 48h: muestra tomada transcurridas 48h del inicio de fermentación; FTB: muestra tomada en fermentación tumultuosa; FFA: fin de fermentación alcohólica; \*:la muestra no ha sido analizada porque no se ha considerado necesario.

CEPA	TIEMPO	AISLADOS	RESULTADOS PCR INTERDELTA	RESULTADOS PCR ITS 1-4 <i>HinfI, HaellI, CfoI</i>
WAM <sub>a</sub>	48h	1	Patrón WAM	*
		2	Patrón WAM	*
		3	Patrón WAM	*
		4	Patrón WAM	*
		5	Patrón WAM	*
		6	Patrón WAM	*
WAM <sub>a</sub>	FTB	1	Patrón WAM	*
		2	Patrón WAM	*
		3	Patrón WAM	*
WAM <sub>a</sub>	FFA	1	Patrón WAM	*
		2	Patrón WAM	*
		3	Patrón WAM	*
WAM <sub>a</sub> + HO	FFA	1	Patrón WAM	<i>S. cerevisiae</i>
		2	Patrón WAM	<i>S. cerevisiae</i>
		3	Patrón WAM	<i>S. cerevisiae</i>
WAM <sub>a</sub> + WA	FFA	1	Patrón WAM	<i>S. cerevisiae</i>
		2	Patrón WAM	<i>S. cerevisiae</i>
		3	Patrón WAM	<i>S. cerevisiae</i>

Tabla 3. Resultados de PCR Interdelta y PCR ITS de los aislados de levaduras presentes en los vinos elaborados a partir de las inoculaciones secuenciales llevadas a cabo con SC1. Se indica como SC1<sub>a</sub> haciendo referencia a uno de los duplicados del ensayo. 48h: muestra tomada transcurridas 48h del inicio de fermentación; FTB: muestra tomada en fermentación tumultuosa; FFA: fin de fermentación alcohólica; \*:la muestra no ha sido analizada porque no se ha considerado necesario.

CEPA	TIEMPO	AISLADOS	RESULTADOS PCR INTERDELTA	RESULTADOS PCR ITS 1-4 <i>HinfI, HaellI, CfoI</i>
SC1 <sub>a</sub>	48h	1	Patrón SC1	*
		2	Patrón SC1	*
		3	Patrón SC1	*
		4	Patrón SC1	*
		5	Patrón SC1	*
		6	Patrón SC1	*
SC1 <sub>a</sub>	FTB	1	Patrón SC1	*
		2	Patrón SC1	*
		3	Patrón SC1	*
SC1 <sub>a</sub>	FFA	1	Patrón SC1	*
		2	Patrón SC1	*
		3	Patrón SC1	*
SC1 <sub>a</sub> + HO	FFA	1	Patrón SC1	<i>S. cerevisiae</i>
		2	P1	<i>S. cerevisiae</i>
		3	P1	<i>S. cerevisiae</i>
SC1 <sub>a</sub> + WA	FFA	1	Patrón SC1	<i>S. cerevisiae</i>
		2	Patrón SC1	<i>S. cerevisiae</i>
		3	Patrón SC1	<i>S. cerevisiae</i>

Tabla 4. Resultados de PCR Interdelta y PCR ITS de los aislados de levaduras presentes en los vinos elaborados a partir de las inoculaciones secuenciales llevadas a cabo con SC2. Se indica como SC2<sub>a</sub> haciendo referencia a uno de los duplicados del ensayo. 48h: muestra tomada transcurridas 48h del inicio de fermentación; FTB: muestra tomada en fermentación tumultuosa; FFA: fin de fermentación alcohólica; \*:la muestra no ha sido analizada porque no se ha considerado necesario.

CEPA	TIEMPO	AISLADOS	RESULTADOS PCR INTERDELTA	RESULTADOS PCR ITS 1-4 <i>HinfI, HaeIII, CfoI</i>
SC2 <sub>a</sub>	48h	1	Patrón SC2	*
		2	Patrón SC1	*
		3	Patrón SC1	*
		4	P2	<i>S. cerevisiae</i>
		5	Patrón SC2	*
		6	Patrón SC2	*
SC2 <sub>a</sub>	FTB	1	Patrón SC2	*
		2	Patrón SC2	*
		3	Patrón SC2	*
SC2 <sub>a</sub>	FFA	1	Patrón SC2	*
		2	Patrón SC2	*
		3	Patrón SC2	*
SC2 <sub>a</sub> + HO	FFA	1	Patrón SC2	<i>S. cerevisiae</i>
		2	Patrón SC2	<i>S. cerevisiae</i>
		3	Patrón SC2	<i>S. cerevisiae</i>
SC2 <sub>a</sub> + WA	FFA	1	Patrón SC2	<i>S. cerevisiae</i>
		2	Patrón SC2	<i>S. cerevisiae</i>
		3	Patrón SC2	<i>S. cerevisiae</i>

Además, como herramienta para poder determinar el género de las levaduras correspondientes a P1 y P2, se realizó PCR ITS 1-4 de todos los aislados pertenecientes a los depósitos sembrados por inoculación secuencial (no-*Saccharomyces*). Gracias a la realización de esta PCR y de la digestión con los enzimas *Hinf I*, *Hae III* y *Cfo I*, se determinó que todos los aislados pertenecían a la especie *S. cerevisiae*.

Por lo tanto, se confirma que todas las levaduras que finalizaron las fermentaciones pertenecían a la cepa esperada, excepto en el caso de 2 aislados (también *S. cerevisiae*) de uno de los depósitos fermentando con HO y SC1.

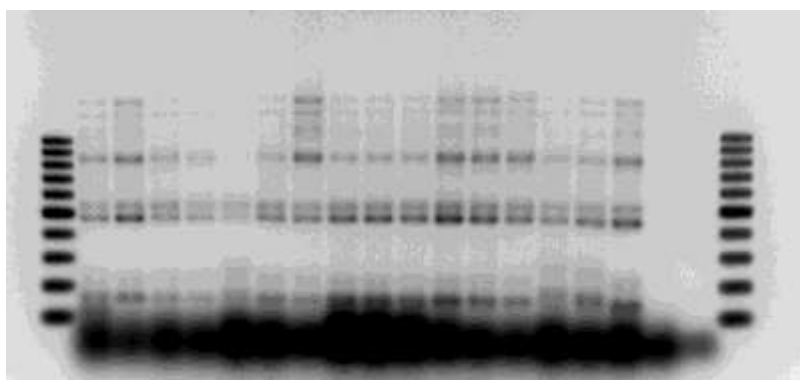


Figura 10. Gel de agarosa obtenido como resultado de la electroforesis de algunos de los resultados de la PCR Interdelta. De izquierda a derecha: marcador molecular, SC2<sub>b</sub> al inicio de la fermentación (6 muestras), SC2<sub>b</sub> a las 48h (3 muestras), SC2<sub>b</sub> a mitad de fermentación (3 muestras), HO/SC2<sub>b</sub> al final de fermentación (3 muestras), ADN de SC2, ADN de HO, NTC (No Template Control), marcador molecular.

## 6.5 Analítica básica

Una vez finalizada la fermentación alcohólica, se procedió al estudio de los parámetros analíticos de los vinos elaborados. El conjunto de estos datos permitió realizar comparaciones entre los diferentes vinos y determinar si hubo cambios inducidos por las levaduras no-*Saccharomyces*.

El Pliego de Condiciones de la D.O. Rueda (PDO-ES-A0889) determina como vinos secos todos aquellos que contienen una cantidad inferior a 5 g/L de azúcares residuales. Por lo tanto, todos los vinos elaborados (excepto los inoculados con la levadura HO) se encuentran dentro de los valores permitidos.

En la determinación de azúcares residuales por el método de Rebelein, los resultados obtenidos en los vinos inoculados secuencialmente con *H. osmophila* y *S. cerevisiae* superaron los límites del método (28 g/L), por lo que se concluye que estas combinaciones no fueron capaces de finalizar la fermentación, aunque el grado alcohólico alcanzado fuese elevado.

Con el objetivo de poder determinar la causa de la parada de fermentación de forma analítica, se plantearon varias posibilidades. Una de las hipótesis fue la incompatibilidad en la fermentación de *H. osmophila* y *S. cerevisiae* por la liberación de toxinas o compuestos químicos perjudiciales para ella por parte de HO (Albergaria, H. et al., 2009). Es por ello que se realizaron estudios moleculares por PCR, cuyos resultados concluyeron la predominancia de *S. cerevisiae*. Por lo tanto, este no pudo ser el motivo de la parada de fermentación. Otro planteamiento fue un alto consumo de nitrógeno por parte de HO, conduciendo a un agotamiento de nutrientes en el mosto. El análisis de NFA se realizó para descartar que esa hubiera podido ser la causa por la que las fermentaciones con HO no finalizaron. Con los datos obtenidos se descarta esta posibilidad. Finalmente, se propuso como posible causa el elevado grado alcohólico que se alcanzó durante la fermentación, siendo las cepas de *S. cerevisiae* capaces de llegar a alcanzar 14% vol. (Oteruelo, B., 2018), pero sí fueron capaces de finalizar el resto de fermentaciones con un grado alcohólico similar en todas ellas. Por lo tanto, aun no habiendo determinado el agente causante de la parada de fermentación, se puede considerar el cultivo mixto de *S. cerevisiae* con *H. osmophila* como no válido para vinificación, puesto que no es capaz de finalizar la fermentación. El resto de analíticas se realizaron para conocer de forma cuantitativa los parámetros químicos más representativos de los vinos elaborados.

Tabla 5. Resultados de las analíticas realizadas a los vinos elaborados. A.R.: azúcares reductores (g/L); A.T.: acidez total (g/L); A.V.: acidez volátil (g/L); SO<sub>2</sub>L: sulfuroso libre (mg/L); SO<sub>2</sub>T: sulfuroso total (mg/L); % vol.: grado alcohólico (v/v); NFA: nitrógeno fácilmente asimilable (mg/L); distintas letras en una misma línea indican valores estadísticamente significativos (p<0,05); ns: valor no significativo.

	WAM	WA/WAM	SC1	WA/SC1	SC2	WA/SC2
A.R.	1,4 ± 0,2 <sup>a</sup>	1,7 ± 0,3 <sup>ab</sup>	2,1 ± 0,6 <sup>c</sup>	2,9 ± 0,2 <sup>d</sup>	1,7 ± 0,2 <sup>ab</sup>	1,9 ± 0,2 <sup>bc</sup>
pH	3,3 ± 0,0 <sup>bc</sup>	3,32 ± 0,01 <sup>c</sup>	3,29 ± 0,01 <sup>b</sup>	3,26 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,28 ± 0,01 <sup>ab</sup>	3,26 ± 0,01 <sup>a</sup>
A.T.	6,2 ± 0,0 <sup>a</sup>	6,3 ± 0,1 <sup>a</sup>	6,3 ± 0,1 <sup>a</sup>	6,7 ± 0,5 <sup>b</sup>	6 ± 0,0 <sup>a</sup>	6,7 ± 0,1 <sup>b</sup>
A.V.	0,55 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,61 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,68 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,02 ± 0,07 <sup>b</sup>	0,5 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,9 ± 0,27 <sup>b</sup>
SO <sub>2</sub> L	21 ± 1 <sup>d</sup>	18 ± 1 <sup>bc</sup>	21 ± 1 <sup>d</sup>	16 ± 2 <sup>a</sup>	18 ± 1 <sup>c</sup>	16 ± 1 <sup>ab</sup>
SO <sub>2</sub> T	63 ± 2 <sup>d</sup>	56 ± 3 <sup>bc</sup>	57 ± 7 <sup>c</sup>	56 ± 1 <sup>bc</sup>	51 ± 2 <sup>ab</sup>	48 ± 1 <sup>a</sup>
% vol.	15,0 ± 0,6 <sup>ns</sup>	15,0 ± 0,1 <sup>ns</sup>	15,5 ± 0,0 <sup>ns</sup>	15,5 ± 0,0 <sup>ns</sup>	15,5 ± 0,1 <sup>ns</sup>	15,0 ± 0,1 <sup>ns</sup>



Las variables analíticas estadísticamente significativas se determinaron mediante un análisis ANOVA. Se consideran diferencias estadísticamente significativas las medias cuyo valor-P de la razón-F es  $<0,05$  (Anexo 3). A partir de esto se determinaron significativos los parámetros azúcares reductores (A.R.), acidez total (A.T.), acidez volátil (A.V.), sulfuroso libre ( $SO_2L$ ) y sulfuroso total ( $SO_2T$ ) y se consideró como no significativo el grado alcohólico.

El análisis de varianza indica que los vinos obtenidos de la inoculación de las levaduras *S. cerevisiae* seleccionadas en el estudio (SC1 y SC2) y la comercial (WAM), no muestran diferencias significativas en la acidez total. Sin embargo, el uso de cultivos mixtos supone un aumento significativo de este parámetro cuando se emplean las cepas *S. cerevisiae* seleccionadas. La interacción entre las cepas de levaduras *S. cerevisiae* y *W. anomalus* se pone de manifiesto en el hecho de que los vinos inoculados con WA/WAM no muestran un aumento significativo de la acidez total. Son los cultivos mixtos con SC1 y SC2 los que muestran un aumento significativo en este valor, lo que podría suponer una ventaja enológica en la lucha contra los pH elevados.

En el caso del pH, no se aprecian diferencias significativas entre los diferentes cultivos con levaduras *S. cerevisiae*, y tampoco entre WAM y SC2 con sus cultivos mixtos. Sin embargo, sí se observa un valor de pH más bajo cuando se realiza la siembra del cultivo mixto de SC1 con WA. Esta diferencia en los valores puede suponer una ventaja de la fermentación con esta combinación de levaduras y ser empleada como herramienta para conseguir acideces más elevadas en los vinos.

Estos parámetros son importantes, puesto que influyen en gran medida en la protección y estabilidad microbiológica del vino. En los últimos años se ha detectado un aumento en las temperaturas y esto ha conducido a la aparición de pH progresivamente más elevados (Barnuud, N. N., Zerihun, A., Gibberd, M. & Bates, B., 2013). Un pH más elevado y, por lo tanto, una acidez más reducida, puede desembocar en cambios significativos de la población microbiana de los mostos y vinos, aumentando el riesgo de contaminaciones de los mismos y desembocando en una reducción de la calidad organoléptica (Orduña, R. M., 2010). Es por esto que en los últimos años se tiende a la búsqueda de la obtención de vinos con acideces elevadas y menores valores de pH.

Sin embargo, de forma paralela al incremento de la acidez total, se registra un aumento en la acidez volátil en los vinos fermentados con los cultivos mixtos con SC1 y SC2, lo que podría llegar a influir negativamente en la calidad final en caso de superar los valores recomendados. En este caso, los cambios que sufre la acidez volátil en los vinos sí son significativos. Por un lado, no se aprecian diferencias en los vinos inoculados con los cultivos de *S. cerevisiae* y tampoco en la inoculación secuencial WA/WAM. Sin embargo, sí se observa un aumento importante de los valores de la acidez volátil en los vinos elaborados con los cultivos mixtos WA/SC1 y WA/SC2, superando considerablemente el límite establecido por la D.O. Rueda (0,65 g/L de ácido acético) (Orden APA/2059 /2002) y pudiendo reducir la calidad de estos vinos (Vilela-Moura, A. et al., 2011), apareciendo de forma notoria en el análisis sensorial. Sin embargo, estas cepas de levadura *S. cerevisiae* (SC1 y SC2) no suponen un incremento de la acidez volátil frente a la comercial (WAM) cuando fermentan de forma exclusiva.

La acidez volátil está relacionada también con el sulfuroso de los vinos. Esta acidez, en presencia de sulfuroso libre, no alcanza los valores tan elevados como podría llegar a alcanzar en caso de no estar presente el dióxido de azufre (Lukic, I., Radeka, S., Grozaj, N., Staver, M. & Peršuric Đ., 2016; Arapistas, P., Guella, G., Mattivi, F., 2017). En este caso, se observa una disminución importante de sulfuroso libre en todos los vinos

fermentados con un cultivo mixto frente a los elaborados únicamente con *S. cerevisiae*. Los cultivos mixtos con SC1 y SC2 presentan valores de sulfuroso menores que el cultivo con WAM. En el caso del sulfuroso total, la disminución de su contenido es dependiente de la cepa de *S. cerevisiae* empleada. Con el empleo de SC1 se consiguen unos niveles de sulfuroso libre similares a los obtenidos con la levadura WAM, reduciendo el contenido de sulfuroso total. El empleo de SC2 reduciría ambos, sulfuroso total y libre, lo que podría resultar interesante en la elaboración de vinos con bajo contenido de sulfuroso. No se encuentran diferencias significativas en los valores de sulfuroso total obtenidos como resultado de las fermentaciones con las cepas SC1, SC2 y sus cultivos mixtos (WA/SC1 y WA/SC2). No obstante, sí se encuentran diferencias en el empleo de la levadura comercial WAM, presentando los valores más elevados frente al resto de vinos analizados. La obtención de valores más elevados de sulfuroso, elemento protector frente a un aumento de la acidez volátil, en los vinos como resultado de la fermentación con la cepa comercial podría constituir una herramienta para conseguir fermentaciones con una menor adición de este producto en los mostos, siendo especialmente interesante en los procesos de vinificación en ecológico, por ejemplo.

Por último, en cuanto a los azúcares reductores, se obtuvieron vinos con niveles de azúcares finales significativamente diferentes, principalmente en el caso de los fermentados con SC1 y su cultivo mixto (WA/SC1), observándose valores considerablemente más elevados del último cultivo frente a la fermentación únicamente llevada a cabo por la cepa SC1. En el caso de las cepas WAM y SC2 no se obtuvieron variaciones significativas entre sus cultivos independientes y sus cultivos mixtos. Es posible que estos niveles de azúcares estén relacionados con los niveles de acidez volátil de los vinos (Lukic, I., Radeka, S., Grozaj, N., Staver, M. & Peršuric Đ., 2016), pudiéndose apreciar cómo un mayor contenido de azúcares reductores en WA/SC1 conduce a la mayor de las acideces volátiles registradas.

El análisis de componentes principales (ACP) se realizó con los datos significativos. El componente CP1 (69,9% de la varianza total) se correlacionó positivamente con la acidez, tanto volátil como total, y los azúcares reductores. Se observan en el gráfico (Figura 11) los principales parámetros que influyen en la calidad y características organolépticas del vino, así como los diferentes vinos elaborados a partir de cultivos individuales de *S. cerevisiae* y de cultivos mixtos con no-*Saccharomyces*. Se aprecia, en base a la distribución de las variables en el gráfico, una mayor relación de los vinos elaborados con la levadura WAM, tanto de forma individual como en combinación con WA, con parámetros como el pH o el sulfuroso libre. De este modo, son los vinos elaborados con estas levaduras los que presentan los valores más elevados de los parámetros mencionados. Por otro lado, se observa la dependencia de la levadura WA con las cepas de levaduras *S. cerevisiae* con que se inocule posteriormente, presentado el cultivo WA/SC1 una mayor cantidad de azúcares reductores y unas acideces, tanto volátil como total, más elevadas que la inoculación de WA con SC2.

### Análisis de Componentes Principales

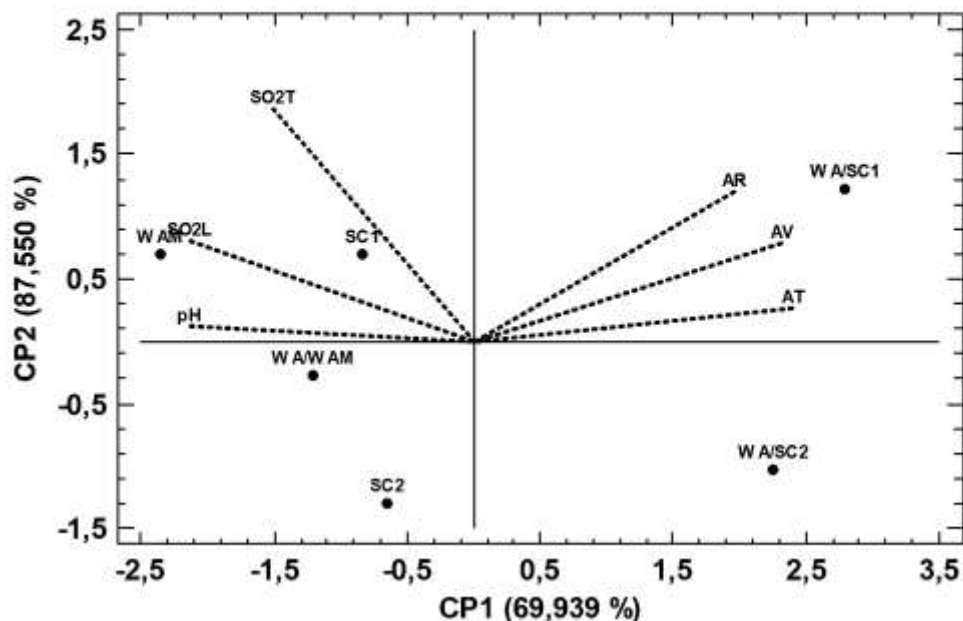


Figura 11. Gráfico de componentes en 2D tanto de individuos como de variables del estudio.

Los vinos elaborados con la inoculación del cultivo mixto WA/SC1 presentan mayores niveles de acidez tanto volátil como total y de azúcares reductores. El grupo de vinos elaborados a partir de la siembra de WA/SC2, aunque no tan directamente, también está relacionado con estos parámetros, presentando asimismo valores elevados.

Frente a este grupo se encuentran los parámetros  $\text{SO}_2\text{L}$  y  $\text{SO}_2\text{T}$ , además del pH. Los vinos elaborados con el cultivo individual de WAM presentan los niveles más elevados de estos parámetros, pero los más bajos de azúcares reductores y de acidez volátil y total. Los vinos obtenidos como resultado de la fermentación de SC1, aunque con menos peso en el análisis, mostraron niveles relativamente elevados de azúcares reductores y de acidez volátil, pero bajos en acidez total.

Mediante la representación del análisis ACP se puede concluir, por tanto, que los parámetros principales que afectan a los vinos y que pueden influir en ellos organolépticamente, cambian cuando se emplean cultivos mixtos y estos son a su vez dependientes de la cepa *S. cerevisiae* inoculada.

## 7. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos del presente estudio, en el que se han llevado a cabo fermentaciones con diferentes cultivos mixtos para determinar el potencial enológico de las levaduras *W. anomalus* y *H. osmophila* en combinación con 3 cepas de *S. cerevisiae* (WAM, SC1 y SC2), se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- La especie *H. osmophila*, pese a su potencial enzimático y fermentativo, así como al grado alcohólico alcanzado, no ha conseguido, en combinación con ninguna de las cepas *S. cerevisiae* con las que ha sido inoculada secuencialmente, finalizar la fermentación alcohólica.
- El comienzo de la fermentación fue muy similar tanto en los mostos sembrados con levaduras no-*Saccharomyces* como con los que fueron sembrados únicamente con *S. cerevisiae*.
- La implantación de las levaduras se llevó a cabo correctamente, consiguiendo 48h de fermentación dirigida por *W. anomalus* y *H. osmophila* en cada caso, que después fue guiada por *S. cerevisiae* hasta su finalización. Tanto la implantación de las no-*Saccharomyces* en la fase inicial de la fermentación como la posterior implantación de las diferentes cepas de *S. cerevisiae*, son factores imprescindibles para el correcto desarrollo de la fermentación.
- En cuanto los parámetros físico-químicos de los vinos elaborados, cabe destacar la actividad de la levadura *S. cerevisiae* SC1 en cuando a la obtención de valores de anhídrido sulfuroso libre, siendo éstos similares a los conseguidos por la cepa comercial mientras que los niveles de sulfuroso total se reducen, y pudiendo, por lo tanto, reducir la cantidad de sulfuroso empleada en las vinificaciones.
- El uso de las levaduras no-*Saccharomyces* empleadas en este estudio puede suponer una ventaja también en la obtención de una acidez total más elevada, siempre y cuando no conlleve un aumento importante de la acidez volátil que pueda perjudicar el perfil aromático de los vinos.

Los datos obtenidos de este estudio conforman un estudio preliminar de las levaduras empleadas. Atendiendo a los resultados obtenidos del estudio de los diferentes cultivos de levaduras en los mostos, es necesario continuar con la investigación. Podría ser interesante el análisis aromático de los vinos elaborados con estas levaduras, con objeto de poder determinar compuestos de interés para la mejora aromática en Verdejo. En cata es interesante determinar parámetros como puede ser la acidez volátil, con el objetivo de descartar que el aumento de la acidez total obtenido como resultado de la inoculación con levaduras no-*Saccharomyces* suponga también un aumento de la volátil, pudiendo influir negativamente en las características organolépticas de los vinos. Asimismo, sería recomendable llevar a cabo fermentaciones con la inoculación de cultivos mixtos, bien de forma simultánea o secuencial, en volúmenes mayores. De este modo, los resultados obtenidos podrían ser más representativos.

## 8. REFERENCIAS

1. Arapitsas, P., Guella, G. & Mattivi, F. (2018). The impact of SO<sub>2</sub> on wine flavanols and indoles in relation to wine style and age. *Scientific Reports*, 8(December 2017), 1–13.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-19185-5>
2. Bagheri, B., Bauer, F. F. & Setati, M. E. (2017). The Impact of *Saccharomyces cerevisiae* on a Wine Yeast Consortium in Natural and Inoculated Fermentations. *Frontiers in Microbiology*, 8(October 2017), 1–13.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01988>
3. Bagheri, B., Zambelli, P., Vigentini, I., Bauer, F. F., & Setati, M. E. (2018). Investigating the Effect of Selected Non-Saccharomyces Species on Wine Ecosystem Function and Major Volatiles. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6(November 2018), 1-12.  
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00169>
4. Barceló, G. Acidez. En: Penedès Edicions, S.A., editor. Técnicas Analíticas Para Vinos. Moja-Olèrdola: GAB; 1990. p. 120-121.
5. Barceló, G. Alcoholes. En: Penedès Edicions, S.A., editor. Técnicas Analíticas Para Vinos. Moja-Olèrdola: GAB; 1990. p. 412-413.
6. Barceló, G. Azúcares. En: Penedès Edicions, S.A., editor. Técnicas Analíticas Para Vinos. Moja-Olèrdola: GAB; 1990. p. 516-511.
7. Barceló, G. Compuestos Nitrogenados. En: Penedès Edicions, S.A., editor. Técnicas Analíticas Para Vinos. Moja-Olèrdola: GAB; 1990. p. 917-918.
8. Barnuud, N. N., Zerihun, A., Gibberd, M. & Bates, B. (2013). Berry composition and climate: responses and empirical model. *International Journal of biometeorology*, (August 2013).  
<https://doi.org/10.1007/s00484-013-0715-2>
9. Belda, I., Ruiz, J., Alastruey-Izquierdo, A., Navascués, E., Marquina, D., & Santos, A. (2016). Unraveling the enzymatic basis of wine “Flavorome”: A phylo-functional study of wine related yeast species. *Frontiers in Microbiology*, 7(January 2016), 1–13.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00012>
10. Binati, R. L., Innocente, G., Gatto, V., Celebrin, A., Polo, M., Felis, G. E. & Torriani, S. (2019). Exploring the diversity of a collection of native non-Saccharomyces yeasts to develop co-starter cultures for winemaking. *Food Research International*, 122(February 2019), 432–442.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.043>
11. Gamero, A., Tronchoni, J., Querol, A. & Belloch, C. (2013). Production of aroma compounds by cryotolerant Saccharomyces species and hybrids at low and moderate fermentation temperatures. *Journal of Applied Microbiology*, 114(2013), 1405-1414. <https://doi.org/10.1111/jam.12126>
12. Gutiérrez, A., Bokhout, T., Gojkovic, Z. & Katz, M. (2018). Evaluation of non-Saccharomyces yeasts in the fermentation of wine, beer and cider for the development of new beverages. *The Institute of Brewing & Distilling*, 124 (September 2018), 389-402.  
<https://doi.org/10.1002/jib.512>
13. Izquierdo, L. Caracterización enológica de levaduras no-Saccharomyces procedentes de la D.O. Rueda. [Grado] Universidad de Valladolid, 2019.
14. Jara, C., Laurie, V. F., Mas, A. & Romero, J. (2016). Microbial Terroir in Chilean Valleys: Diversity of Non-conventional Yeast. *Frontiers in Microbiology*, 7(May 2016), 1–10.

- <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00663>
15. Lin, M. M., Boss, P. K., Walker, M. E., Sumbly, K. M. & Grbin, P. R. (2019). Evaluation of indigenous non- *Saccharomyces* yeasts isolated from a South Australian vineyard for their potential as wine starter cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 312(September 2019)  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108373>
  16. López, M. C., Mateo, J. J. & Maicas, S. (2015). Screening of  $\beta$ -Glucosidase and  $\beta$ -Xylosidase Activities in Four Non-*Saccharomyces* Yeast Isolates. *Journal of Food Science*, 8(May 2005), 1696-1704.  
<https://doi.org/10.1111/1750-3841.12954>
  17. Lukic, I., Radeka, S., Grozaj, N., Staver, M. & Peršuric Đ. (2016). Changes in physico-chemical and volatile aroma compound composition of Gewürztraminer wine as a result of late and ice harvest. *Food Chemistry*, 196(October 2015), 1048-1057.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.061>
  18. Mateus, D., Sousa, S., Coimbra, C., Rogerson, F. S. & Simões, J. (2020). Identification and Characterization of Non- *Saccharomyces* Species Isolated from Port Wine Spontaneous Fermentations. *Foods*, 9(January 2020), 1-19.  
<https://doi.org/10.3390/foods9020120>
  19. Maturano, Y. P., Rodríguez, L. A., Toro, M. E., Nally, M. C., Vallejo, M., Castellanos, L. I., et al. (2012). Multi-enzyme production by pure and mixed cultures of *Saccharomyces* and non- *Saccharomyces* yeasts during wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 155(January 2012), 43–50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.015>
  20. Nisiotou, A., Mallouchos, A., Tassou, C. & Banilas, G. (2019). Indigenous Yeast Interactions in Dual-Starter Fermentations May Improve the Varietal Expression of Moschofilero Wine. *Frontiers in Microbiology*, 10(July 2019), 1–14.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01712>
  21. Oliverira, I. & Ferreira, V. (2019). Modulating Fermentative, Varietal and Aging Aromas of Wine Using non-*Saccharomyces* Yeasts in a Sequential Inoculation Approach. *Microorganisms*, 7(June 2019), 1-23.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms7060164>
  22. Orduña, R. M. (2010). Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Research International*, 43(May 2010), 1844-1855.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.05.001>
  23. Oteruelo, B. Estudio de la tolerancia a elevadas concentraciones de azúcar de *Saccharomyces cerevisiae* vnicas. [Grado] Universidad de Valladolid, 2018.
  24. Padilla, B., García-fernández, D., González, B., Izidoro, I., Esteve-Zarzoso, B., Beltran, G. & Mas, A. (2016). Yeast Biodiversity from DOQ Priorat Uninoculated Fermentations. *Frontiers in Microbiology*, 7(June 2016), 1–11.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00930>
  25. Petruzzi, L., Capozzi, V., Berbegal, C., Corbo, M. R., Bevilacqua, A., Spano, G., & Sinigaglia, M. (2017). Microbial Resources and Enological Significance : Opportunities and Benefits. *Frontiers in Microbiology*, 8(June 2017), 1–13.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00995>
  26. Pizarro, F., Varela, C., Martabit, C., Bruno, C. et al. (2007). Coupling Kinetic Expressions and Metabolic Networks for Predicting Wine Fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(2007), 986-998.  
<https://doi.org/10.1002/bit.21494>

27. Roca-mesa, H., Sendra, S., Mas, A., Beltran, G. & Torija, M. (2020). Nitrogen Preferences during Alcoholic Fermentation of Different Non-*Saccharomyces* Yeasts of Oenological Interest. *Microorganisms*, 8(January 2020), 1-19.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8020157>
28. Ruiz, J., Belda, I., Beisert, B., Navascués, E., Marquina, D., Calderón, F., et al. (2018). Analytical impact of *Metschnikowia pulcherrima* in the volatile profile of Verdejo white wines. *Applied Microbiology and Biotechnology*, (July 2018).  
<https://doi.org/10.1007/s00253-018-9255-3>
29. Sánchez-Palomo, E., Alonso-Villegas, R. & González Viñas, M. A. (2014). Characterisation of free and glycosidically bound aroma compounds of La Mancha Verdejo white wines. *Food Chemistry*, 173(2015), 1195–202.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.148>
30. Swangkeaw, J., Vichitphan, S., Butzke, C. E. & Vichitphan, K. (2010). Characterization of b-glucosidases from *Hanseniaspora* sp. and *Pichia anomala* with potentially aroma-enhancing capabilities in juice and wine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(2011), 423–430.  
<https://doi.org/10.1007/s11274-010-0474-8>
31. Vilela-Moura, A., Schuller, D., Mendes-Faia, A., et al. (2011). The impact of acetate metabolism on yeast fermentative performance and wine quality: reduction of volatile acidity of grape musts and wines. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(October 2010), 271-280.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-010-2898-3>

## ANEXOS

### ANEXO 1. Recuentos de población de levaduras

Tabla 6. Recuentos de levaduras de cada depósito en diferentes fases de la fermentación. Se indican como UFC/mL, de forma exponencial. Los depósitos se nombran como "a " o "b" indicando que cada ensayo se ha realizado por duplicado.

	Siembra inicial	Segunda inoculación	Fermentación tumultuosa	Fin de fermentación	
WAM <sub>a</sub>	≈10 <sup>7</sup>	4,6·10 <sup>10</sup>	1,5·10 <sup>11</sup>	4,3·10 <sup>5</sup>	
WAM <sub>b</sub>		3,1·10 <sup>10</sup>	8,8·10 <sup>10</sup>	5,2·10 <sup>5</sup>	
SC1 <sub>a</sub>	≈10 <sup>7</sup>	1,3·10 <sup>10</sup>	1,6·10 <sup>11</sup>	1,0·10 <sup>6</sup>	
SC1 <sub>b</sub>		1,8·10 <sup>11</sup>	1,7·10 <sup>11</sup>	6,2·10 <sup>6</sup>	
SC2 <sub>a</sub>	≈10 <sup>7</sup>	3,8·10 <sup>9</sup>	2,9·10 <sup>8</sup>	3,4·10 <sup>6</sup>	
SC2 <sub>b</sub>		3,8·10 <sup>9</sup>	6,7·10 <sup>9</sup>	2,5·10 <sup>6</sup>	
WA/WAM <sub>a</sub>	≈10 <sup>7</sup>		7,0·10 <sup>9</sup>	1,0·10 <sup>6</sup>	
WA/WAM <sub>b</sub>			6,9·10 <sup>10</sup>	5,9·10 <sup>10</sup>	1,2·10 <sup>6</sup>
WA/SC1 <sub>a</sub>			6,1·10 <sup>10</sup>	4,3·10 <sup>6</sup>	
WA/SC1 <sub>b</sub>			7,7·10 <sup>10</sup>	4,2·10 <sup>6</sup>	
WA/SC2 <sub>a</sub>			3·10 <sup>10</sup>	9,0·10 <sup>09</sup>	3,2·10 <sup>6</sup>
WA/SC2 <sub>b</sub>			8,1·10 <sup>10</sup>	2,1·10 <sup>6</sup>	
HO/WAM <sub>a</sub>	≈10 <sup>7</sup>		2,8·10 <sup>11</sup>	8,4·10 <sup>5</sup>	
HO/WAM <sub>b</sub>			1,2·10 <sup>11</sup>	1,2·10 <sup>10</sup>	1,0·10 <sup>6</sup>
HO/SC1 <sub>a</sub>			3,6·10 <sup>09</sup>	5,2·10 <sup>5</sup>	
HO/SC1 <sub>b</sub>			3,7·10 <sup>11</sup>	8,2·10 <sup>5</sup>	
HO/SC2 <sub>a</sub>			8,2·10 <sup>10</sup>	2·10 <sup>11</sup>	2,1·10 <sup>6</sup>
HO/SC2 <sub>b</sub>			1,0·10 <sup>11</sup>	5,8·10 <sup>5</sup>	



## ANEXO 2. Resultados secuenciación molecular

Tabla 7. Resultados obtenidos de la secuenciación molecular. Ref.: referencia con que se etiquetaron las muestras; %Sim.: porcentaje de similitud. Las muestras se nombraron como "x" e "y" haciendo referencia a los dos depósitos escogidos al azar para realizar la toma de muestra.

Ref.	Identificación	% Sim.	Ref.	Identificación	% Sim.
1WA <sub>x</sub>	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	>99%	1HO <sub>x</sub>	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	>99%
2WA <sub>x</sub>	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	>99%	2HO <sub>x</sub>	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	>99%
3WA <sub>x</sub>	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	>99%	3HO <sub>x</sub>	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	>99%
4WA <sub>x</sub>	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	>99%	4HO <sub>x</sub>	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	>99%
5WA <sub>x</sub>	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	>99%	5HO <sub>x</sub>	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	>99%
6WA <sub>x</sub>	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	>99%	6HO <sub>x</sub>	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	>99%
1WA <sub>y</sub>	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	>99%	1HO <sub>y</sub>	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	>99%
2WA <sub>y</sub>	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	>99%	2HO <sub>y</sub>	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	>99%
3WA <sub>y</sub>	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	>99%	3HO <sub>y</sub>	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	>99%
4WA <sub>y</sub>	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	>99%	4HO <sub>y</sub>	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	>99%
5WA <sub>y</sub>	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	>99%	5HO <sub>y</sub>	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	>99%
6WA <sub>y</sub>	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	>99%	6HO <sub>y</sub>	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	>99%

### ANEXO 3. Análisis ANOVA

Tabla 8. Valores del estadístico-F del ANOVA. \*Significativo:  $p < 0,05$ ; ns: no significativo ( $p \geq 0,05$ ).

Análisis fisicoquímicos	Razón - F
Acidez total	6,05*
Acidez volátil	11,38*
Sulfuroso libre	17,46*
Sulfuroso total	9,03*
Azúcares reductores	15,14*
pH	10,57*
Grado alcohólico	0,94 <sup>ns</sup>