



Universidad de Valladolid

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE
INGENIERÍAS AGRARIAS

GRADO EN ENOLOGÍA

Caracterización enológica de levaduras no-*Saccharomyces* procedentes de la D.O. Rueda

Alumna:

Izquierdo Calvo, Lucía

Tutoras:

Vila Crespo, Josefina
Ruipérez Prádanos, Violeta

Palencia, 2019

ÍNDICE

ABSTRACT.....	1
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	5
4. MATERIALES Y MÉTODOS	5
4.1. Microorganismos	5
4.1.1. Levaduras no- <i>Saccharomyces</i>	5
4.1.2. Mantenimiento y cultivo de microorganismos	7
4.1.3. Observación al microscopio	7
4.1.4. Estimación de células para siembra.....	7
4.2. Medios de cultivo.....	7
4.2.1. Mosto	7
4.2.2. Medio YPD	8
4.2.3. Medio actividad β -glucosidasa	8
4.2.4. Medio actividad proteasa	8
4.2.5. Medio actividad β -glucanasa.....	8
4.2.6. Medio actividad β -liasa.....	8
4.2.7. Medio test <i>killer</i> y sensible	9
4.3. Caracterización enzimática	9
4.3.1. Ensayo β -glucosidasa	9
4.3.2. Ensayo proteasa	9
4.3.3. Ensayo β -glucanasa	10
4.3.4. Ensayo β -liasa	10
4.4. Caracterización bioquímica	11
4.4.1. Cinética fermentativa	11
4.4.2. Poder fermentativo y vigor fermentativo.....	11
4.4.3. Azúcares reductores	12
4.4.4. Ensayo <i>killer</i>	12
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
5.3. Actividad enzimática.....	13
5.3.1. Ensayo β -glucosidasa.....	15
5.3.2. Ensayo proteasa	15
5.3.3. Ensayo β -glucanasa	16
5.3.4. Ensayo β -liasa	16
5.4. Cinética fermentativa.....	18
5.5. Ensayo <i>killer</i>	24
6. CONCLUSIONES	25
7. BIBLIOGRAFÍA	26
ANEXOS.....	29
ANEXO 1. Observación y tabla de resultados test <i>killer</i>	29
ANEXO 2. Observación al microscopio.....	30
ANEXO 3. Tabla de poder fermentativo	31

RESUMEN

En los últimos años ha aumentado enormemente el interés por investigar el papel de las levaduras no-*Saccharomyces* en la producción de vinos y su selección para fermentaciones controladas junto con *Saccharomyces*, pasando de ser consideradas como microorganismos indeseables, a ser levaduras que podrían aportar características positivas y tener una gran utilidad para la mejora de la calidad y el perfil aromático de los vinos.

En el presente trabajo se ha realizado una caracterización de varias levaduras no-*Saccharomyces* aisladas en una bodega de la D.O. Rueda, en Verdejo, durante las vendimias de los años 2010 y 2012. Por un lado, una caracterización enzimática buscando la producción de cuatro enzimas relacionadas con el aroma y la calidad del vino, a través del empleo de los medios de cultivo específicos. Y, por otro lado, una caracterización bioquímica mediante el conocimiento de características como la cinética fermentativa o el carácter *killer* con influencia en el proceso fermentativo.

ABSTRACT

In the last few years there has been an increasing interest in investigating non-*Saccharomyces* role in the production of wine and their selection for controlled fermentation with *Saccharomyces*, going from being considered as undesirable microorganisms, to yeasts that could contribute with positive characteristics and have great usefulness for the enhancement of wine quality and its aromatic profile.

In the present study a characterization of several non-*Saccharomyces* yeasts isolated from Verdejo grapes harvested in vineyards of the D.O. Rueda in 2010 and 2012 has been carried out. On the one hand, an enzymatic screening for the production of four enzymes related to wine aroma and its final quality, by means of the use of specific culture media. On the other hand, a biochemical characterization through the knowledge of characteristics as fermentation kinetics or the *killer* character which influence the fermentative process.

1. INTRODUCCIÓN

La fermentación alcohólica espontánea donde se transforma el mosto de uva en vino, está llevada a cabo fundamentalmente por una sucesión de levaduras de diferentes especies presentes en el mosto, siendo *Saccharomyces cerevisiae* el microorganismo de mayor importancia (Ciani, Comitini, Mannazzu, & Domizio, 2010). Sin embargo, también participan en el proceso, las levaduras no-*Saccharomyces*, un grupo de levaduras muy heterogéneo que juegan un papel crucial durante los primeros momentos de la fermentación, pero que de forma habitual acaban muriendo progresivamente dejando paso al dominio de *S. cerevisiae* (Nikolaou, Soufleros, Bouloumpasi, & Tzanetakis, 2006).

Las fermentaciones espontáneas son empleadas, en general, por los enólogos para aumentar la complejidad aromática de los vinos, buscando una mayor expresión varietal para la obtención de unos vinos únicos y diferenciados del resto (Liu, Lu, Duan, & Yan, 2016). A pesar de que las cepas aisladas durante el proceso de fermentación espontánea pueden estar mejor adaptadas a las condiciones asociadas a una determinada región productora, y que la actividad metabólica obtenida con una mayor diversidad microbiológica puede producir vinos con cualidades o aromas distintivos, para evitar los riesgos y la impredecibilidad de los procesos espontáneos en muchos casos se recurre al uso de las levaduras comerciales (Tristezza et al., 2012).

Tradicionalmente, las levaduras no-*Saccharomyces* han sido consideradas microbiológicamente problemáticas y productoras de metabolitos negativos durante los procesos de fermentación. Durante mucho tiempo se buscaba evitar su presencia en el vino, pero en los últimos años se ha incrementado el interés por su participación beneficiosa en el proceso de vinificación y por su gran potencial enzimático (Belda et al., 2017). Actualmente existe una demanda creciente hacia la selección de cepas de levaduras de fuerte implantación en la zona que aseguren la permanencia y/o mejora de las características organolépticas consideradas como representativas de una determinada región vitícola (Tristezza et al., 2012). Por este motivo las levaduras no-*Saccharomyces* se emplean en las bodegas buscando la tipicidad y una mayor complejidad de sus vinos que únicamente se consigue con una mayor diversidad microbiana a nivel de cepa (Belda, Ruiz, Alastruey-Izquierdo, et al., 2016).

Actualmente el sector del vino se encuentra enormemente globalizado y existe una gran competencia. Los enólogos se enfrentan a la necesidad de satisfacer las necesidades del mercado y la creciente demanda existente hacia productos innovadores, con autenticidad y diferenciación varietal. Por lo tanto, el empleo de levaduras no-*Saccharomyces* puede ser una oportunidad para la elaboración de vinos únicos pero realizando su producción en un proceso controlado y con un menor riesgo (Padilla, Gil, & Manzanares, 2016; Francesca et al., 2016).

Varios estudios han evidenciado las características enzimáticas de diversas levaduras implicadas en el proceso de fermentación. No obstante, la mayoría de las levaduras *S. cerevisiae* no presentan las citadas actividades enzimáticas que son de gran interés o lo hacen de forma muy limitada (Belda, Ruiz, Navascués, et al., 2016). Es por este motivo que existe una tendencia hacia los estudios centrados en levaduras no-*Saccharomyces* capaces de producir una serie de enzimas endo y exocelulares que pueden resultar muy útiles para procesos enológicos (Escribano et al., 2017). Por lo tanto, pueden tener un gran impacto en la calidad final del vino, modificando algunas de sus propiedades, enriqueciendo el perfil aromático o las propiedades tecnológicas

mediante estabilización del color (Tolosa & Prieto, 2018). Además, las levaduras no-*Saccharomyces* podrían ser una fuente potencial para la producción comercial de enzimas para su uso en los procesos de elaboración vínica (Strauss, Jolly, Lambrechts, & Van Rensburg, 2001).

El uso de levaduras productoras de enzimas en lugar de únicamente enzimas comerciales permite optimizar al máximo las propiedades de las distintas cepas, ya que las levaduras permiten mejorar la calidad de los vinos blancos, contribuyendo a una diferenciación aromática produciendo un mayor contenido de compuestos volátiles (Samoticha, Wojdyło, Chmielewska, Politowicz, & Szumny, 2017).

Entre las enzimas con una mayor relevancia para el proceso enológico, destacan aquellas que tienen influencia en la mejora aromática y/o el proceso tecnológico. Por un lado, las enzimas con mayor implicación en la liberación de compuestos aromáticos a partir de compuestos no volátiles; la β -glucosidasa, implicada en la liberación de monoterpenoles mediante hidrólisis de los precursores y la β -liasa con intervención en la liberación de precursores volátiles aromáticos (Belda, 2016; Padilla, 2016). Por otro lado, las actividades enzimáticas que tienen interés tanto tecnológico como en la mejora aromática; la β -glucanasa, una enzima encargada de la degradación de la pared de las células contribuyendo a la liberación de precursores aromáticos y facilitando procesos como la clarificación y filtración del vino y la proteasa relacionada con la mejora de diferentes características tecnológicas y sensoriales de los vinos (Schwentke, Sabel, Petri, König, & Claus, 2014).

Las levaduras con actividad β -glucosidasa pueden jugar un papel importante en la liberación de sustancias volátiles a partir de precursores no volátiles (Tolosa & Prieto, 2018). Los terpenos son un tipo de compuestos aromáticos que contribuyen beneficiosamente a la mejora del aroma de los vinos. La liberación de estos aromas volátiles es particularmente importante en el caso de los vinos blancos (Belda et al., 2017). La β -glucosidasa rompe la unión que tienen muchos terpenos con moléculas de azúcar formando compuestos no aromáticos, liberando el terpeno en su forma aromática (Escribano et al., 2017). Dependiendo de los azúcares unidos al complejo precursor puede requerirse un primer paso con la actuación de las enzimas α -L-arabinofuranosidasa, α -ramnosidasa, β -xilosidasa o β -apiosidasa. A continuación, la β -glucosidasa liberaría los monoterpenoles, incrementando de este modo el aroma de los vinos que pasan a tener perfiles aromáticos más agradables y varietales (Cordero Otero et al., 2003).

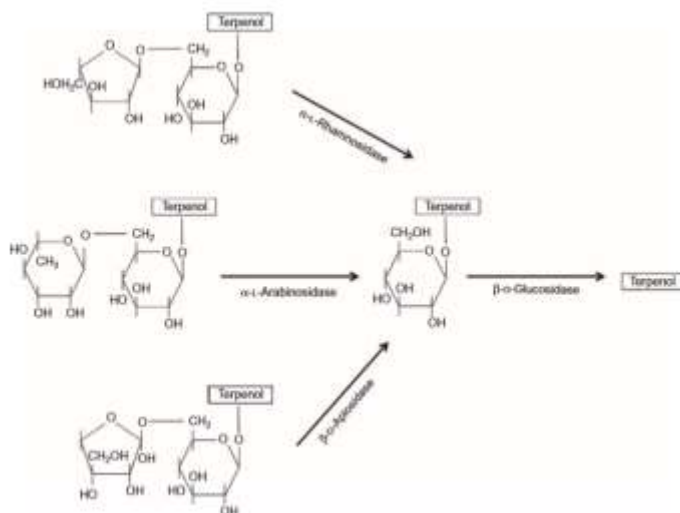


Figura 1: Hidrólisis enzimática de terpenoles por la acción de la β -glucosidasa. Fuente: Tolosa et al., 2018

La actividad β -liasa incrementa los niveles de compuestos como el 4-metil-4-sulfanilpentan-2-ona (4-MSP) o el 3-sulfanilhexan-1-ol (3-SH) que se liberan durante la fermentación y que se encontraban en las uvas en forma de precursores no volátiles unidos a una cisteína (Belda et al., 2017). La actividad β -liasa rompe el precursor aromático liberando los correspondientes tioles volátiles, y modificando el perfil aromático de los vinos, revelando aromas cuyos descriptores son los de fruta de la pasión, frutas tropicales, cítricos y notas vegetales como el boj (Belda, Ruiz, Navascués, et al., 2016). La actividad β -liasa es una característica dependiente de la cepa, sin embargo, los estudios sobre levaduras no-*Saccharomyces* capaces de liberar estos tioles volátiles en el vino son muy escasos (Belda, Ruiz, Alastruey-Izquierdo, et al., 2016).

La capacidad de las levaduras para producir enzimas proteasas ha sido estudiada por diferentes autores por su implicación en varios procesos tecnológicos de la vinificación. La importancia de estas enzimas se basa en su potencial de degradación de enlaces peptídicos (Tolosa & Prieto, 2018). Esta actividad proteasa puede contribuir a la degradación de las proteínas causantes de los problemas de inestabilidad proteica especialmente importantes en el caso de los vinos blancos. De este modo se podría evitar o limitar la adición de productos como la bentonita, una práctica muy extendida que sirve para evitar las quiebras proteicas pero que tiene un gran impacto negativo en las características organolépticas de los vinos (Belda, Ruiz, Alastruey-Izquierdo, et al., 2016). Por otro lado, otro aspecto dependiente de las proteasas es la posibilidad de su uso para facilitar la liberación de compuestos fenólicos que ayuden a mejorar los procesos tecnológicos como la clarificación y la filtración (Belda, Ruiz, Alastruey-Izquierdo, et al., 2016).

La acción de la enzima exocelular β -glucanasa produce el aumento de ciertos compuestos que incrementan el aroma mediante la hidrólisis de precursores glicosilados. Además, la enzima facilita los procesos de filtración por su capacidad, en unas determinadas condiciones, de hidrolizar los glucanos con poder colmatante procedentes de uvas afectadas por *Botrytis* (Schwentke et al., 2014). Esta enzima está directamente relacionada con la estabilización del color y la clarificación de los vinos debido a su poder de degradación de polisacáridos de las paredes celulares, que además contribuyen a la liberación de precursores de las bayas al mosto. La actividad β -glucanasa influye aumentando la extracción de compuestos fenólicos y, por tanto, se incrementan el color y los compuestos aromáticos volátiles durante las maceraciones, obteniéndose de este modo vinos con un mejor perfil aromático, así como con un color más intenso y estable en el tiempo (Escribano et al., 2017).

Además de la actividad enzimática hay que tener en cuenta ciertas características con relevancia en el proceso de vinificación como son la cinética fermentativa o el factor *killer*. Estas pueden servir como criterio de selección para escoger las levaduras que presenten unas propiedades más adecuadas (Nikolaou et al., 2006). Muchas de las levaduras no-*Saccharomyces* que han sido estudiadas presentan una lenta capacidad fermentativa o un metabolismo aeróbico, con una baja tolerancia a los niveles de etanol en fermentación que inhiben su crecimiento haciendo que únicamente permanezcan activas durante un corto periodo de tiempo (Segura-garcía, Taillandier, Brandam, & Gschaedler, 2015). El carácter *killer* de las levaduras tiene una gran influencia en la composición de la microbiota de una fermentación, se trata de un factor competitivo muy estudiado que favorece la implantación de las levaduras dotadas con el fenotipo *killer* sobre el resto y esto puede suponer una ventaja o un problema para la finalización de la fermentación (Izgü, Altinbay, & Yüceliş, 1997). Los distintos fenotipos respecto al carácter *killer* que se pueden encontrar son *killer* (K+R+), sensible (K-R-), neutra (K-R+) y suicida (K+R-). Las cepas con fenotipo *killer* producen una toxina que es letal para las sensibles, mientras que las neutras son resistentes. Por otro lado, las sensibles no son

resistentes a la propia toxina que ellas mismas secretan, y ni las cepas sensibles ni las neutras producen la toxina (Gutiérrez, Epifanio, Garijo, López, & Santamaría, 2001). Algunos estudios más recientes han comprobado que algunas cepas de *Torulaspora delbrueckii* con carácter *killer* pueden completar fermentaciones por sí mismas aunque de forma mucho más lenta que las realizadas por *S. cerevisiae* (Valera, Morcillo-parra, Zagórska, Mas, & Beltran, 2019).

A pesar de su bajo poder fermentativo, su potencial enzimático convierte a las levaduras no-*Saccharomyces* en una útil herramienta para la mejora de las características organolépticas finales de los vinos (Belda, Ruiz, Alastruey-Izquierdo, et al., 2016). Algunos estudios indican que un posible uso podría partir de la inoculación secuencial de no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces* para modular y diversificar las características del vino sin sufrir los problemas que aparecen cuando no-*Saccharomyces* son utilizadas de forma individual (Escribano-Viana et al., 2018). El uso de cultivos mixtos de levaduras *S. cerevisiae* y diferentes especies de no *Saccharomyces* representa una herramienta para la modificación y mejora de la composición de los vinos, pero evitando los problemas surgidos cuando estas levaduras menos convencionales se utilizan de forma aislada e incontrolada, como pueden ser la ralentización o parada del proceso fermentativo o la aparición de defectos sensoriales (Escribano-Viana et al., 2018). Por lo tanto, se trata de una alternativa a las fermentaciones espontáneas y a la inoculación de levaduras únicamente *Saccharomyces* donde se perderían las características específicas de las diferentes levaduras no-*Saccharomyces* (Ciani et al., 2010).

En el presente trabajo se estudian a las características enzimáticas y bioquímicas para poder realizar una adecuada selección de cepas con una mayor producción de enzimas deseadas que permitan facilitar el proceso de vinificación y obtener vinos con mejores características organolépticas, pero que a su vez presenten una cinética y poder fermentativos correctos y un fenotipo *killer* o neutro que permita su supervivencia, así como también la posible posterior implantación de levaduras *Saccharomyces*.

2. ANTECEDENTES

Para la realización del estudio se utilizó una colección de levaduras previamente aisladas en la E.T.S. de Ingenierías Agrarias de Palencia de uva de la variedad Verdejo procedente de tres parcelas diferentes durante las vendimias de 2010 y 2012 en una bodega de la Denominación de Origen Rueda.

El aislamiento se realizó mediante la toma de muestras en distintas etapas del proceso de vinificación en la bodega, en mosto de uva recién estrujado (MURE), mosto desfangado (MDB), inicio de fermentación (IFB) fermentación tumultuosa (FTB) y final de fermentación (FFB).

Posteriormente, se realizó una siembra en masa con el mosto en medio de cultivo, y transcurridas entre 48 y 72 horas de incubación en la estufa a 28°C, se llevó a cabo una serie de siembras en estría y pases a placas con medio sólido hasta obtener los aislados.

El total de aislados fue de 484 de los cuales únicamente 55 fueron no-*Saccharomyces*. Las levaduras aisladas se enviaron en placas de cultivo al Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León para su identificación mediante métodos moleculares. Se aisló el ADN y por medio de la técnica PCR se realizó la amplificación de la región ribosomal D1/D2 del gen ARN 26S para su posterior secuenciación (RESOLUCIÓN OIV-OENO 408-2011). Después, la secuencia genética se comparó con

las existentes en la base de datos GenBank NCBI para identificar las levaduras a nivel de especie.

Una vez que las levaduras fueron aisladas, secuenciadas e identificadas, se realizó una selección para eliminar del estudio todas las levaduras con características indeseables como la presencia de metabolismo oxidativo, la formación de velo, la producción de aromas negativos y en general las que no presentaban ningún tipo de interés enológico. De esta forma para el estudio sólo se escogieron las que podían presentar características de interés.

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El objetivo principal del presente estudio es la caracterización de distintas cepas de levaduras no-*Saccharomyces* aisladas a lo largo de diferentes etapas del proceso de vinificación de uva de la variedad Verdejo en una bodega de la D.O. Rueda para valorar la existencia de posibles propiedades de interés para la mejora del proceso tecnológico y la calidad final de los vinos.

Con el estudio se pretende una caracterización enzimática y bioquímica para lo cual se plantean los siguientes objetivos específicos:

Caracterización enzimática de estas levaduras no-*Saccharomyces* para la determinación de actividades enzimáticas que pueden contribuir a la mejora del proceso de vinificación y el perfil aromático de los vinos.

Estudio de las propiedades bioquímicas de estas levaduras no-*Saccharomyces*, prestando especial atención a su cinética fermentativa y carácter *killer*.

Obtención de levaduras con características de interés para su aplicación enológica en base a su producción de enzimas y sus propiedades bioquímicas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Microorganismos

4.1.1. Levaduras no-*Saccharomyces*

Para la realización del estudio se utilizaron 36 cepas de levaduras no-*Saccharomyces* procedentes del aislamiento realizado previamente durante la vinificación de Verdejo englobadas dentro de 4 géneros (tabla 1). Las levaduras pertenecen a las especies *Hanseniaspora meyeri*, *Hanseniaspora osmophila*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia kudriavzevii*, *Torulaspota delbrueckii*, y *Wickerhamomyces anomalus*.



Figura 2: Levaduras del estudio

Tabla 1: Levaduras seleccionadas y las etapas de aislamiento en la vinificación. MURE; mosto de uva recién estrujado en bodega, MDB; mosto desfangado en bodega, IFB; inicio de fermentación en bodega, FTB; fermentación tumultuosa en bodega, FFB; final de fermentación en bodega.

Especie	Designación	Etapas de aislamiento
<i>W. anomalus</i>	WA1	IFB
<i>W. anomalus</i>	WA2	FFB
<i>W. anomalus</i>	WA3	MURE
<i>W. anomalus</i>	WA4	MURE
<i>W. anomalus</i>	WA5	MURE
<i>W. anomalus</i>	WA6	FFB
<i>W. anomalus</i>	WA7	MDB
<i>W. anomalus</i>	WA8	MDB
<i>W. anomalus</i>	WA9	MDB
<i>W. anomalus</i>	WA10	FTB
<i>W. anomalus</i>	WA11	FFB
<i>W. anomalus</i>	WA12	MDB
<i>W. anomalus</i>	WA13	MDB
<i>W. anomalus</i>	WA14	MDB
<i>W. anomalus</i>	WA15	MDB
<i>W. anomalus</i>	WA16	MDB
<i>P. kudriavzevii</i>	PK1	MURE
<i>P. kudriavzevii</i>	PK2	MURE
<i>P. kudriavzevii</i>	PK3	MURE
<i>P. kudriavzevii</i>	PK4	MURE
<i>P. kudriavzevii</i>	PK5	MURE
<i>P. kudriavzevii</i>	PK6	MURE
<i>P. kudriavzevii</i>	PK7	MURE
<i>P. kudriavzevii</i>	PK8	MURE
<i>P. kudriavzevii</i>	PK9	MURE
<i>P. kudriavzevii</i>	PK10	MURE
<i>P. kudriavzevii</i>	PK11	MURE
<i>P. kudriavzevii</i>	PK12	MURE
<i>P. kudriavzevii</i>	PK13	MURE
<i>H. osmophila</i>	HO1	MURE
<i>H. meyeri</i>	HM1	MDB
<i>P. guilliermondii</i>	PG1	FFB
<i>P. guilliermondii</i>	PG2	MURE
<i>T. delbrueckii</i>	TD1	MDB
<i>T. delbrueckii</i>	TD2	MDB
<i>T. delbrueckii</i>	TD3	MDB

Como control, se utilizaron varias levaduras. Por un lado, las obtenidas directamente de la CECT (Colección Española de Cultivos Tipo) como *Schizosaccharomyces pombe* (CECT 11197) que se utilizó como control negativo en los ensayos enzimáticos y *Torulasporea delbrueckii* (CECT 1880) como control positivo para el ensayo de la β -liasa. Por otro lado, *Wickerhamomyces anomalus*, aislada en el laboratorio de microbiología de la ETSIIAA y posteriormente secuenciada, fue utilizada como control positivo de los ensayos de proteasa, β -glucosidasa y β -glucanasa.

Para la realización del test *killer* se emplearon dos cepas de levaduras *Saccharomyces* obtenidas de la CECT, con fenotipo sensible *S. cerevisiae* CECT 1443 y *S. cerevisiae* CECT 1414 que posee fenotipo *killer*.

4.1.2. Mantenimiento y cultivo de microorganismos

El cultivo de los microorganismos se llevó a cabo en una cabina de flujo laminar (INDELAB).

El mantenimiento de las levaduras se realizó en tubos de ensayo con un medio sólido YPD descrito en 4.2.2. realizando pases, como máximo cada 20 días con el objetivo de refrescar el cultivo.

Para la obtención de la biomasa requerida para los ensayos, los inóculos se prepararon en medio YPD líquido descrito en 4.2.2. sin adicionar el agar. En cuanto a las condiciones de cultivo, las levaduras fueron mantenidas a una temperatura de 26°C.

4.1.3. Observación al microscopio

Las levaduras se observaron al microscopio (Leica DM750) usando los objetivos 40X y 100X. Directamente del cultivo sólido, las levaduras fueron tomadas con el asa de siembra y llevadas a una gota de agua destilada depositada en un portaobjetos, se realizó una extensión de la colonia sobre la gota de agua y se cubrió la preparación con un cubre. A continuación, se realizó la observación.

4.1.4. Estimación de células para siembra

Con el fin de realizar siembras de forma uniforme en los ensayos que así se requiere, se establece el volumen de inoculación necesario en función de las células presentes en cada una de las muestras, utilizando la escala de McFarland y la correspondiente recta de calibrado. Se trata de un método que relaciona la turbidez de las muestras con una serie de patrones de sulfato de bario medida con un espectrofotómetro (Spectronic® 20 Genesys™) a 600nm. Esta técnica nos permite conocer el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) (McFarland et al. 1999).

4.2. Medios de cultivo

4.2.1. Mosto

El mosto empleado es de uva de la variedad Verdejo, de una bodega de la D.O. Rueda de la vendimia del año 2016. Tras el proceso de desfangado se trasladó a la ETSIAA de Palencia y a la llegada al laboratorio se esterilizó a vapor fluyente durante 25 minutos y posteriormente se conservó congelado a -20°C hasta su uso.

En el momento de su uso se descongeló, homogeneizó y previamente a su utilización se determinó el grado mediante el método ebullométrico con un ebullómetro eléctrico de GAB SYSTEM, se determinó el pH mediante un pH-metro Crison y el contenido de azúcar mediante un refractómetro (ATAGO, Hand refractometer ATC-1). El mosto presentaba un grado alcohólico volumétrico de $0 \pm 0,01$ %, pH de $3,48 \pm 0,2$ y $22,3 \pm 0,1$ °Brix, que corresponden con una concentración de 203,1 g/l de azúcar y un grado probable de 12,2%.



Figura 3: Mosto de Verdejo

4.2.2. Medio YPD

El mantenimiento de las levaduras se realizó en medio sólido YPD (extracto de levadura-peptona-dextrosa) en tubos de ensayo. Para la elaboración del medio de cultivo se utilizaron 2% (p/v) de glucosa (Labkem), 2% (p/v) de peptona (Panreac), 1% (p/v) de extracto de levadura (Labkem) y 1,5% (p/v) de agar (BD BactoTMAgar). Previamente a su utilización, el medio se esterilizó durante 15 minutos y a una temperatura de 121°C.

4.2.3. Medio actividad β -glucosidasa

Para evaluar la presencia y actividad de la enzima β -glucosidasa se utilizó el método descrito por Diddens y Lodder, citado por Lodder y Kreger Van Rij (1952). Se preparó el medio de cultivo compuesto por 0,5 % (p/v) de arbutina (Sigma), 0,1% (p/v) de extracto de levadura (Labkem), 2% (p/v) de agar (BD BactoTMAgar) y 1% (p/v) de solución de cloruro férrico. El medio se esterilizó durante 20 minutos y a una temperatura de 121°C.

4.2.4. Medio actividad proteasa

Con el fin de determinar la actividad proteasa se preparó un medio de cultivo que contenía 1% (p/v) de extracto de levadura (Labkem), 2% (p/v) de bactopectona (Panreac) , 2% (p/v) de glucosa (Labkem), 2% (p/v) de agar (BD BactoTMAgar) y 2% (p/v) de leche desnatada en polvo (Belda, Ruiz, Alastruey-Izquierdo, et al., 2016). El medio se esterilizó durante 15 minutos y a 121°C, a excepción de la leche que se esterilizó por separado para posteriormente mezclar los componentes.

4.2.5. Medio actividad β -glucanasa

Para la determinación de la actividad β -glucanasa se preparó un medio de cultivo que contiene 1% (p/v) de extracto de levadura (Labkem), 2% (p/v) de bactopectona (Panreac), 2% (p/v) de glucosa (Labkem), 2% (p/v) de agar (BD BactoTMAgar) y 0,2% (p/v) de betaglucanos de levadura (Megazyme) según el método descrito por Escribano et al., 2017. El medio se esterilizó durante 15 minutos y a una temperatura de 121°C.

4.2.6. Medio actividad β -liasa

Con el objetivo de comprobar la actividad β -liasa se preparó un medio de cultivo selectivo YCB-SMC (Belda, Ruiz, Navascués, et al., 2016) con algunas modificaciones para optimizar la prueba. Este medio tiene la siguiente composición, 0,1% (p/v) de S-metil-L-cisteína (Sigma), 1,2% (p/v) de base carbonatada de levadura (Difco™), 0,01% (p/v) de piridoxal-5'-fosfato (Sigma) y en el caso del medio sólido 2% (p/v) de agar (BD BactoTMAgar). El pH del medio se ajustó con ácido clorhídrico hasta un valor de 3,5.

Todos los componentes del medio exceptuando el agar se esterilizaron mediante filtración por una membrana de 0,2 μ m. El agar se esterilizó durante 15 minutos y a una temperatura de 121°C (Belda, Ruiz, Navascués, et al., 2016).

4.2.7. Medio test *killer* y sensible

Para el ensayo *killer* se preparó un medio de cultivo específico cuya composición era de 0,1% (p/v) de extracto de levadura (Labkem), 0,2% (p/v) de bactopectona (Panreac), 0,2% (p/v) de glucosa (Labkem), 0,35% (p/v) de agar (BD BacroTMAgar) y se acidificó con ácido cítrico hasta un pH de 4,2-4,7, se añadió 2% (v/v) de azul de metileno preparado previamente al 1% (v/v) y se le añadió 1% (v/v) de tampón citrofosfato 2 M (Izgü et al. 1997). Previamente a su utilización, el medio se esteriliza a 121°C durante 15 minutos a vapor fluyente.



Figura 4: Medio *killer*

4.3. Caracterización enzimática

4.3.1. Ensayo β -glucosidasa

Se realizó en el medio sólido descrito en el 4.2.3. en el que se realizó la siembra en estría, tomando el cultivo de los tubos de ensayo. Posteriormente los tubos de ensayo se incubaron en la estufa a 26°C durante 15 días. Una vez pasado ese tiempo, se realizó la observación de los tubos de ensayo. La enzima β -glucosidasa hidroliza la arbutina, liberando una quinona que reacciona con el hierro de la solución de cloruro férrico produciendo una pigmentación marrón-negra del medio. Por tanto, la prueba se consideró positiva cuando aparecía una coloración oscura en el medio como consecuencia de su capacidad para hidrolizar la arbutina.

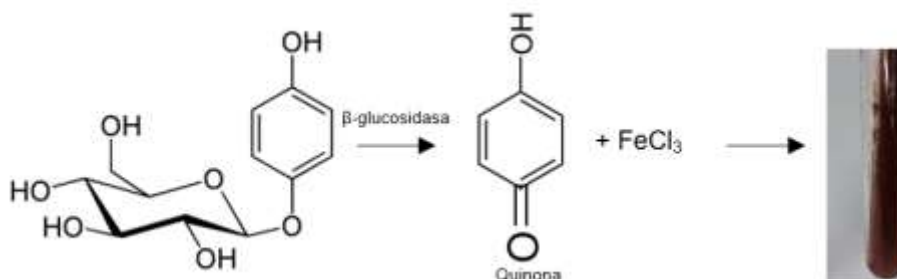


Figura 5: Hidrólisis de quinona y reacción con la sal de hierro

4.3.2. Ensayo proteasa

Se realizó en el medio sólido descrito en el 4.2.4. en el que se llevó a cabo la siembra en estría a partir del cultivo de los tubos de ensayo. Las placas se incubaron en la estufa a 26°C, durante 5 días para su crecimiento. Transcurrido ese tiempo, se observaron las placas. Las enzimas proteasas degradan la proteína de la leche para la obtención de nitrógeno, por tanto, la presencia de estas enzimas capaces de hidrolizar la caseína del medio de cultivo, se manifiesta con la formación de halos de hidrólisis translúcidos. La prueba se consideró positiva cuando aparecía un halo alrededor de las colonias de levadura.

4.3.3. Ensayo β -glucanasa

Se realizó en el medio sólido descrito en el 4.2.5. en el que se llevó a cabo la siembra a partir de los cultivos en medio YPD. Las placas se incubaron en la estufa a 26°C durante 5 días. Pasados esos días, las placas se lavaron y tiñeron, de la siguiente manera: las colonias se eliminaron con ayuda de agua destilada y se realizó la tinción de las placas de Petri con una disolución 0,03% (p/v) de Congo red (Sigma-Aldrich). El ensayo se basa en la hidrólisis de los glucanos del medio por la presencia de las enzimas β -glucanasas, que se manifiesta con la formación de halos translúcidos que se observan únicamente tras la tinción con la disolución de Congo red. Una vez realizado el paso anterior, se observaron las placas y la prueba se consideró positiva si aparecía un halo en el lugar que ocupaba la colonia de levadura antes del enjuague con el agua destilada.

4.3.4. Ensayo β -liasa

Inicialmente se siguió el protocolo propuesto por Belda et al., (2016) sin modificaciones. La siembra se realizó en el medio sólido descrito en el 4.2.6. mediante una siembra en estría y se incubó en la estufa a 26°C. A continuación, se realizó un pase a un nuevo medio sólido con la misma composición. El ensayo se basa en la capacidad de hidrólisis del S-metil-L-cisteína del medio, con estructura análoga a los precursores de cisteína presentes en el mosto para la obtención de nitrógeno, de modo que cuanto mayor actividad β -liasa presenta una levadura, mayor es su fuente de nitrógeno y, por tanto, presenta un mayor crecimiento. La prueba es positiva si observamos un crecimiento significativo de las colonias transcurridas entre 48 y 72 horas desde la siembra. Utilizamos a las levaduras *S. pombe* (CECT 11197) como control negativo y *T. delbrueckii* (CECT 1880) como positivo.

Ante la imposibilidad de encontrar diferencias apreciables en el crecimiento de las distintas levaduras transcurridas las 48 horas, se modificó la metodología, realizando la prueba en medio líquido. El ensayo se realizó en 1ml del medio mencionado en el 4.2.6. pero en ausencia de agar y en tubos de ensayo, donde se inoculó, una suspensión de las levaduras no-*Saccharomyces* en agua peptonada (peptona 1,0 g/l (p/v), NaCl 8,5 g/l, pH 7,0 \pm 0,2). Las levaduras procedían previamente del medio sólido en el cuál no se habían encontrado diferencias. Con el fin de inocular una cantidad equivalente de 10⁶ células/ml en los tubos, se utilizó la escala McFarland para estimar la cantidad de levaduras presentes en la suspensión.



Figura 6: Preparación método líquido β -liasa

Una vez llevada a cabo la siembra se introdujeron los tubos a la estufa a 26°C y transcurridas 48 horas se midió la absorbancia a 600 nm en el espectrofotómetro (Spectronic® 20 Genesys™). El valor de la densidad óptica (D.O.) o turbidez del medio de los tubos de ensayo se relacionó con el crecimiento de las diferentes levaduras y, por tanto, con la actividad enzimática.

4.4. Caracterización bioquímica

4.4.1. Cinética fermentativa

El procedimiento seguido para la evaluación de la cinética fermentativa es el reseñado por la OIV (RESOLUCIÓN OIV-OENO 370-2012). El ensayo de microvinificación se llevó a cabo en un matraz Erlenmeyer de 100ml al que se añadieron 50 ml del mosto descrito en el 4.2.1., previamente homogeneizado y esterilizado a 121°C durante 15 min.



Figura 7: Microfermentador con válvula Müller

En cada matraz se inocularon 10^6 células/ml de una suspensión de las levaduras no-*Saccharomyces* del estudio que se habían cultivado previamente en medio líquido YPD a 26 °C durante 24 horas antes de la siembra. Para equiparar la cantidad inoculada de levadura se utiliza la escala McFarland.

Los matraces se sellaron con una válvula Müller y se incubaron en la estufa a 21°C hasta obtener un peso estable. En las mismas condiciones se mantiene un control para observar que no existe fermentación ni producción de CO₂. Los matraces estuvieron en la estufa un total de 22 días durante los cuales se controló la producción diaria de CO₂ durante la fermentación pesando los matraces en una balanza analítica (RADWAG). Los gramos de CO₂ desprendidos se representaron trazando las curvas de fermentación, siendo proporcionales a los gramos de azúcar que fermenta cada cepa de levadura.

4.4.2. Poder fermentativo y vigor fermentativo

Se expresa como (%vol.), el porcentaje de etanol producido y se obtiene de la diferencia del peso inicial y final del matraz de la siguiente forma:

$$\text{Poder fermentativo} = 2,5 \cdot \Delta \text{ peso}$$

El poder fermentativo se determinó una vez acabada la fermentación para conocer la cantidad de azúcar que cada cepa de levadura estudiada era capaz de fermentar. (Resolución OIV-OENO 370-2012).

El vigor fermentativo es la velocidad a la que la levadura inicia la fermentación, se expresa en gramos de CO₂ producidos de 2 a 3 días después del comienzo de la fermentación (Resolución OIV-OENO 370-2012).

Un correcto vigor fermentativo está relacionado con levaduras muy activas con una rápida multiplicación e implantación en el mosto y, por tanto, un arranque de la fermentación de forma rápida, evitando los posibles ataques microbiológicos que podría sufrir el mosto.

4.4.3. Azúcares reductores

El contenido de azúcares reductores se determinó según el procedimiento de Rebelein, que implica la reacción de azúcares con las sales cúpricas en una solución alcalina y en caliente. El procedimiento se realizó paralelamente en vino y en el blanco, sustituyendo el vino por agua destilada. En un matraz se añadieron 2 ml de vino, 1 ml de solución cúprica y 5 ml de solución alcalina de sal de Seignette, y se introdujeron perlas de vidrio en el matraz. Se hirvió durante 2 minutos desde el momento de inicio de la ebullición. Se enfrió bajo el agua y a continuación se añadieron de forma sucesiva los reactivos según la metodología, 10 ml de KI 30%, 10 ml de ácido sulfúrico al 16% (p/v) y 2 ml de almidón al 2% y se agitó. Finalmente, para la determinación es necesaria una valoración con tiosulfato sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) hasta conseguir un viraje a un color marfil (García Barceló, 1990).

La diferencia entre el volumen gastado por el blanco y la muestra de vino es el resultado de azúcares reductores que se expresa como g/l de azúcar residual.

Según la Orden APA/2059/2002 la D.O. Rueda considera como vinos secos aquellos cuyos azúcares residuales son como máximo de 4 g/l.

4.4.4. Ensayo *killer*

La determinación del carácter *killer* de las cepas estudio se realizó siguiendo la metodología descrita por Izgü et al., 1997 que diferencia dos ensayos:

Test *killer*

Se preparó una suspensión de la cepa sensible *S. cerevisiae* (CETC 1443) en agua estéril y se sembró en masa en el medio específico para el estudio descrito en el 4.2.7. Seguidamente y sobre el medio sólido se sembró en estría la levadura estudio y se incubó en la estufa a 21°C durante una semana.

Test sensible

Se preparó una suspensión de todas las levaduras a estudiar en agua destilada estéril y se sembraron en masa con el medio específico descrito en el 4.2.7. A continuación, y sobre el medio solidificado se sembró en estría la cepa de levadura con factor *killer* *S. cerevisiae* (CETC 1414). Finalmente, se incubó a 21°C durante una semana.



Figura 8: No presencia de halo de inhibición



Figura 9: Presencia de halo de inhibición

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3. Actividad enzimática

Se llevaron a cabo distintos ensayos enzimáticos para medir la actividad de las diferentes levaduras. Las pruebas fueron realizadas por duplicado como se describe en el apartado 4.3. y fue necesaria la puesta a punto de los ensayos para determinar, de la forma más óptima posible, las actividades enzimáticas. Por un lado, se ajustó la temperatura de incubación de las levaduras a 26°C para garantizar su adecuado crecimiento. En la práctica, dada la imposibilidad de obtener resultados concluyentes también fue necesario modificar la metodología utilizada para medir la actividad β -liasa como se describe posteriormente.

En la Tabla 2 se recogen los resultados obtenidos en los ensayos de la actividad β -glucosidasa, proteasa β -glucanasa y β -liasa.

La actividad β -liasa alta y moderada, junto con la proteasa fueron las actividades más abundantes en las cepas estudiadas con una presencia en las levaduras del 66 y 50% respectivamente. Algo muy similar ocurre con la actividad β -glucosidasa, presente en la mitad de las levaduras del estudio, concretamente en la totalidad de las levaduras de la especie *W. anomalus* y en todas las del género *Hanseniaspora*. La actividad enzimática más extendida, como muestra la Tabla 2 fue la β -liasa, en relación con este grupo de enzimas se vio que se encontraba concretamente en el 100% de las levaduras de la especie *T. delbrueckii* y el género *Hanseniaspora*. De forma contraria, la enzima β -glucanasa se encontraba mucho menos extendida, únicamente 4 levaduras del estudio de las especies *W. anomalus* y *H. meyeri* fueron productoras de la enzima.

Las levaduras que producen un número más importante de enzimas exocelulares están incluidas en el género *Wickerhamomyces* puesto que todas fueron capaces de producir las enzimas proteasa y β -glucosidasa, y adicionalmente algunas de ellas también β -glucanasa y β -liasa. Por tanto, mostraron un gran potencial enzimático que deberá ir acompañado de una correcta fermentación para su posterior selección.

Tabla 2: Actividades enzimáticas de las levaduras del estudio. La actividad positiva está indicada con +; La actividad negativa se indica con -. La actividad β -lialsa alta +++, moderada ++ y baja +.

Levaduras	Actividades enzimáticas			
	β -glucosidasa	β -glucanasa	Proteasa	β -Lialsa
HM 1	-	+	+	+++
HO 1	-	-	+	+++
PG 1	+	-	-	++
PG 2	+	-	-	++
PK 1	-	-	-	+
PK 2	-	-	-	++
PK 3	-	-	-	+
PK 4	-	-	-	++
PK 5	-	-	-	++
PK 6	-	-	-	++
PK 7	-	-	-	++
PK 8	-	-	-	++
PK 9	-	-	-	++
PK 10	-	-	-	++
PK 11	-	-	-	++
PK 12	-	-	-	++
PK 13	-	-	-	++
TD 1	-	-	-	+++
TD 2	-	-	-	+++
TD 3	-	-	-	+++
WA 1	+	-	+	+
WA 2	+	-	+	+
WA 3	+	+	+	+
WA 4	+	+	+	+
WA 5	+	+	+	+
WA 6	+	-	+	+
WA 7	+	-	+	++
WA 8	+	-	+	+
WA 9	+	-	+	+
WA 10	+	-	+	++
WA 11	+	-	+	++
WA 12	+	-	+	+++
WA 13	+	-	+	++
WA 14	+	-	+	++
WA 15	+	-	+	++
WA 16	+	-	+	+

5.3.1. Ensayo β -glucosidasa

En relación con este grupo de enzimas los resultados indicaron que las levaduras de los géneros *P. guilliermondii* y *W. anomalus* presentaban actividad β -glucosidasa a diferencia de las especies *T. delbrueckii*, *H. meyeri*, *H. osmophila* o *P. kudriavzevii* donde la actividad β -glucosidasa era inexistente.

Previamente algunos trabajos mencionan la existencia de actividad β -glucosidasa en levaduras de la especie *P. guilliermondii* (da Silva et al., 2019) o de *P. anomalus* (ahora denominada como *W. anomalus*) (Spagna, Barbagallo, Palmeri, Restuccia, & Giudici, 2002). Por el contrario, otros indican la ausencia de actividad β -glucosidasa en las levaduras de la especie *T. delbrueckii* (Chen, Yap, & Liu, 2015; Belda, Ruiz, Alastruey-Izquierdo, et al., 2016) o *P. kudriavzevii* (Mónaco, Rodríguez, & Lopes, 2016).



Figura 10: Resultados positivos y negativos β -glucosidasa



Figura 11: Resultados positivo y negativo β -glucosidasa

5.3.2. Ensayo proteasa

La totalidad de las levaduras de la especie *W. anomalus* presentaron este tipo de actividad. Esto concuerda con estudios recientes donde observaron como algunas cepas de *P. anomalus* presentaban actividad proteasa, así como el potencial de *W. anomalus* para la producción de enzimas proteolíticas en general (Escribano et al., 2017) y más concretamente su actividad proteasa, según señalan otros autores (Tolosa & Prieto, 2018). En cuanto a las levaduras del género *Hanseniaspora*, todas presentaban halo alrededor de la levadura debido a su capacidad para sintetizar enzimas proteolíticas, resultado que concuerda con lo descrito con anterioridad por otros autores (Tolosa & Prieto, 2018). Por tanto, las levaduras de este género presentan un gran potencial para la eliminación de proteínas y así prevenir la formación de quiebras en vinos blancos, a diferencia de otros géneros estudiados previamente (Porter et al., 2019).

Sin embargo, no se detectó actividad en las especies *P. kudriavzevii*, contrariamente a los resultados de alta actividad proteasa asociada a las levaduras de esa especie en el estudio de Mónaco et al., (2016). Otras levaduras que podemos considerar con interés enológico como es el caso de especies menos abundantes en el viñedo como *T. delbrueckii* tampoco presentaron actividad proteasa de acuerdo a lo observado en estudios anteriores (Belda, Ruiz, Alastruey-Izquierdo, et al., 2016).

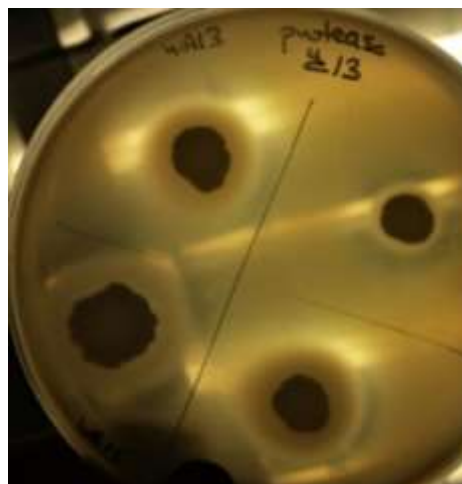


Figura 12: Presencia de halo alrededor de la levadura. Actividad proteasa

5.3.3. Ensayo β -glucanasa



Figura 13: Presencia de halo, resultado positivo β -glucanasa

Se detectó actividad β -glucanasa únicamente en algunas levaduras de la especie *W. anomalus* como WA3, WA4 y WA5, confirmando los resultados mostrados en el estudio previo de Schwentke et al., 2014 donde las levaduras de la especie *W. anomalus* presentaban actividad β -glucanasa. Del mismo modo, la levadura HM1 de la especie *H. meyeri* mostró producción de la enzima β -glucanasa. No así en el resto de las levaduras del estudio. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en estudios previos en las levaduras como *T. delbrueckii* no presentaba actividad β -glucanasa (Escribano et al., 2017).

5.3.4. Ensayo β -liasa

El ensayo de la β -liasa se realizó por duplicado tanto en el medio sólido como en el medio líquido. Inicialmente con la prueba en medio sólido no obtuvimos resultados diferenciables, el crecimiento resultaba demasiado homogéneo como para determinar con claridad si existían variaciones entre las levaduras.

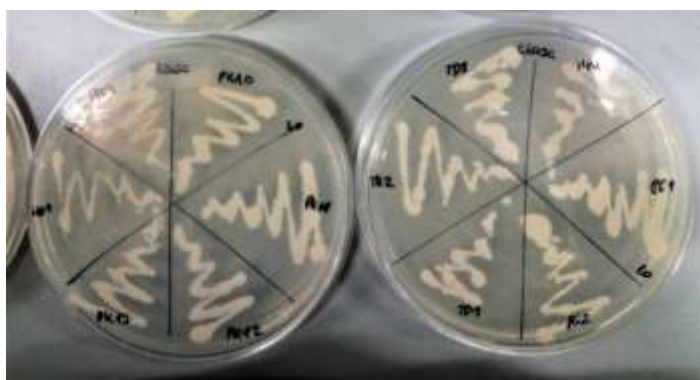


Figura 14: Ensayo de la liasa en medio sólido

Por este motivo se modificó la metodología descrita en el apartado 4.3.4. para tratar de obtener diferencias en la producción de esta enzima. El ensayo se realizó en medio líquido y el crecimiento se estimó mediante medida de la densidad óptica a 600 nm. Los datos se expresan como la media aritmética de las medidas de absorbancia obtenidas. El error se indica como la desviación estándar de la muestra (fig. 15).

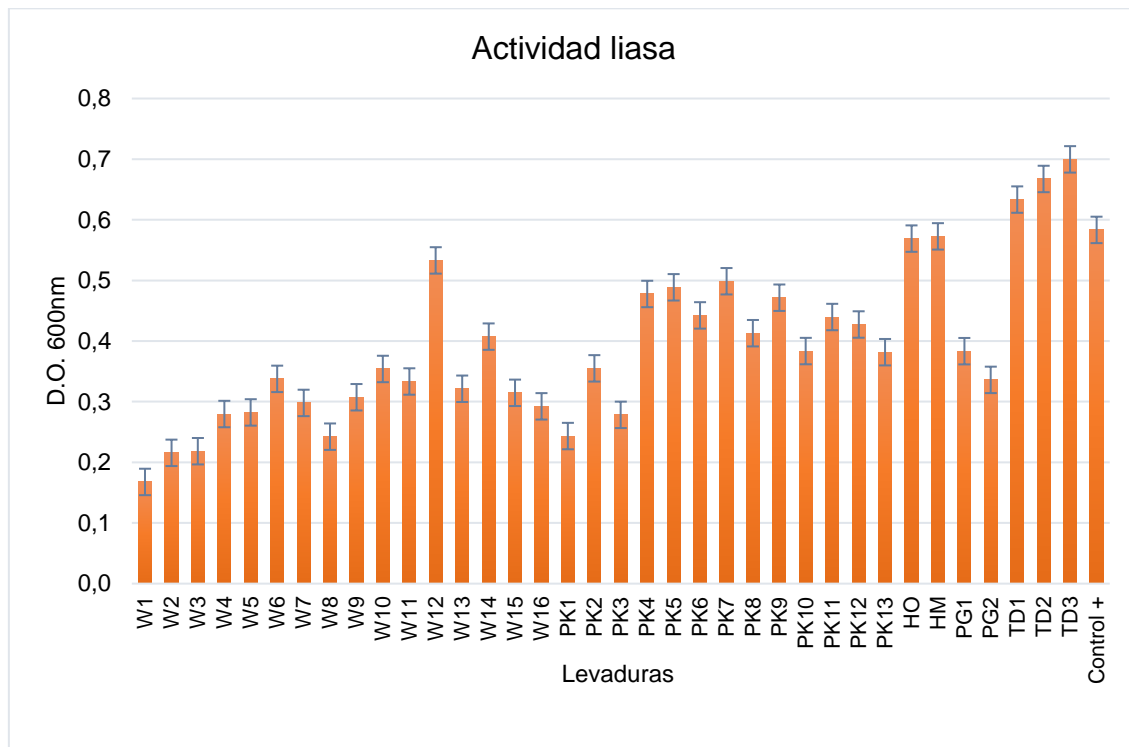


Figura 15: Resultados de la actividad β -liasa. Absorbancia de las distintas muestras a 600nm

Consideramos como control positivo a *T. delbrueckii* (CECT 1880) con gran actividad β -liasa, puesto que se ha demostrado que esta cepa de levadura aumenta la liberación de tioles volátiles (Benito, 2018). Todas las levaduras del estudio presentaron crecimiento y, por tanto, son productoras de β -liasa. Se consideró que las levaduras presentaban una actividad β -liasa alta en torno a un valor de densidad óptica a 600 nm igual o superior a 0,5, correspondiendo con el valor de la densidad obtenida con la medida del control positivo; actividad moderada cuando la densidad era de en torno a 0,3 y baja cuando no alcanzaban este último valor de densidad.

Podemos ver en la figura 15 que la actividad β -liasa se encuentra presente y de forma moderada en la mayoría de las levaduras estudiadas destacando el caso de HO1 y HM1 del género *Hanseniaspora* o W12 de la especie *W. anomalus*. De forma muy importante, entre las especies de no-*Saccharomyces* sobresale la actividad de las levaduras TD1, TD2 y TD3 de *T. delbrueckii*. Estos resultados confirman lo que ya habían visto otros autores, cuyos estudios indican que *T. delbrueckii* tiene una gran actividad β -liasa (Belda, Ruiz, Navascués, et al., 2016), que sería de interés, como ya indican varios estudios donde se confirma que esta actividad tienen una influencia en el aumento de la concentración de los tioles volátiles que hacen más complejo el aroma de los vinos blancos (Belda et al., 2017).

5.4. Cinética fermentativa

Se llevaron a cabo una serie de ensayos para la determinación de la cinética fermentativa de las levaduras del estudio con el objetivo de, entre las levaduras que presenten unas buenas propiedades enzimáticas, seleccionar las que presenten un rápido inicio de la fermentación y una estabilización en la producción de CO₂ lo más pronta posible. Como resultado de la determinación de la cinética fermentativa observamos que a la temperatura de 21°C no todas las levaduras finalizan la fermentación a los 22 días de acuerdo con las curvas de cinética fermentativa de las figuras 16 a 23. Puesto que las levaduras no-*Saccharomyces* no son capaces de finalizar el proceso de fermentación, se hace necesaria una inoculación secuencial que se realizaría dentro de las primeras 72 horas.

Los ensayos de cinética fermentativa se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como la media aritmética de las medidas obtenidas. El error se indica como la desviación estándar de la muestra. A continuación, se muestran los gráficos con la cinética de fermentación de las levaduras estudiadas a 21°C expresado en g de CO₂ producido/L frente al tiempo de fermentación en días (figuras 15-22).

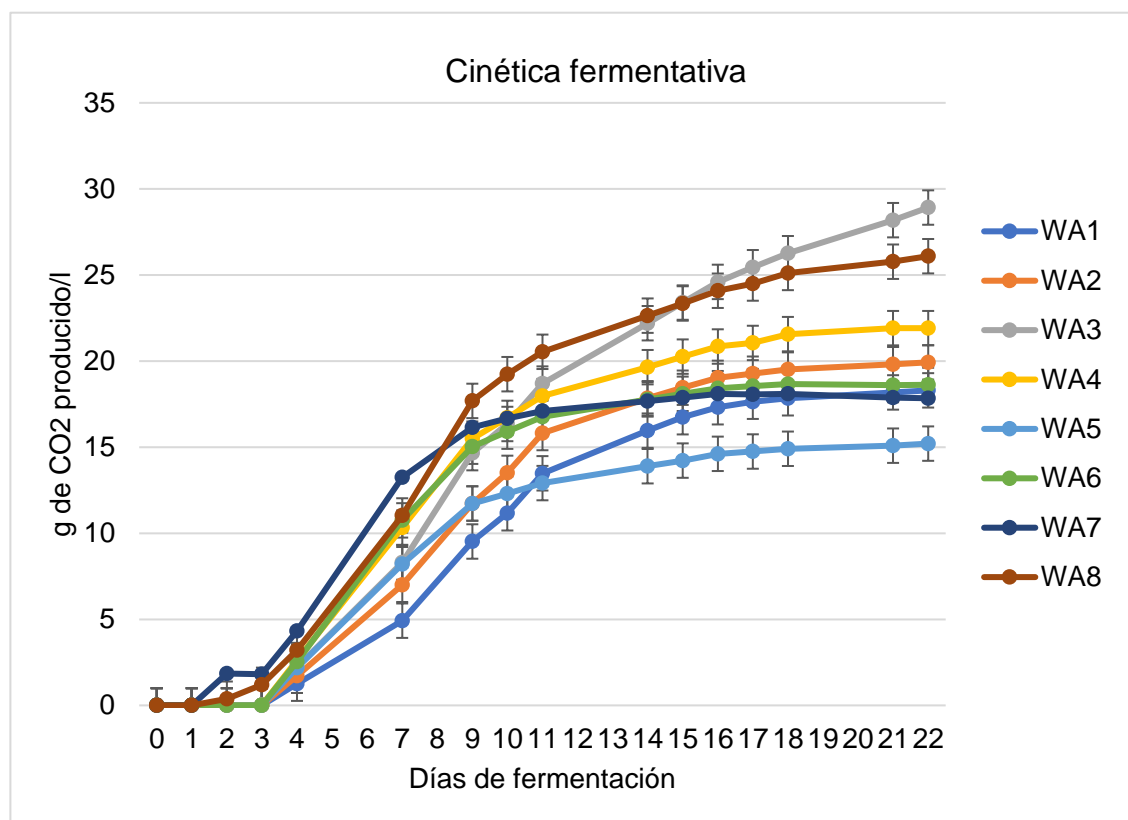


Figura 16: Cinética fermentativa a 21°C frente al tiempo de fermentación. Levaduras de la especie *W. anomalus*

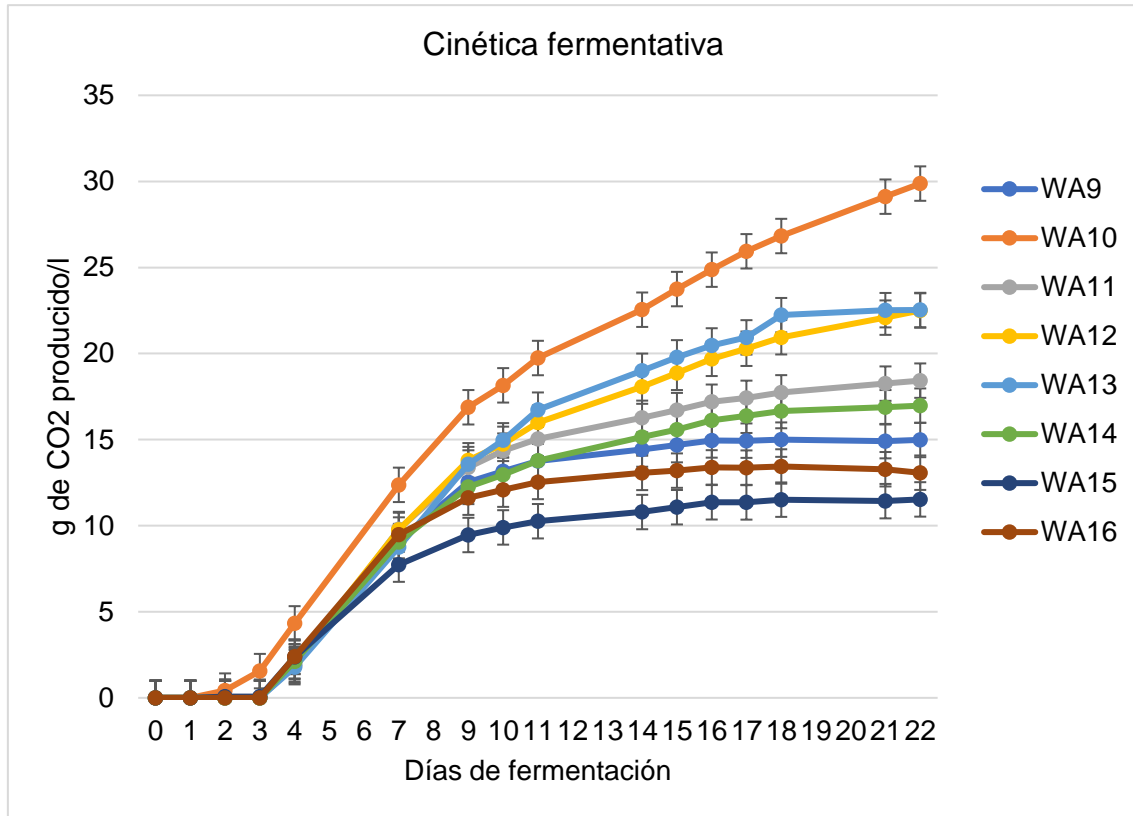


Figura 17: Cinética fermentativa a 21°C frente al tiempo de fermentación. Levaduras de la especie *W. anomalus*

Las figuras 16 y 17 muestran la cinética fermentativa de las 16 levaduras del estudio de la especie *W. anomalus* mostrando diferencias de producción de CO₂ entre todas ellas, mientras la WA15 y WA16 libera únicamente unos 10 g de CO₂/l, o las W5 y WA9 unos 15 g de CO₂/l, las levaduras WA8, WA10 y WA3 liberan aproximadamente 20 g más, es decir, son capaces de fermentar más gramos de azúcar. Esto supone una variación en el poder fermentativo de más de 1 % vol. (tabla 4). Las levaduras W1, WA2, WA4, WA5, WA6, WA7, WA11, WA12, WA13 y WA14 se mueven en torno a los 20 g de CO₂/l liberados, y presentan poder fermentativo de alrededor de 2,5 % vol. De cualquier forma, todas tienen una baja producción de CO₂ (fig. 16 y 17) y un poder fermentativo muy reducido (tabla 4).

En cuanto al vigor fermentativo de estas levaduras, destaca el caso de WA8, WA9 y WA10 con un arranque de fermentación a las 24-48 horas, el resto no inician la fermentación hasta las 72 horas.

El género *Wickerhamomyces* presenta grandes diferencias tanto en su cinética fermentativa, como en la actividad enzimática (tabla 2). La WA3, WA4 y WA5 con una liberación de CO₂ intermedia, presentan una mayor actividad de las enzimas más relacionadas con la clarificación y filtración de los vinos, como son la β-glucanasa y proteasa, además de la actividad β-glucosidasa de gran interés para la obtención de vinos con un perfil terpénico marcado. Mientras que la WA12, con una cinética similar, destaca por presentar una actividad β-liasas elevada. Las levaduras WA8 y WA9 con un arranque de fermentación rápido, presentan actividad proteasa y β-glucosidasa. Por otro lado, levadura W10, que resulta especialmente interesante debido a su actividad enzimática β-glucosidasa, proteasa y β-liasas, junto con un rápido arranque de fermentación.

En las curvas de cinética de *P. kudriavzevii* (fig. 18 y 19) observamos un inicio de fermentación algo más retardado en todas las cepas e igualmente no detectamos una estabilización de la producción de CO₂ una vez pasados 22 días de fermentación a excepción de la PK13. Además, todas las levaduras de este género presentan un arranque lento, unido a un grado final que va de los 4 hasta los 8%vol. (tabla 4).

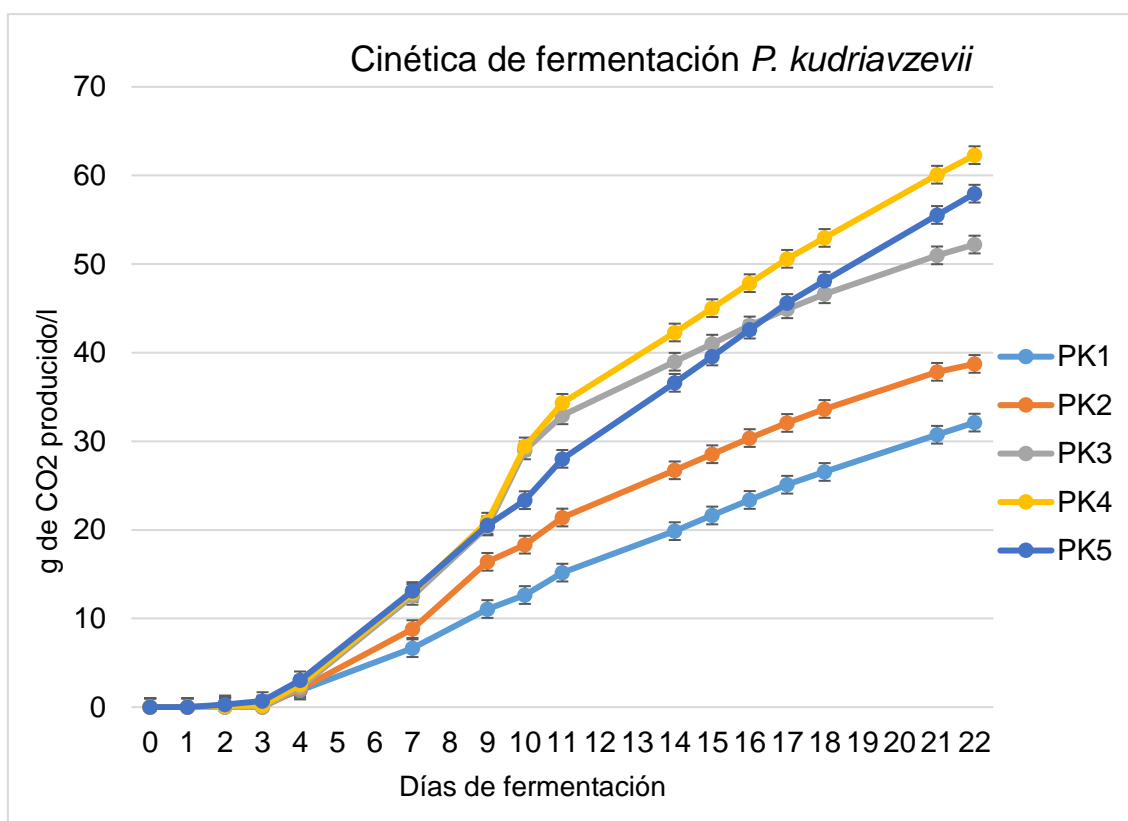


Figura 18: Cinética fermentativa a 21°C frente al tiempo de fermentación. Levaduras de la especie *P. kudriavzevii*

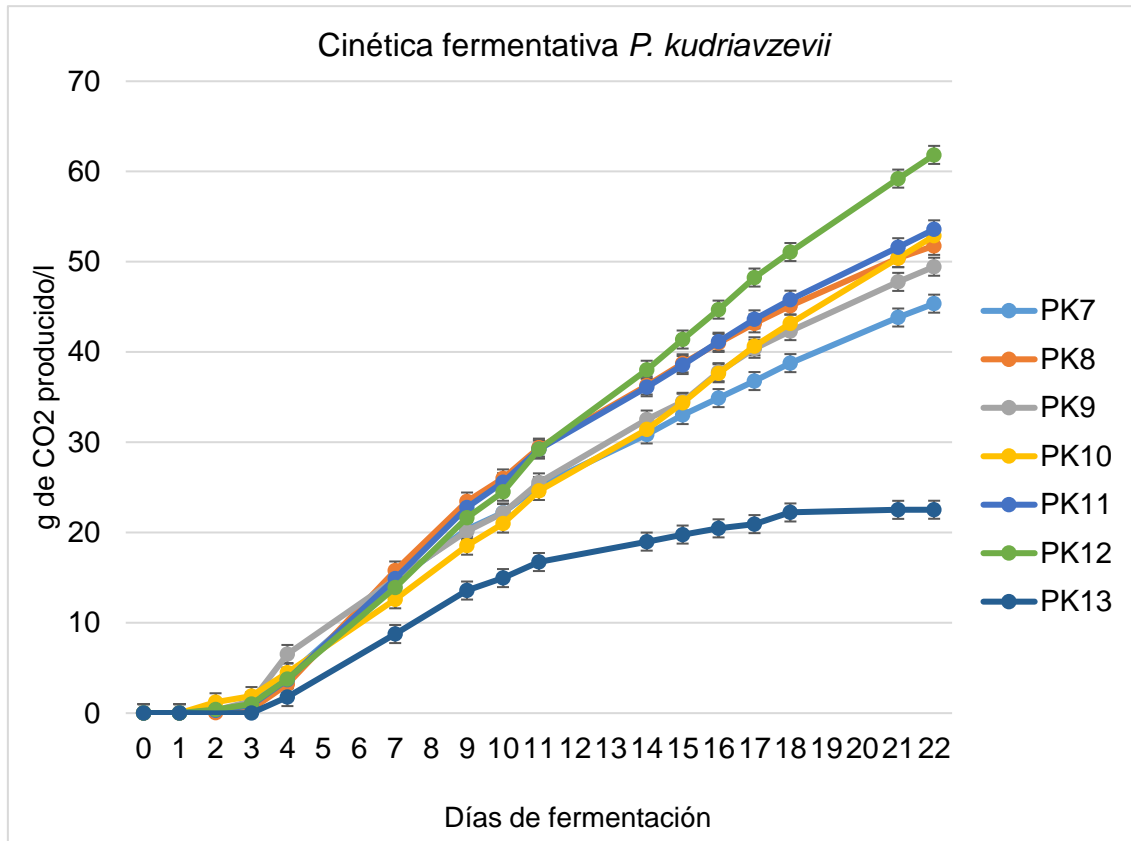


Figura 19: Cinética fermentativa a 21°C frente al tiempo de fermentación. Levaduras de la especie *P. kudriavzevii*

Podemos decir que las levaduras *P. kudriavzevii* no son interesantes por su lenta implantación en el mosto, su bajo poder fermentativo y su escasa producción de enzimas de interés, únicamente presentando actividad β -liasa de forma algo más moderada en el caso de PK4, PK5, PK7 y PK9 (tabla 2).

Por otro lado, en la figura 20 se observa una mayor producción de CO₂ que en el caso de las levaduras anteriores estudiadas, así como la estabilización de la curva mucho anterior que en otras levaduras. Además, las levaduras del género *Hanseniaspora* presentan un rápido vigor fermentativo ya que a las 24 horas ya presentaban inicio de fermentación y la levadura *H. osmophila* a las 48 horas ya estaba en su fase exponencial de crecimiento.

Las levaduras de las especies *H. osmophila* y *H. mereyi* tienen un poder fermentativo algo más elevado, especialmente HO1, alcanzando un grado de 11,6 % vol. siendo las levaduras del estudio que más azúcar han consumido.

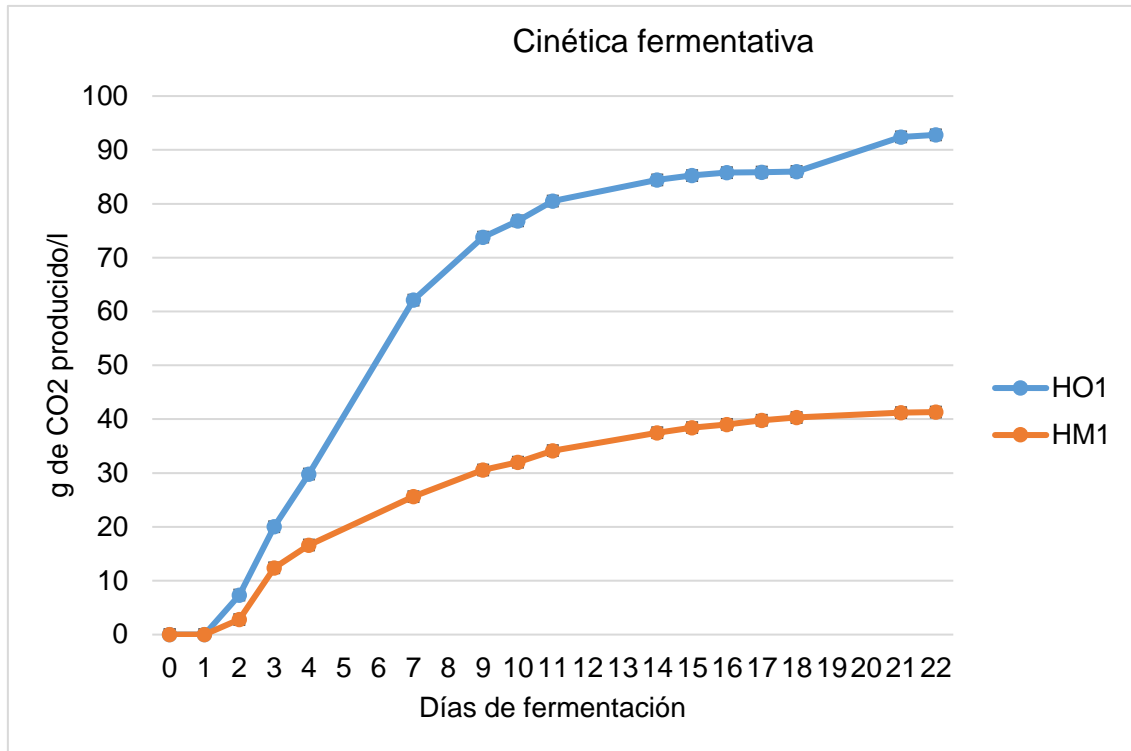


Figura 20: Cinética fermentativa a 21°C frente al tiempo de fermentación. Levaduras del género *Hanseniaspora*

Las levaduras del género *Hanseniaspora* presentan unas características correctas y deseables, con un rápido arranque en la fermentación, un poder fermentativo más significativo que el de otras levaduras del estudio, todo ello unido a una actividad enzimática relevante. La HO1 con producción de las enzimas proteasa y β -lialasa de forma elevada, así como la HM también con actividad β -glucanasa, indicativo de la posible utilidad de esta levadura para vinos con mayor problemática a la hora de realizar los procesos de clarificación proteica.

En la figura 21 se observa la cinética de las levaduras *T. delbrueckii*. Como ocurría con las del género *Hanseniaspora* la producción de CO₂ es bastante elevada y bastante similar en todas las cepas. El inicio de fermentación ocurre de forma veloz, presentando producción de CO₂ a las escasas 24 horas, presentando de este modo una rápida cinética fermentativa.

Las levaduras de la especie *T. delbrueckii*, TD1, TD2 y TD3 tienen poder fermentativo elevado si lo comparamos con el obtenido en el resto de levaduras del estudio, siendo de 8,9, 10,5 y 11,2% vol. respectivamente (tabla 4), pero sin consumir los azúcares en su totalidad como nos confirman los resultados descritos en el 5.4. en cuanto a los azúcares residuales en el vino.

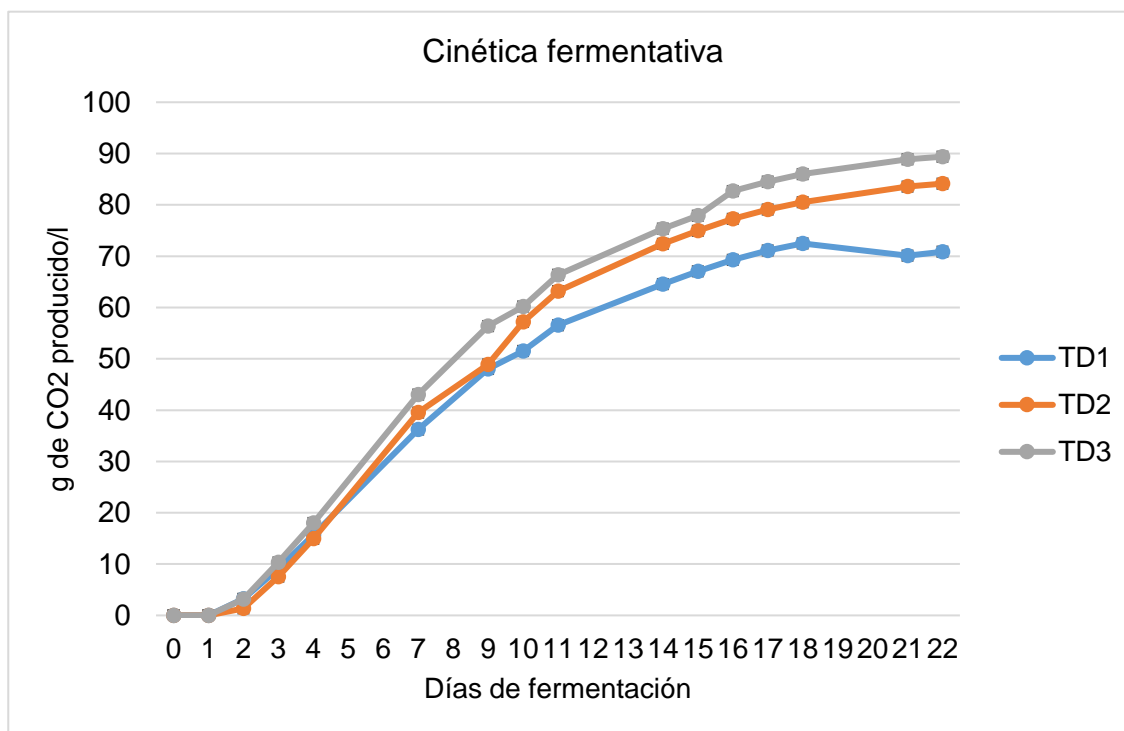


Figura 22: Cinética fermentativa a 21°C frente al tiempo de fermentación. Levaduras de la especie *T. delbrueckii*

El género de levaduras *Torulaspota* presenta unas características fermentativas muy adecuadas para una posible inoculación, junto con una destacable actividad β -lasiase (tabla 2) que puede resultar especialmente atractiva cuando se busca la elaboración de vinos con un perfil tiológico y varietal marcado.

Según se observa en la figura 23 no percibimos la estabilización de la curva de cinética fermentativa de las levaduras *P. guilliermondii*, y además la producción de CO₂ es mucho menor que en el caso de otras levaduras del estudio, con casi 40 g/l menos que *T. delbrueckii*. Por otro lado, el arranque de la fermentación se encuentra bastante más retardado que el del resto de levaduras estudiadas, empleando casi 5 días. Por tanto, esto se traduce en una lenta cinética fermentativa de las levaduras de la especie.

A pesar de que las levaduras de la especie *P. guilliermondii* presentan actividad β -glucosidasa y proteasa (tabla 2), su implantación en el mosto es lenta (fig. 23) y su poder fermentativo muy bajo, de entorno a 2% vol. (tabla 4). Es por todo ello que estas levaduras resultan poco interesantes para una posible inoculación secuencial.

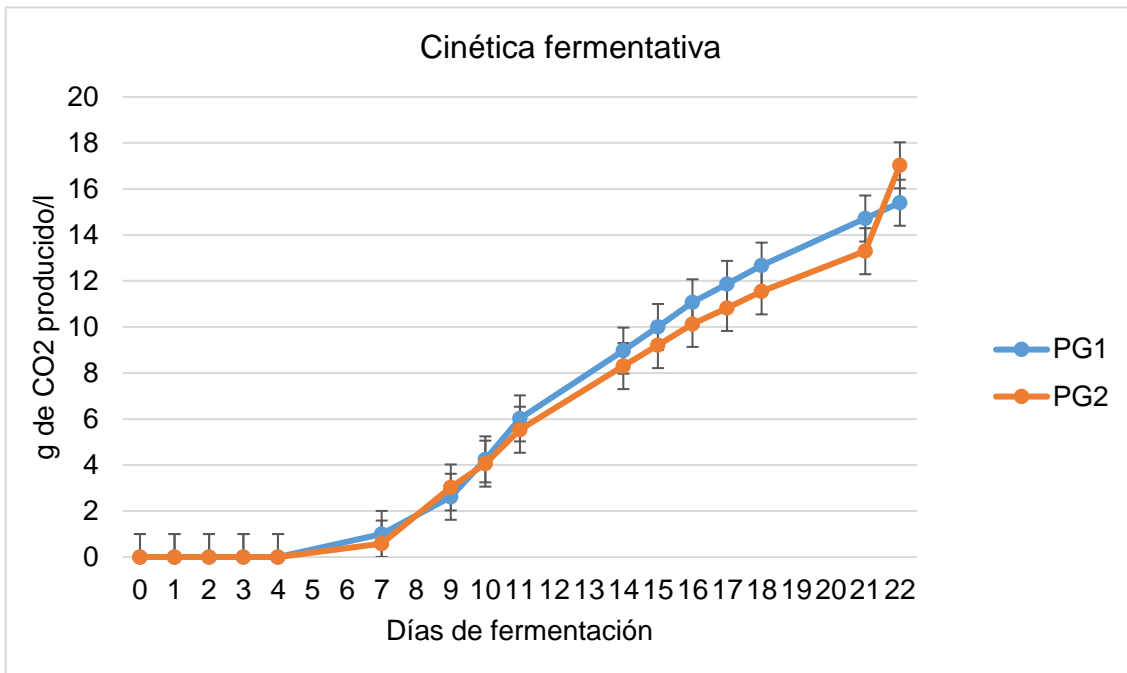


Figura 23: Cinética fermentativa a 21°C frente al tiempo de fermentación. Levaduras de la especie *P. guilliermondii*

Los resultados de la determinación de los azúcares residuales tras la fermentación se realizaron mediante el método Rebelein descrito en el apartado 4.4.3., para comprobar si la fermentación alcohólica ocurría de forma parcial o completa. El ensayo de azúcares residuales nos indicó que el mosto no se hallaba completamente seco en ninguno de los casos, todas las cepas dejaron un contenido en azúcares mayor de 28 g/l, indicativo de que las levaduras del estudio no son capaces de terminar la fermentación.

5.5. Ensayo *killer*

Los ensayos *killer* resultan necesarios por la implicación de este carácter en la compatibilidad entre levaduras cuando se realiza una inoculación secuencial. Se ha visto que las inoculaciones secuenciales tienen un gran potencial para modular y mejorar el perfil organoléptico de los vinos blancos (Englezos et al., 2018). Pero las levaduras no-*Saccharomyces* sensibles pueden ser desplazadas demasiado rápido por las levaduras *Saccharomyces* durante la fermentación (Ramírez et al., 2016). Del mismo modo, las levaduras no-*Saccharomyces* productoras de la toxina podrían interferir negativamente en la implantación de las *Saccharomyces* en caso de que la cepa no sea resistente a la toxina (Ciani & Comitini, 2019).

Los resultados de la prueba *killer* descrita en 4.4.4. expuestos en la tabla 3 mostraron que las levaduras PK1 y PK4 de la especie *P. kudriavzevii* presentan fenotipo sensible, y por tanto su inoculación supondría un riesgo para la fermentación porque la toxina liberada por otras levaduras podría producir su muerte celular. Sin embargo, las cepas de esa misma especie, PK9, PK10 y PK11 así como la levadura WA16 de *W. anomalus* presentan el carácter *killer* (R+K+), puesto que se distinguía un halo de inhibición claro alrededor de las levaduras (Izgü et al., 1997). Estudios previos ya indicaron el carácter *killer* de levaduras *W. anomalus* (Fernández de Ullivarri, Mendoza, & Raya, 2018; Ciani

& Comitini, 2019). En el caso de realizar una inoculación secuencial con levaduras *Saccharomyces* podrían ocurrir dos escenarios. Por un lado, si las *Saccharomyces* fueran resistentes a la toxina, el carácter *killer* resultaría beneficioso, pues aseguraría la implantación inicial de las no-*Saccharomyces* frente a otras levaduras presentes en el mosto. Pero, por otro lado, en el caso de que las *Saccharomyces* fueran sensibles a las toxinas, el efecto inhibitorio podría afectar a su implantación y, por tanto, surgirían los problemas de fermentación. Por ese motivo sería necesario estudiar el fenotipo del resto de levaduras y su interacción. También podría ser una característica interesante si las levaduras fueran capaces de acabar la fermentación, en ese caso la toxina *killer* permitiría un completo dominio del proceso a la levadura seleccionada (Velázquez, Zamora, Álvarez, & Ramírez, 2019).

El resto de levaduras del estudio, un 83%, presentan un carácter neutro (K- R+), este grupo de levaduras presentan un gran interés, puesto que no se verían afectadas por la toxina *killer*, pero tampoco afectarían al resto porque no son productoras de la misma. Sin embargo, la competencia de otras levaduras no-*Saccharomyces* presentes en el mosto podría afectar a su viabilidad.

6. CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio revelaron el potencial enológico de algunas levaduras no-*Saccharomyces* para producir enzimas de gran interés para la vinificación de vinos blancos. Este estudio mostró una gran diferencia entre las características de las levaduras investigadas, llegando a las siguientes conclusiones:

- Las levaduras del género *Pichia* resultaron ser las de menor relevancia presentando producción de únicamente una de las cuatro enzimas estudiadas, la actividad β -liasa, pero de forma muy moderada, asimismo exhibieron una lenta y poco adecuada cinética fermentativa.
- Las levaduras de la especie *T. delbrueckii*, TD1, TD2 y TD3, aunque no presentaron todas las actividades enzimáticas, podrían tener alto interés por su gran actividad β -liasa, relacionada con la liberación de tioles, unida a un correcto vigor fermentativo con un rápido arranque de fermentación y un fenotipo *killer* neutro.
- En el caso de las levaduras de la especie *W. anomalus* destacan la WA3, WA4 y WA5 por presentar producción de tres de las cuatro enzimas estudiadas, β -glucanasa, β -glucosidasa y proteasa. Por otro lado, la W8, W9 y WA10 mostraron actividad proteasa y β -glucosidasa junto con un vigor de fermentación muy veloz. Todas ellas con carácter neutro en el ensayo *killer*.
- Las levaduras del género *Hanseniaspora* presentaron resultados de gran interés puesto que *H. osmophila* tiene actividad proteasa y β -liasa, además de una correcta cinética fermentativa y un rápido arranque de fermentación. Además de lo mencionado, *H. meyeri* mostró actividad β -glucanasa y fenotipo *killer* neutro.
- Se ha comprobado que las levaduras del estudio contaban con un poder fermentativo demasiado bajo y no fueron capaces, por sí solas, de agotar por completo los azúcares en las fermentaciones. Por lo que sería necesaria la realización de inoculaciones secuenciales con levaduras *Saccharomyces* compatibles.

Es necesario continuar realizando estudios para mejorar el conocimiento de estas levaduras no-*Saccharomyces*, especialmente para determinar el papel de *T. delbrueckii*, *H. osmophila* y *H. meyeri* en el proceso de fermentación y su interacción y/o compatibilidad con otras levaduras.

7. BIBLIOGRAFÍA

- 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(JAN), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00012>
- Belda, I., Ruiz, J., Beisert, B., Navascués, E., Marquina, D., Calderón, F., Santos, A. (2017). Influence of *Torulasporea delbrueckii* in varietal thiol (3-SH and 4-MSP) release in wine sequential fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 257(April), 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.028>
- Belda, I., Ruiz, J., Navascués, E., Marquina, D., & Santos, A. (2016). Improvement of aromatic thiol release through the selection of yeasts with increased β -lyase activity. *International Journal of Food Microbiology*, 225, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.03.001>
- Benito, S. (2018). The impact of *Torulasporea delbrueckii* yeast in winemaking. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(7), 3081–3094. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8849-0>
- Chen, D., Yap, Z. Y., & Liu, S. Q. (2015). Evaluation of the performance of *Torulasporea delbrueckii*, *Williopsis saturnus*, and *Kluyveromyces lactis* in lychee wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 206, 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.020>
- Ciani, M., & Comitini, F. (2019). Use of Non-*Saccharomyces* Yeasts in Red Winemaking. *Red Wine Technology*, (1998), 51–68. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814399-5.00004-9>
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., & Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: A new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Research*, 10(2), 123–133. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00579.x>
- Cordero Otero, R. R., Ubeda Iranzo, J. F., Briones-Perez, A. I., Potgieter, N., Villena, M. A., Pretorius, I. S., & Van Rensburg, P. (2003). Characterization of the β -Glucosidase Activity Produced by Enological Strains of Non-*Saccharomyces* Yeasts. *Journal of Food Science*, 68(8), 2564–2569. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb07062.x>
- da Silva, R. R., da Conceição, P. J. P., de Menezes, C. L. A., de Oliveira Nascimento, C. E., Machado Bertelli, M., Pessoa Júnior, A. Gomes, E. (2019). Biochemical characteristics and potential application of a novel ethanol and glucose-tolerant β -glucosidase secreted by *Pichia guilliermondii* G1.2. *Journal of Biotechnology*, 294(February), 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.02.001>
- Englezos, V., Rantsiou, K., Cravero, F., Torchio, F., Pollon, M., Fracassetti, D., Cocolin, L. (2018). Volatile profile of white wines fermented with sequential inoculation of *Starmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chemistry*, 257(September 2017), 350–360. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.018>
- Escribano-Viana, R., González-Arenzana, L., Portu, J., Garijo, P., López-Alfaro, I., López, R., Gutiérrez, A. R. (2018). Wine aroma evolution throughout alcoholic fermentation sequentially inoculated with non- *Saccharomyces/Saccharomyces* yeasts. *Food Research International*, 112 (June), 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.018>
- Escribano, R., González-Arenzana, L., Garijo, P., Berlanas, C., López-Alfaro, I., López, R., Santamaría, P. (2017). Screening of enzymatic activities within different enological non-*Saccharomyces* yeasts. *Journal of Food Science and Technology*, 54(6), 1555–1564. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2587-7>
- Fernández de Ullivarri, M., Mendoza, L. M., & Raya, R. R. (2018). Characterization of the killer toxin KTCf20 from *Wickerhamomyces anomalus*, a potential biocontrol agent against wine spoilage yeasts. *Biological Control*, 121(December 2017), 223–

228. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.03.008>
- Francesca, N., Gaglio, R., Alfonzo, A., Settanni, L., Mazzei, P., Romano, R., & Piccolo, A. (2016). The Wine : typicality or mere diversity? The effect of spontaneous fermentations and biotic factors on the characteristics of wine, 8, 769–773. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2016.02.064>
- García Barceló, J. (1990). Técnicas Analíticas para Vinos. (Analytical Techniques for Wines.). *Técnicas Analíticas Para Vinos. (Analytical Techniques for Wines.)*.
- Gutiérrez, A. R., Epifanio, S., Garijo, P., López, R., & Santamaría, P. (2001). Killer yeasts: Incidence in the ecology of spontaneous fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(4), 352–356.
- Izgü, F., Altınbay, D., & Yüceliş, A. (1997). Identification and killer activity of a yeast contaminating starter cultures of *Saccharomyces cerevisiae* strains used in the Turkish baking industry. *Food Microbiology*, 14(2), 125–131. <https://doi.org/10.1006/fmic.1996.0082>
- Lodder J, Kreger-Van Rij N. The Yeasts; A Toxonomic Study, by J. Lodder and N.J.W. Kreger-Van Rij. Amsterdam, North-Holland Pub. Co.; 1952.
- Liu, P. T., Lu, L., Duan, C. Q., & Yan, G. L. (2016). The contribution of indigenous non-*Saccharomyces* wine yeast to improved aromatic quality of Cabernet Sauvignon wines by spontaneous fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, 71, 356–363. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.031>
- McFarland L, Surawicz C, Rubin M, Fekety R, Elmer G, Greenberg R. Recurrent Clostridium Difficile Disease: Epidemiology and Clinical Characteristics. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 1999;20(01):43-50.
- Mónaco, S. M., Rodríguez, M. E., & Lopes, C. A. (2016). International Journal of Food Microbiology *Pichia kudriavzevii* as a representative yeast of North Patagonian winemaking terroir. *International Journal of Food Microbiology*, 230, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.017>
- Nikolaou, E., Soufleros, E. H., Bouloumpasi, E., & Tzanetakis, N. (2006). Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains according to their oenological characteristics and vinification results. *Food Microbiology*, 23(2), 205–211. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.03.004>
- OIV. (2011). Resolución OIV-OENO 408-2011 Herramientas de biología molecular para identificar la levadura de vinificación, 1–7.
- Orden APA/2059/2002, de 31 de julio, por la que se ratifica el Reglamento de la Denominación de Origen "Rueda" y de su Consejo Regulador.
- Padilla, B., Gil, J. V., & Manzanares, P. (2016). Past and future of non-*Saccharomyces* yeasts: From spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAR), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00411>
- Porter, T. J., Divol, B., & Setati, M. E. (2019). Investigating the biochemical and fermentation attributes of *Lachancea* species and strains: Deciphering the potential contribution to wine chemical composition. *International Journal of Food Microbiology*, 290(November 2018), 273–287. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.025>
- Ramírez, M., Velázquez, R., Maqueda, M., Zamora, E., López-Piñeiro, A., & Hernández, L. M. (2016). Influence of the dominance of must fermentation by *Torulaspota delbrueckii* on the malolactic fermentation and organoleptic quality of red table wine. *International Journal of Food Microbiology*, 238, 311–319. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.029>
- Samoticha, J., Wojdyło, A., Chmielewska, J., Politowicz, J., & Szumny, A. (2017). The effects of enzymatic pre-treatment and type of yeast on chemical properties of white wine. *Lwt*, 79, 445–453. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.063>
- Schwentke, J., Sabel, A., Petri, A., König, H., & Claus, H. (2014). The yeast *Wickerhamomyces anomalus* AS1 secretes a multifunctional exo- β -1, 3-glucanase with implications for winemaking. <https://doi.org/10.1002/yea>

- Segura-garcía, L. E., Taillandier, P., Brandam, C., & Gschaedler, A. (2015). LWT - Food Science and Technology Fermentative capacity of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* in agave juice and semi-synthetic medium. *LWT - Food Science and Technology*, 60(1), 284–291. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.08.005>
- Spagna, G., Barbagallo, R. N., Palmeri, R., Restuccia, C., & Giudici, P. (2002). Properties of endogenous β -glucosidase of a *Pichia anomala* strain isolated from Sicilian musts and wines. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(7), 1036–1041. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00239-9](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00239-9)
- Strauss, M. L. A., Jolly, N. P., Lambrechts, M. G., & Van Rensburg, P. (2001). Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 91(1), 182–190. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01379.x>
- Tolosa, J. J. M., & Prieto, S. M. (2018). Non-*Saccharomyces* Yeasts: An Enzymatic Unexplored World to be Exploited. *Enzymes in Food Biotechnology*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813280-7.00025-6>
- Tristezza, M., Vetrano, C., Blevé, G., Grieco, F., Tufariello, M., Quarta, A., Spano, G. (2012). Autochthonous fermentation starters for the industrial production of Negroamaro wines. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39(1), 81–92. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1002-z>
- Valera, M. J., Morcillo-parra, M. Á., Zagórska, I., Mas, A., & Beltrán, G. (2019). International Journal of Food Microbiology Effects of melatonin and tryptophol addition on fermentations carried out by *Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeast species under different nitrogen conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 289(April 2018), 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.013>
- Velázquez, R., Zamora, E., Álvarez, M. L., & Ramírez, M. (2019). Using *Torulaspota delbrueckii* killer yeasts in the elaboration of base wine and traditional sparkling wine. *International Journal of Food Microbiology*, 289(April 2018), 134–144. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.010>

ANEXOS

ANEXO 1. Observación y tabla de resultados test *killer*Tabla 3: Resultados del ensayo *killer*

Levadura	Test <i>killer</i>	Test sensible	Fenotipo
WA 1	K-	R+	Neutra
WA 2	K-	R+	Neutra
WA 3	K-	R+	Neutra
WA 4	K-	R+	Neutra
WA 5	K-	R+	Neutra
WA 6	K-	R+	Neutra
WA 7	K-	R+	Neutra
WA 8	K-	R+	Neutra
WA 9	K-	R+	Neutra
WA 10	K-	R+	Neutra
WA 11	K-	R+	Neutra
WA 12	K-	R+	Neutra
WA 13	K-	R+	Neutra
WA 14	K-	R+	Neutra
WA 15	K-	R+	Neutra
WA 16	K+	R+	<i>Killer</i>
PK 1	K-	R-	Sensible
PK 2	K-	R+	Neutra
PK 3	K-	R+	Neutra
PK 4	K-	R-	Sensible
PK 5	K-	R+	Neutra
PK 6	K-	R+	Neutra
PK 7	K-	R-	Neutra
PK 8	K-	R+	Neutra
PK 9	K+	R+	<i>Killer</i>
PK 10	K+	R+	<i>Killer</i>
PK 11	K+	R+	<i>Killer</i>
PK 12	K-	R+	Neutra
PK 13	K-	R+	Neutra
HO1	K-	R+	Neutra
HM 1	K-	R+	Neutra
PG1	K-	R+	Neutra
PG2	K-	R+	Neutra
TD1	K-	R+	Neutra
TD2	K-	R+	Neutra
TD3	K-	R+	Neutra

ANEXO 2. Observación al microscopio

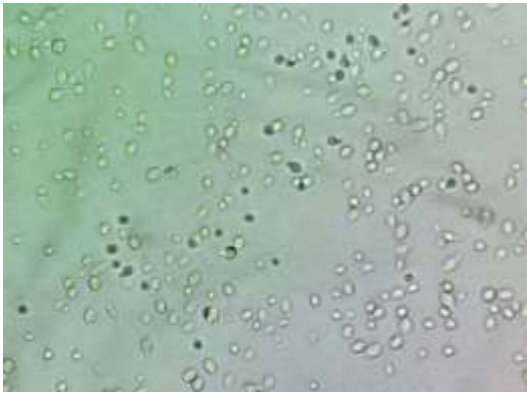


Figura 23: Morfología apiculada de *H. meyeri* Objetivo 40X



Figura 24: Morfología apiculada de *H. osmophila* Objetivo 40X

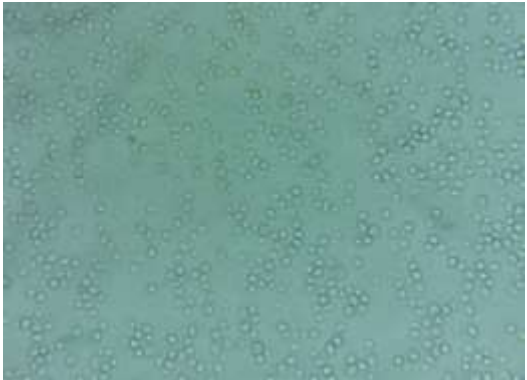


Figura 25: Morfología esférica de *W. anomalus* Objetivo 40X



Figura 26: Morfología esférica de *T. delbrueckii* Objetivo 40X

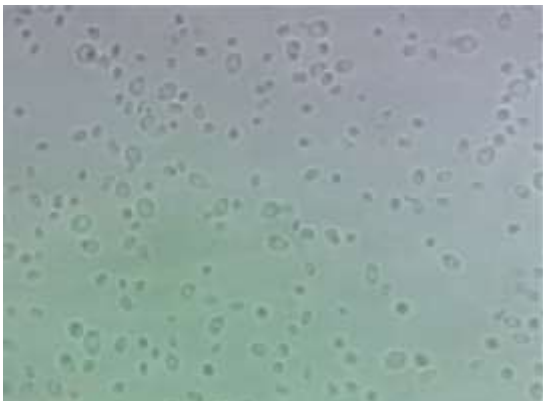


Figura 27: Morfología ovoidal de *P. guilliermondii* Objetivo 100X



Figura 28: Morfología en forma de bastón de *P. kudriavzevi* Objetivo 40X

ANEXO 3. Tabla de poder fermentativo

Tabla 4: Poder fermentativo

Levadura	Grado (%vol.)
WA 1	2,5 ± 0,2
WA 2	2,5 ± 0,3
WA 3	3,6 ± 2,2
WA 4	2,7 ± 0,8
WA 5	1,9 ± 0,2
WA 6	2,3 ± 0,1
WA 7	2,2 ± 0,5
WA 8	3,3 ± 0,5
WA 9	1,9 ± 0,2
WA 10	2,5 ± 1,0
WA 11	2,3 ± 0,7
WA 12	2,8 ± 0,7
WA 13	2,8 ± 1,0
WA 14	2,3 ± 0,1
WA 15	1,4 ± 0,3
WA 16	1,6 ± 0,2
PK 1	4,0 ± 1,3
PK 2	4,8 ± 1,3
PK 3	2,8 ± 1,8
PK 4	7,8 ± 0,4
PK 5	7,2 ± 0,5
PK 6	7,2 ± 0,7
PK 7	5,7 ± 0,9
PK 8	6,5 ± 1,0
PK 9	6,2 ± 0,1
PK 10	7,6 ± 2,4
PK 11	6,7 ± 0,5
PK 12	7,7 ± 0,3
PK 13	8,2 ± 1,5
HO1	11,6 ± 2,5
HM 2	5,2 ± 1,5
PG1	1,9 ± 0,2
PG2	2,1 ± 0,9
TD1	8,9 ± 1,9
TD2	10,5 ± 1,1
TD3	11,2 ± 1,3