



Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERÍAS AGRARIAS

GRADO EN ENOLOGÍA

Comportamiento enológico de cepas de
Saccharomyces cerevisiae procedentes
de una parcela de D.O. Rueda.

Alumno: Paloma Franch Usó

Tutora: Violeta Ruipérez Prádanos

Cotutora: Josefina Vila Crespo

Directora: Lorena López Enríquez

Julio de 2018

Agradecimientos

Después de todos estos meses, hoy es el día: escribo este apartado de agradecimientos para finalizar mi trabajo de fin de grado. Ha sido un período largo e intenso de trabajo, por ello, me gustaría agradecer a todas aquellas personas que me han ayudado y apoyado durante esta etapa.

Primero de todo, me gustaría agradecer a mi tutora Violeta Ruipérez Prádanos y cotutora Josefina Vila Crespo por haber confiado en mí en todo momento para la realización de este trabajo y, además, por su inestimable ayuda y enseñanzas, sin las cuales hubiera sido muy difícil la realización de este trabajo. Frente a todas las dificultades que se han presentado, siempre han estado dispuestas a dedicarme su tiempo y su conocimiento. Se lo agradezco de corazón. A mi directora de trabajo de final de grado Lorena López Enríquez por prestarme toda la ayuda e información necesaria para completar mi trabajo. Me gustaría también agradecer a Miguel Angel García Esteban por toda la ayuda que me ha proporcionado.

Agradecer enormemente a mi hermano y mis padres por sus sabios consejos y su comprensión, tanto en los momentos buenos como los malos. Y al resto de mi familia: mis tíos y mis primos, siempre habéis estado ahí para mí. Finalmente, a mi amiga y compañera de trabajo de fin de grado Irene Álvarez Muñoz por ofrecerme todo el apoyo y estar ahí en cada momento.

¡Muchas gracias a todos!

Paloma Franch Usó

Índice

RESUMEN.....	4
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 Ecología de las levaduras.....	5
1.2. Antecedentes.....	5
1.3. Criterios enológicos de selección de levaduras vínicas.....	6
1.3.1. Poder fermentativo, vigor y cinética fermentativa.....	7
1.3.2 Acidez volátil.....	8
1.3.3 Resistencia al SO ₂	8
1.3.4 Fenotipo <i>killer</i>	8
1.3.5 Comportamiento levaduras en medio líquido.....	9
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL TRABAJO.....	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
3.1 Materiales.....	10
3.1.1 Levaduras.....	10
3.1.2 Mosto.....	11
3.1.3 Medios de cultivo.....	11
3.1.3.1 Medio YEPD.....	11
3.1.3.2 Medio test <i>killer</i> y sensible.....	11
3.2 Métodos.....	11
3.2.1 Poder fermentativo, vigor y cinética fermentativa.....	11
3.2.2. Azúcares reductores.....	12
3.2.3 Determinación de la producción de ácido sulfhídrico (SH ₂).....	12
3.2.4 Determinación del pH.....	13
3.2.5 Acidez volátil.....	13
3.2.6 Ensayo <i>killer</i> y sensible.....	13
3.2.6.1 Procedimiento del ensayo <i>killer</i>	13
3.2.6.1 Procedimiento del ensayo sensible.....	13
3.2.7 Crecimiento en medio líquido.....	14
3.2.8 Expresión de resultados.....	14
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14

4.1 Cinética fermentativa	14
4.1.1. Cinética fermentativa a 20°C.....	15
4.1.2. Cinética fermentativa a 17°C.....	18
4.1.3. Cinética fermentativa a 14°C.....	21
4.2. Poder fermentativo.....	21
4.3 Producción de SH ₂	23
4.4 pH.....	24
4.5 Acidez volátil.....	25
4.6 Crecimiento en medio líquido.....	26
4.7 Carácter <i>killer</i>	27
5. CONCLUSIONES.....	28
6. BIBLIOGRAFIA.....	29
ANEXOS.....	33
ANEXO 1. Tablas cinéticas fermentativas.....	33
ANEXO 2. Gráfica cinética fermentativa a 14°C.....	36
ANEXO 3. Tablas vigor fermentativo.	36
ANEXO 4. Gráfica vigor fermentativo a 14°C.	38

RESUMEN

La elaboración del vino es un proceso complejo llevado a cabo por una población diversa de microorganismos que tienen un papel esencial en la calidad y autenticidad del mismo. Actualmente, algunas bodegas han optado por llevar a cabo fermentación espontánea para aportar a su vino características organolépticas únicas. El estudio de la sucesión natural de levaduras en el proceso de vinificación es fundamental para determinar las especies y/o cepas de levaduras que participan en este proceso.

En estudios previos, se hizo una selección de levaduras predominantes durante el proceso de vinificación en una parcela localizada en la D.O. Rueda (Valladolid) de uva variedad Verdejo durante la vendimia 2010. Los aislados obtenidos en el análisis de 5 etapas diferentes del proceso de vinificación se caracterizaron mediante métodos moleculares confirmando la presencia de varias cepas de *Saccharomyces cerevisiae* genéticamente diferentes.

El objetivo principal de este trabajo es caracterizar enológicamente estas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* mediante una serie de criterios tecnológicos que permitan conocer el comportamiento de las mismas sobre mosto de uva Verdejo. La caracterización de las levaduras ofrecerá a la bodega la opción de disponer de levaduras que permitan, en una vendimia complicada, mantener la calidad y la singularidad de su vino.

ABSTRACT

The elaboration of wine is a complex process carried out by a diverse population of microorganisms that play an essential role in its quality and authenticity. Currently, some wineries have chosen to carry out spontaneous fermentation to provide their wine with unique organoleptic characteristics. The study of the natural succession of yeasts during winemaking process is fundamental to determine the species and / or strains of yeast that participate in this process.

In previous studies, a selection of predominant yeasts during winemaking process was made in a parcel located in D.O. Rueda (Valladolid) of Verdejo grape variety from 2010 harvest. The isolates obtained in the analysis of 5 different stages of winemaking process were characterized by molecular methods confirming the presence of several strains of genetically different *Saccharomyces cerevisiae*.

The main aim of this work is to characterize oenologically these strains of *Saccharomyces cerevisiae* by means of a set of technological criteria that allow to know their behaviour on grape juice. The characterization of the yeasts will offer the winery the option of having available yeasts that allow, in a complicated vintage, to maintain quality and uniqueness of its wine.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Ecología de las levaduras.

La transformación del mosto en vino es un proceso muy complejo llevado a cabo por levaduras, que son los microorganismos responsables del proceso de fermentación alcohólica. Las levaduras tienen un gran impacto en la calidad del vino, contribuyendo a la estructura básica de los aromas y flavonoles del vino. Por otro lado, algunas levaduras pueden causar el deterioro del vino y la pérdida de valor del producto cuando se desarrollan tras la fermentación alcohólica (Doyle, et al., 2001). Las levaduras están ampliamente distribuidas en la naturaleza y su diseminación se lleva a cabo por medio del viento y de los insectos. Por lo tanto, la población de levaduras presentes en la uva es variable y va a influir en el proceso de vinificación, por ello, es importante tener un conocimiento fiable sobre su ecología (Fleet, et al., 2002).

El origen de *Saccharomyces* es una cuestión controvertida, ya que existen dos teorías. La primera teoría define que las uvas dañadas (por hongos, exceso de agua, pájaros, insectos...) sirven de "depósito" para microorganismos, entre ellos la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y, por lo tanto, estas uvas son la principal fuente de levaduras en las fermentaciones espontáneas (Mortimer & Polsinelli, 1999). La segunda teoría nos dice que su principal procedencia es el ambiente de la bodega, aunque no descarta una presencia minoritaria en las uvas (Martini, 1993).

Saccharomyces cerevisiae está ausente o rara vez está presente en las uvas, pero la podemos encontrar en el entorno de la bodega y es la levadura más relevante en la fermentación alcohólica (Longo, et al., 1991). Las levaduras no-*Saccharomyces* crecen bien durante las primeras etapas de fermentación, cuando la concentración de etanol todavía es baja, siendo luego reemplazadas por *Saccharomyces*, que son más tolerantes al etanol.

Sin embargo, las levaduras no-*Saccharomyces* definitivamente contribuyen a la fermentación y pueden llegar a poblaciones de hasta 10^6 - 10^7 células/ml (Heard & Fleet, 1986)). Estas altas poblaciones se cree que influyen en la composición del vino así como el desarrollo de *Saccharomyces*, porque los cambios químicos en el vino producido por las no-*Saccharomyces* afectan tanto la cinética del crecimiento y metabolismo de *Saccharomyces* (Lema, et al., 1996). Los primeros estudios examinaron cómo las poblaciones nativas de cepas de *Saccharomyces* evolucionan durante la fermentación espontánea del vino (Querol, et al., 1992). Se han observado muchas cepas diferentes, pero pocas fueron predominantes en las últimas etapas del proceso.

El interés de la selección de levaduras es obtener una levadura que tenga los máximos índices característicos de la zona, un máximo rendimiento en etanol por unidad de azúcar metabolizado y buena cinética fermentativa.

1.2. Antecedentes.

Las levaduras fueron aisladas durante la vendimia 2010 (Toquero Gonzalez, 2011). Para su caracterización molecular se determinó su perfil mitocondrial mediante la técnica de Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) de ADN mitocondrial (López

Enriquez, 2014/2015). Esta técnica parece ser el método más adecuado para establecer diferencias entre cepas de *S. cerevisiae* (López, et al., 2001). Su análisis mediante RFLP permite la caracterización de diferentes cepas, basándose en el alto grado de polimorfismo que presenta y en la estabilidad de la misma durante la multiplicación vegetativa (Ribéreau-Gayon, et al., 2003).

Esta técnica requiere la obtención previa del ADN total de la levadura, el cual incluye el ADN nuclear y el mitocondrial, a partir de un cultivo puro del aislado (Querol, et al., 1992). Posteriormente, el ADN total es sometido a una digestión enzimática y el producto de la digestión es separado mediante electroforesis en gel de agarosa. La digestión del ADN mitocondrial da lugar a fragmentos de longitud variable, en un número no muy abundante, cuya separación mediante electroforesis en geles de agarosa determina patrones de bandas que definen el perfil específico de una cepa (Querol, et al., 1992).

Las levaduras caracterizadas enológico en este trabajo presentan patrones de ADN mitocondrial diferentes (fig. 1), lo que confirma que son levaduras genéticamente diferentes y, por lo tanto, su comportamiento enológico puede mostrar diferencias significativas.

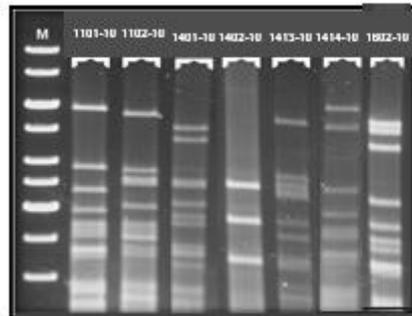


Fig. 1: Patrón ADN mitocondrial levaduras seleccionadas.

Adicionalmente, se confirmó mediante secuenciación de estas levaduras que todas ellas son cepas pertenecientes a la especie *S. cerevisiae*.

1.3. Criterios enológicos de selección de levaduras vínicas.

Los criterios enológicos para la selección y/o caracterización enológica de levaduras vínicas van a variar en función de su aplicación tecnológica, sin embargo, todas ellas deben poseer unas características básicas o fundamentales. Un poder fermentativo elevado tendente a dejar los vinos con azúcares residuales mínimos, o totalmente secos, una acidez volátil baja y una correcta cinética fermentativa marcan inicialmente los tres criterios comunes de selección de cepas de levaduras para la elaboración de cualquier vino, salvo que se trate de algún tipo de vinificación especial. En la figura 2, aparecen descritos según la importancia atribuida a cada uno de ellos, seguidos de otros

criterios también básicos, como la resistencia al SO₂ y la ausencia de defectos olfativos (Suarez & Leal, 2004).

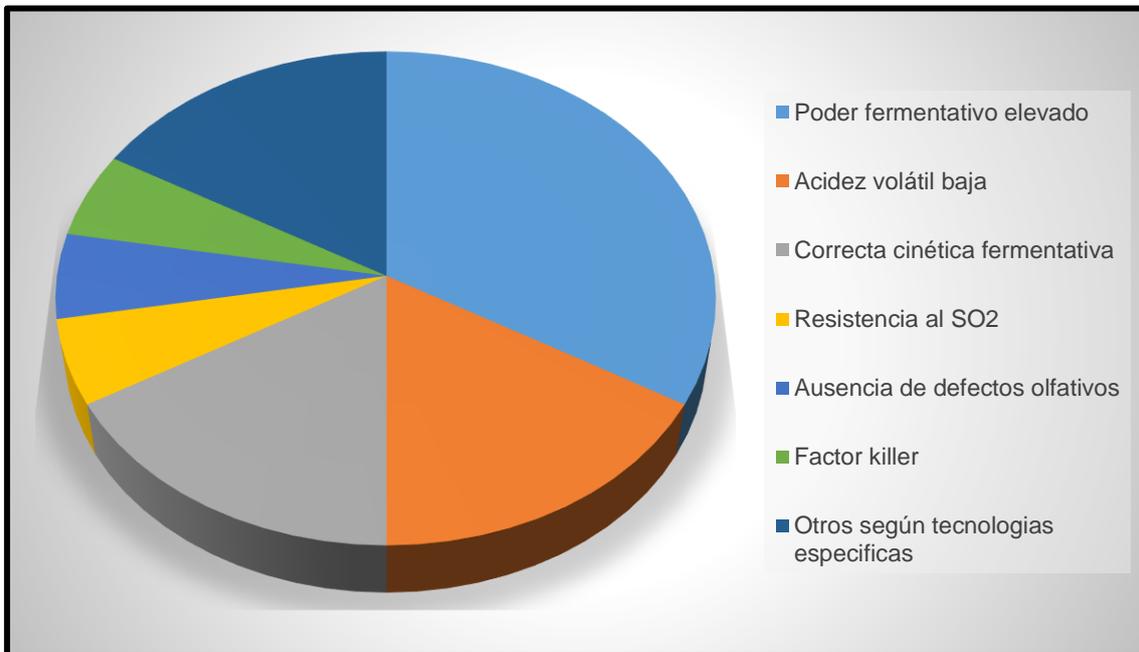


Fig. 2: Criterios de la selección clonal de la levadura vínica (Suarez & Leal, 2004)

1.3.1. Poder fermentativo, vigor y cinética fermentativa.

El poder fermentativo consiste en determinar la cantidad máxima de azúcar que la levadura es capaz de fermentar. Se expresa como la medida del porcentaje en volumen (%Vol.) de etanol que una cepa de levadura es capaz de producir (Suarez-Lepe, 1997).

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. La cinética se podría definir como la velocidad de metabolización de los azúcares respecto al tiempo. Es frecuente en enología valorarla como variación de la densidad o como pérdida de CO₂ respecto al tiempo. Permite el seguimiento de la fermentación y detección de comportamientos anormales, mediante una curva (gramos de CO₂ producidos o gramos de azúcar fermentado/tiempo) con el fin de seleccionar las cepas que muestran un rápido inicio de la fermentación, sin observación de picos debidos a las variaciones de temperatura (Boned, et al., 1992).

Una buena cinética se traduce en un menor consumo de energía debido al control de la temperatura. La temperatura es uno de los factores que varían entre los procesos de vinificación, influyendo en la producción de acidez volátil, producción de metabolitos y en la viabilidad de la levadura (Suarez-Lepe, 1997).

Varios son los criterios a tener en cuenta para determinar la correcta cinética fermentativa de una levadura:

- Rápido arranque de la fermentación: garantizando la estabilidad de la materia prima y disminuyendo la posibilidad de que ocurra un ataque bacteriano u oxidaciones.
- Regularidad fermentativa y curva termodinámica de cada cepa de levadura: si se observa una cinética progresiva se garantiza la ausencia de explosiones calóricas. Esto evitará elevaciones excesivas de temperatura que puedan provocar baja calidad del vino e incluso paradas fermentativas.
- Ausencia de problemas de acabado: garantiza que la cepa pueda terminar correctamente la fermentación sin que en el vino permanezcan azúcares residuales.
- Duración total del proceso.

1.3.2 Acidez volátil.

La acidez volátil se expresa como g/l de ácido acético. Este es un producto derivado de la fermentación alcohólica producido por las levaduras. Este es mayor o menor dependiendo de la especie o cepa de levadura que interviene en la fermentación. Del mismo modo hay otros factores que también influyen en la producción de ácido acético los microorganismos anaerobios, carencias de vitaminas y aminoácidos, temperaturas de fermentación elevadas durante el proceso de multiplicación celular y pH muy bajos inferiores a 3,1 o superiores a 4,0 (Hidalgo Togores, 2011).

Muchos de los ácidos volátiles se forman en las primeras fases de la fermentación, debido a la descarboxilación oxidativa o de manera simultánea a la biosíntesis de ácido fórmico. La especie *Saccharomyces cerevisiae* suele producir ácido acético y acetato de etilo por ello se rechazan aquellas especies que superen la cifra de 0,3-0,4 g/l CH₃COOH (Suarez Lepe, 1997) (AYG/1405/2008, 2008).

1.3.3 Resistencia al SO₂

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* destaca por su resistencia al SO₂ (De Rosa, 1998), sin embargo, esta resistencia es muy variable entre levaduras fermentativas. El SO₂ causa la inhibición y muerte de la célula microbiana modificando su membrana celular y bloqueando ciertos sistemas enzimáticos esenciales en el metabolismo energético, además de causar daños en el interior de la célula a nivel mitocondrial (Suarez & Leal, 2004). La tolerancia de carácter genético o inducible en las levaduras que se transmite de generación en generación y se dice que puede estar basada en la producción de acetaldehído (Beech & Thomas, 1985).

1.3.4 Fenotipo *killer*.

Las levaduras *killer* pueden crecer en detrimento de otras levaduras en determinadas condiciones de vinificación. Estas cepas pueden producir la toxina K2 y son resistentes a la misma (fenotipo K+R+). Se ha sugerido que utilizar cepas *killer* puede potenciar la implantación de la levadura en la vinificación (Suarez Lepe, 1997). Sin embargo, la toxina *killer* se tampona en condiciones de vinificación comparada con la toxicidad *in*

vitro. Los test *killer* y sensible se utilizan para determinar la capacidad de la cepa de estudio de producir la toxina K2 y/o su sensibilidad hacia esta (Rosini, 1983).

En toda población de cultivo puro de una determinada especie de levadura existen a estos efectos cuatro tipos de célula; las matadoras o productoras de la toxina, las sensibles (mueren bajo su acción), las neutras (que no la producen ni se afectan por la toxina) y por último las suicidas (que son sensibles a su propia toxina) (R.B, 1968). Por lo tanto, podemos distinguir cuatro fenotipos diferentes:

- K+R+: KILLER (K).
- K-R+: NEUTRA (N).
- K-R-: SENSIBLE (S).
- K+R-: SUICIDA (s).

1.3.5 Comportamiento levaduras en medio líquido.

Aunque el comportamiento de las levaduras en medio líquido no sea un criterio básico, es interesante ya que da una idea del crecimiento y reproducción de las levaduras durante la fermentación (Hidalgo Togados, 2011). El comportamiento de las levaduras en mosto blanco, se estudia a través del desarrollo disperso que facilite una fermentación regular y de una baja o discreta formación de espuma (De Rosa, 1998).

El tipo de desarrollo celular de *S. cerevisiae* en el mosto desfogado tiene una importancia tecnológica decisiva. Puede aparecer turbidez uniforme de tipo pulverulento, ésta se debe a que después de la gemación de las células hijas se separan de la madre y lentamente se van depositando en el fondo (Suarez & Leal, 2004). Con respecto a la formación de espuma, esta propiedad está ligada a la hidrofobicidad celular y a la tendencia a la diseminación, siendo un carácter estable y hereditario (Suarez Lepe, 1997). En cualquier caso, se trata de un carácter negativo que no permite usar los depósitos de fermentación en su capacidad útil y puede ser una fuente de contaminaciones (Suarez & Leal, 2004).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL TRABAJO.

El objetivo principal de este estudio es caracterizar el comportamiento enológico de cepas genéticamente diferentes de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas a lo largo del proceso de vinificación de Verdejo en una parcela de la D.O. Rueda y obtener la levadura que mejor se adapte a nuestras necesidades.

Para ello se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar la cinética fermentativa de las distintas cepas de levaduras.
2. Evaluar el efecto de la temperatura en el comportamiento enológico de las levaduras.
3. Evaluar las características enológicas de las levaduras que influyen en el proceso de fermentación y los parámetros físico-químicos que se obtienen tras la misma.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 Materiales.

3.1.1 Levaduras

Las levaduras utilizadas en este estudio pertenecen todas a la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Se seleccionaron representantes de diferentes perfiles genéticos obtenidos mediante la caracterización molecular (tabla 1). Como control, se utilizó una levadura comercial, Uvaferm WAM™ (Lallemand), aislada previamente en la E.T.S. de Ingenierías Agrarias de Palencia, Universidad de Valladolid. Las características fermentativas de esta levadura seleccionada son muy buenas, ya que provoca un arranque de la fermentación rápido y posee una cinética fermentativa rápida y regular. Su poder alcoholígeno es superior a 12,5 %vol., no muestra producción de SH₂, tiene una baja producción de acidez volátil y fenotipo *killer* (Lamellard, 2015).

Cepas de <i>S. cerevisiae</i>	Etapas fermentativas donde está presente
1101-10	MURE; MDB
1102-10	MURE
1401-10	MDB; IFB; FTB; FFB
1402-10	IFB
1413-10	IFB
1414-10	IFB; FTB; FFB
1602-10	FFB

Tabla 1: Levaduras seleccionadas y las etapas fermentativas donde están presentes. 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.

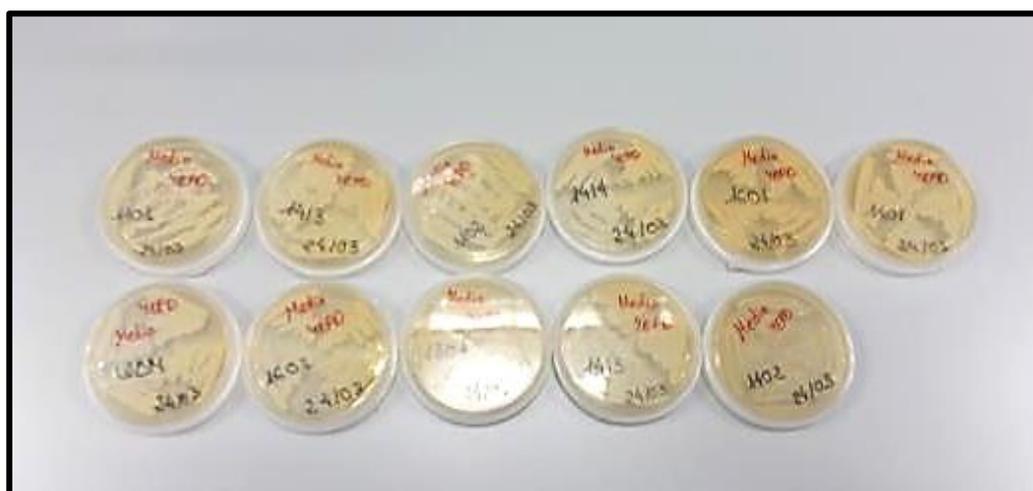


Fig. 3: Levaduras seleccionadas.

En el ensayo *killer* se utilizaron dos levaduras comerciales obtenidas de la colección de cultivos tipo de la Universidad de Valencia: *S. cerevisiae* (CECT 1443) como cepa sensible y *S. cerevisiae* (CECT 1414) que posee fenotipo *killer*.

3.1.2 Mosto.

El mosto utilizado pertenece a la variedad Verdejo, procedente de la D.O. Rueda. Se obtuvo tras el desfangado durante la vendimia 2016. A la llegada al laboratorio se esterilizó a vapor fluyente durante 25 minutos y se mantuvo congelado a -20°C hasta su uso.

Se determinó el contenido de azúcar mediante un refractómetro (ATAGO, Hand refractometer ATC-1) obteniendo $23,2^{\circ}\text{Brix}$ que corresponden con una concentración de 225 g/l de azúcar y un grado probable de $13,4\%$.

3.1.3 Medios de cultivo.

3.1.3.1 Medio YEPD.



El crecimiento y mantenimiento de las levaduras se realizó en medio YEPD (extracto de levadura-peptona-dextrosa). Para la elaboración del medio de cultivo se utilizaron 20 g/l de glucosa (Labkem), 20 g/l de peptona (Panreac) y 10 g/l de extracto de levadura (Labkem). Cuando se requirió el empleo del medio en estado sólido, se adicionaron 20 g/l de agar (BD Bacto™ Agar). Antes de su uso, se esterilizó a 121°C durante 15 minutos (OIV, 2018).

Fig. 4: Medio YEPD.

3.1.3.2 Medio test *killer* y sensible.



Para realizar el test *killer* y sensible se elaboró un medio de cultivo compuesto por 1 g/l de extracto de levadura (Labkem), 2 g/l de bactopectona (Panreac), 2 g/l dextrosa (Labkem), $3,5\text{ g/l}$ agar (BD Bacto™ Agar) 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 ($38,4\text{ g/l}$ de ácido cítrico, $56,8\text{ g/l}$ de fosfato sódico dibásico y pH $4,2-4,7$). Antes de su uso se esterilizó durante 20-25 minutos a una atmósfera de presión a vapor fluyente (OIV, 2018).

Fig. 5: Medio test *killer* y sensible.

3.2 Métodos.

3.2.1 Poder fermentativo, vigor y cinética fermentativa.

El poder, la cinética y el vigor fermentativo se realizó según el protocolo descrito por la OIV (OIV-OENO-370-012, 2012). El ensayo se llevó a cabo en un matraz Erlenmeyer de 100 ml con un volumen de mosto de 50 ml . El mosto se esterilizó en el autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Previamente, las levaduras de estudio se cultivaron en medio YEPD. Se realizó un cultivo en medio líquido y se incubó durante 24h a 22°C para su inoculación en el mosto.

Se retiró el tapón de algodón de los matraces en condiciones estériles, se añadió 1 ml de la levadura de estudio y se cerró con una válvula de Müller con ácido sulfúrico concentrado en su interior. Inmediatamente después se pesaron los matraces. Por último, se realizó la incubación a diferentes temperaturas hasta peso constante (fin de fermentación) controlando la microvinificación mediante análisis gravimétrico. Se realizó a diferentes temperaturas (20°C, 17°C y 14°C), y se obtuvo el vigor fermentativo, el poder fermentativo y la cinética fermentativa.

El poder fermentativo expresado en %Vol. de etanol producido por cada cepa estudiada, se obtendrá de la diferencia entre el peso inicial y final según la siguiente ecuación:

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

Para interpretar la cinética fermentativa de cada una de las levaduras se realizaron curvas donde el eje X corresponde a la duración de la fermentación y el eje Y el poder fermentativo (%vol.) que se obtiene.

3.2.2. Azúcares reductores.

Tras finalizar la fermentación, se determinó el contenido en azúcares residuales. Se considera que un vino es seco si sus azúcares residuales son inferiores y/o iguales a 4 g/l (AYG/1405/2008, 2008).

Esta determinación se realizó por el método Rebelein (Del Álamo Sanza, 2002). Brevemente, en un matraz Erlenmeyer de 250 ml se añadió 1 ml de solución de cobre, 5 ml de una solución alcalina y 2 ml de vino. Se hirvió 2 minutos añadiéndole piedras de vidrio y tras refrigerar, se añadió sucesivamente 10 ml de yoduro potásico, 10 ml de ácido sulfúrico al 16% y 2 ml de almidón. Posteriormente, se valoró con una solución de tiosulfato sódico hasta viraje a amarillo marfil. Se realizó un blanco sustituyendo el vino por 2 ml de agua destilada.

Los resultados se expresan como g/l de azúcar reductor:

g/l azúcares reductores = $V_2 - V_1$, donde:

V_2 es el volumen de tiosulfato utilizado en el vino y V_1 es el volumen de tiosulfato utilizado en el blanco.

3.2.3 Determinación de la producción de ácido sulfhídrico (SH₂).

Tras la finalización de la cinética y en el momento de retirar la válvula Müller de los matraces se realizó la determinación de la producción de SH₂. Este método se realizó según describe la OIV (OIV-OENO-310-12, 2012) mediante el uso de una tira impregnada en acetato de plomo (Whatman), dónde se produce la siguiente reacción:



Por este método se detectó cualitativamente la producción de SH_2 , con un límite de detección de tan sólo 5 ppm de SH_2 en la atmósfera o en una corriente de gas.

3.2.4 Determinación del pH.

Tras la finalización de la fermentación alcohólica se determinó el pH de cada una de las fermentaciones realizadas en el apartado 3.2.1 mediante el método descrito por la OIV (OIV-MA-F1-06, 2011).

La medida se realizó con un pH-metro (pH-Meter Basic 20+, Crison) a 20 ° C. Las medidas se realizaron por duplicado y se expresan como la media aritmética de ambas determinaciones.

3.2.5 Acidez volátil.

Tras las fermentaciones se utilizó el vino resultante para la determinación la acidez volátil por el método de García Tena. Se pusieron en un matraz de 60 ml de capacidad 11 ml de vino y se destilaron. El destilado se recogió en dos probetas distintas;

- En la primera se recogieron 5,1 ml del destilado, fracción que se desechó debido a que el método considera que en esta primera fracción han pasado los ácidos más volátiles que el ácido acético, como SO_2 y CO_2 .
- En la segunda probeta se recogieron 3,2 ml de destilado, estimándose que en dicho volumen han pasado 1/3 del ácido acético del vino.

Por último, se valoró con hidróxido sódico 0,01N usando fenoltaleína como indicador. Los resultados los expresaremos como g/l de ácido acético.

3.2.6 Ensayo *killer* y sensible.

Estos métodos se realizaron según describe (Izgu, et al., 1997).

3.2.6.1 Procedimiento del ensayo *killer*.

Se preparó una suspensión de la cepa sensible en agua estéril y se sembró en masa con el agar específico para este estudio. A continuación, se realizó una estría con la levadura a estudiar sobre el agar solidificado. Se incubó a 21°C durante una semana.

3.2.6.1 Procedimiento del ensayo sensible.

Se preparó una suspensión de todas las levaduras a analizar en este estudio en agua estéril y se sembraron en masa con el medio específico preparado previamente. Una vez el agar se solidificó se sembró en estría la levadura K^+ . Por último, se incubó en estufa a 21°C durante una semana.

3.2.7 Crecimiento en medio líquido.

El ensayo se realizó mediante cultivo de las levaduras de estudio en medio YEPD líquido. Las levaduras se inocularon por triplicado y se cultivaron en la estufa a 25°C durante 24h. Pasadas las 24 horas se determinó mediante espectrofotometría la densidad óptica a 620 nm con un espectrofotómetro (Spectronic® 20 Genesys™), justo después de un fuerte agitado y tras 10 minutos. Los valores del ratio se obtuvieron con la siguiente fórmula:

$$R = D1 * 100 / D0$$

Esta ecuación nos permite identificar las cepas de levadura no floculentas (R=100%) o ligeramente floculentas (R entre 70 y 100%).

3.2.8 Expresión de resultados.

Los ensayos se realizaron por triplicado y se expresan como la media aritmética de las tres medidas obtenidas. El error se indica como la desviación estándar de la muestra.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Los ensayos se realizaron a tres temperaturas de fermentación, con el objetivo de analizar la influencia de la temperatura en su comportamiento enológico y aptitud para su uso en fermentaciones donde se requieren temperaturas bajas durante el proceso.

La mayor parte de las especies del género *Saccharomyces*, se desarrollan entre 12 y 26°C (Bartra, 2000). A temperaturas bajas el único factor limitante es la temperatura, ya que el etanol que se va formando y el consumo paulatino de los nutrientes es menos influyente (Suarez & Leal, 2004).

Según el estudio de Navascués *et al.*, la influencia de la temperatura sobre el poder alcoholígeno de las levaduras muestra que existen diferencias significativas en el porcentaje de etanol cuando fermentan a 25°C y a 15°C. Por lo tanto, se tiende a la selección de las que operan a baja temperatura ya que a estas temperaturas se conservan mejor los aromas primarios (Navascués, 1998).

4.1 Cinética fermentativa

Al realizar el estudio de la cinética fermentativa de cada una de las levaduras, obtenemos adicionalmente dos parámetros a interpretar. El primero es el vigor fermentativo, este representa los 3 primeros días de la fermentación y da información de cómo actúa la levadura al inicio de ésta. El segundo es el poder fermentativo, este se obtiene al finalizar la cinética, mediante la fórmula descrita en el apartado 3.2.1. El objetivo de la selección de levaduras no es solo obtener una levadura que tenga una

buena cinética fermentativa, sino también adquirir un rápido comienzo de la fermentación y producir un grado alcohólico adecuado.

Como ya se ha explicado en el apartado 1.2.1 realizamos la cinética a 3 temperaturas diferentes, puesto que la temperatura es uno de los factores más influyentes en la fermentación. A temperaturas elevadas (>25°C), se produce un aumento de la fermentación glicopirúvica y provoca la formación de alcoholes superiores, mientras que a temperaturas bajas hay una mayor formación de ácidos grasos y ésteres, que dan caracteres aromáticos positivos. Sin embargo, si realizamos fermentaciones a condiciones muy bajas, puede provocar que algunas especies no-*Saccharomyces* aumenten su población e impidan el desarrollo de las levaduras *Saccharomyces*, por lo tanto, se recomienda que al realizar fermentaciones con variedades blancas la temperatura de fermentación no sea superior a 20°C.

4.1.1. Cinética fermentativa a 20°C.

A 20° observamos que todas las levaduras finalizan la fermentación a los 20 días. La cinética fermentativa de las levaduras estudiadas se muestra en la Fig. 6.

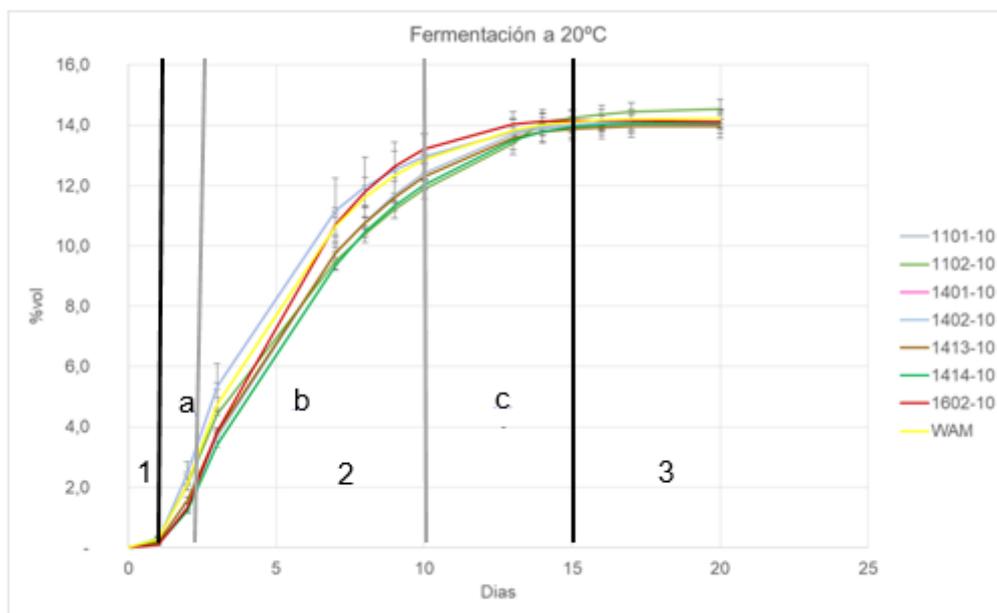


Fig. 6: Poder fermentativo a 20°C, 1) Fase latencia, 2) Segunda fase: a) Fase de aceleración, b) Fase de crecimiento exponencial y c) Fase de ralentización y 3) Fase estacionaria. Los ejes de las gráficas. Y: Alcohol (%Vol.) X: tiempo (días).

Se pueden observar las tres fases de cada una de las levaduras. En primer lugar, la fase de latencia, que se corresponde con el periodo de saturación del medio en CO₂. Su duración depende de la temperatura, generalmente no supera las 24 horas y es igual para todas las levaduras. La segunda fase se divide en tres fases, una fase de aceleración y a continuación de crecimiento exponencial donde se produce la mayor

liberación de CO₂ y por último la fase de ralentización. Por último, se puede observar la fase estacionaria (Hidalgo Togores, 2011).

El análisis detallado de la cinética fermentativa de cada una de las levaduras estudiadas se describe a continuación.

La levadura 1101-10 (Fig. 7) tiene un buen crecimiento en todas sus fases y llegó a terminar la fermentación dentro de los días nombrados en el protocolo.

La levadura 1102-10 (Fig. 8), llegó a terminar su fermentación en los días nombrados en el protocolo, pero se observa una fase exponencial muy larga. Esta fase coincide con la reproducción de levaduras y a la larga nos podría crear problemas, ya que si no añadimos suficiente sulfuroso al mosto fermentado las levaduras restantes podrían provocar una refermentación.

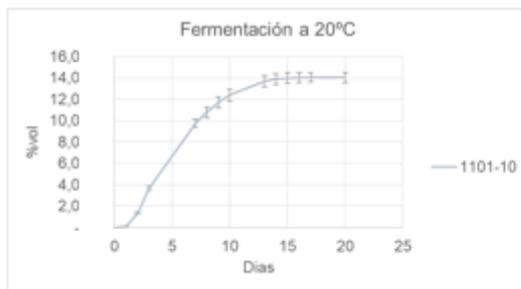


Fig. 7: Levadura 1101-10.

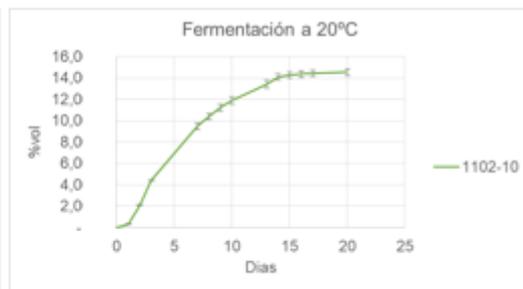


Fig. 8: Levadura 1102-10

La siguiente levadura 1401-10 (Fig. 9), presenta una buena curva cinética, donde se puede observar una desviación estándar elevada, con lo cual, la levadura en esta fase no sostendrá un comportamiento similar a la hora de utilizarla para diferentes vinificaciones.

La levadura 1402-10 (Fig. 10), aunque en la figura se da a entender que la fermentación de esta a finalizado, esto no es así, debido a que al realizar el ensayo de azúcares residuales por el método Rebelein nos indica que el mosto no se halla completamente seco (Tabla 3).

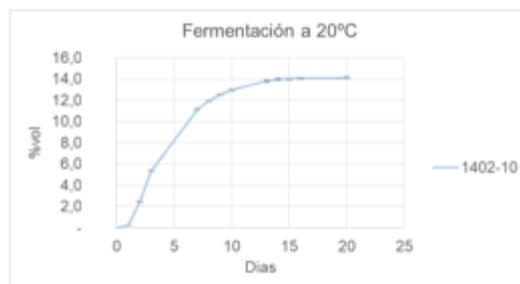
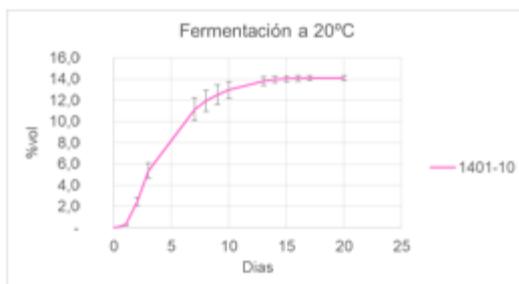


Fig. 9: Levadura 1401-10

Fig. 10: Levadura 1402-10.

Las levaduras 1413-10 y 1414-10 (Fig. 11 y 12) presentan una buena curva cinética y no se presentan oscilaciones.

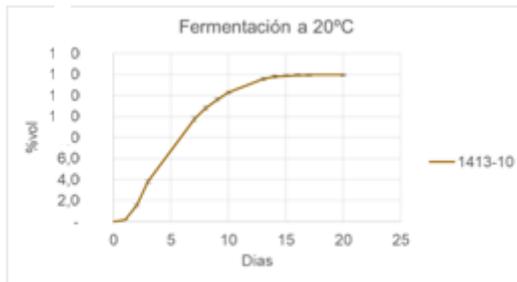


Fig. 11: Levadura 1413-10

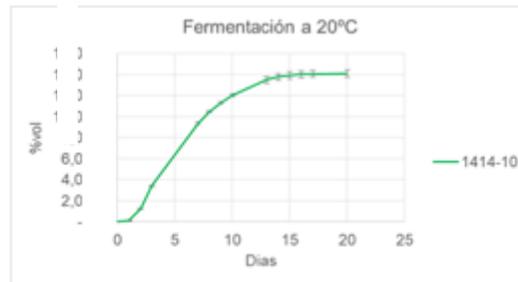


Fig. 12: Levadura 1414-10.

Por último, la levadura 1602-10 presenta una buena curva y no se observan desviaciones en la Fig. 11.

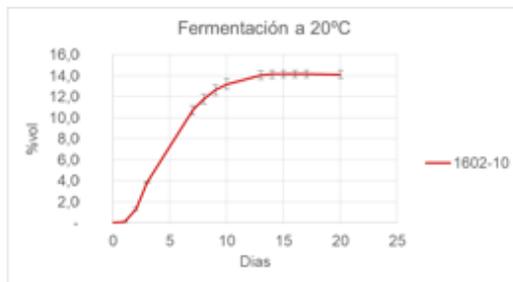


Fig.13: Levadura 1602-10.

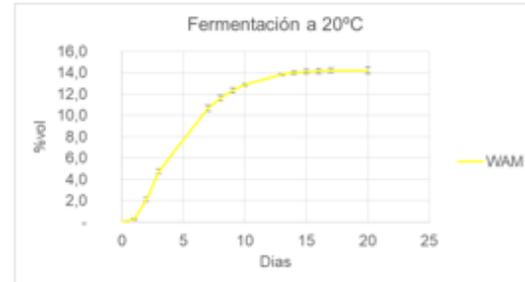


Fig. 14: Levadura WAM.

De los resultados obtenidos, se podría concluir que la levadura que presenta mejor cinética fermentativa es la 1413-10, ya que tiene un rápido inicio de fermentación, una buena fase de crecimiento exponencial y dicho proceso terminó la fermentación en el periodo de 20 días. Se puede observar en la Fig. 11 una desviación estándar muy pequeña, de lo cual permite afirmar, que el uso de ésta sigue una tendencia constante independiente del muestreo y, por tanto, refuta nuestra hipótesis del comportamiento adecuado de la levadura.

En la Fig.15 se pueden observar que todas las levaduras comenzaron la fermentación al día siguiente de inocularlas por lo tanto es un aspecto positivo para todas ellas. Tomando como referencia la WAM, la levadura 1102-10 posee un vigor fermentativo ligeramente superior, seguida de las levaduras 1401-10 y 1402-10.

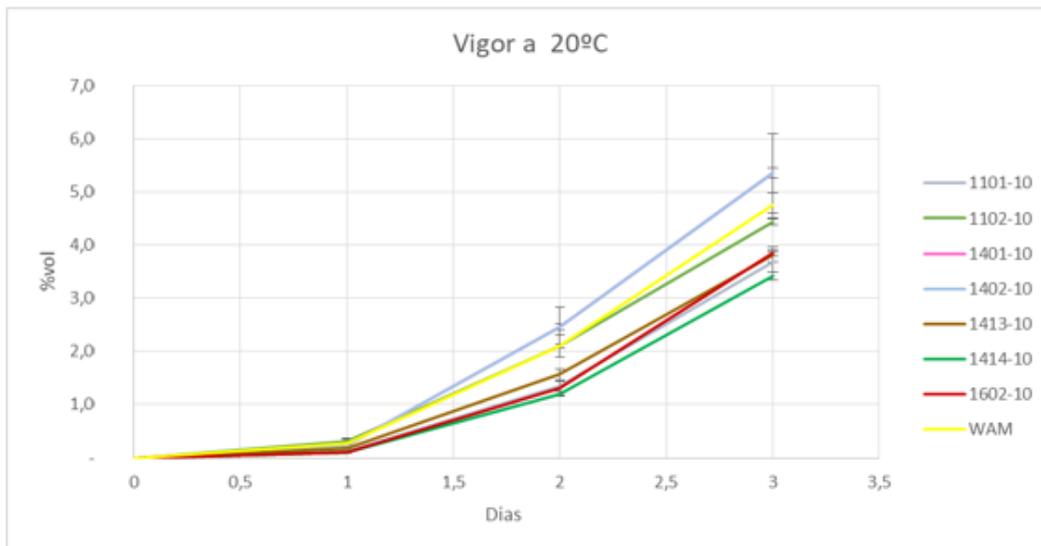


Fig. 15: Vigor fermentativo a 20°C.

Descartamos la levadura 1402-10 como posible candidata para su selección debido a que su cinética fermentativa no es la deseada. Se puede afirmar que esta levadura no ha terminado su fermentación ya que, presenta una concentración de azúcares residuales superior a 4 g/l (Tabla 3).

A continuación, se procede a comprobar si estas levaduras pueden utilizarse para fermentar a temperaturas más bajas.

4.1.2. Cinética fermentativa a 17°C.

En estas condiciones se pretende conservar los aromas primarios y se quiere observar cómo se desarrollan estas levaduras a temperaturas de fermentación más bajas.

Estas condiciones se descartaron debido a que la fermentación no finalizó en el tiempo previamente estipulado, sino que no es interesante enológicamente mantener el proceso fermentativo por riesgos de proliferación microbiana que puedan presentarse.

Los resultados obtenidos (Tabla 9 del Anexo 1 y la Fig. 16), nos muestran que a esta temperatura la fermentación se prolonga, dichas levaduras no presentan una buena cinética fermentativa; y algunas levaduras como la 1402-10 no pudieron acabar la fermentación ni llegar a producir un grado alcohólico aceptable. En la Fig 16 se puede observar como la fase 1 es muy lenta en comparación a la WAM, al igual que la fase 2 y la fase 3.

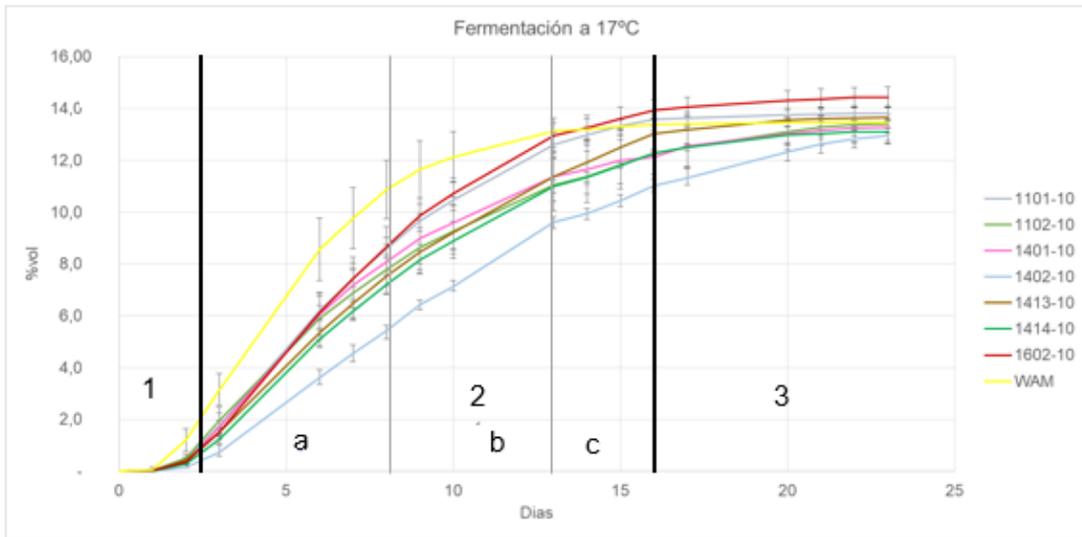


Fig. 16: Cinética fermentativa a 17°C, 1) Fase latencia, 2) Segunda fase: a) Fase de aceleración, b) Fase de crecimiento exponencial y c) Fase de ralentización y 3) Fase estacionaria.

Se observa que a 17°C, la fase 2 es mucho más larga que cuando se realiza la fermentación a 20°C, lo que indica que a mayor gradiente termico, menor capacidad de reproducción. Al contrario que a temperaturas a 20°C la fase de aceleracion es mucho más lenta y esto nos podría provocar una parada fermentativa.

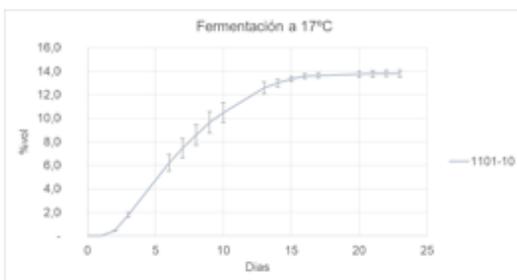


Fig. 17: Levadura 1101-10.

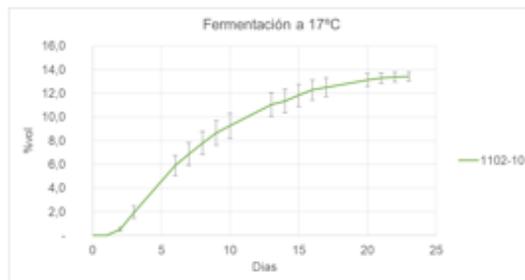


Fig. 18: Levadura 1102-10.

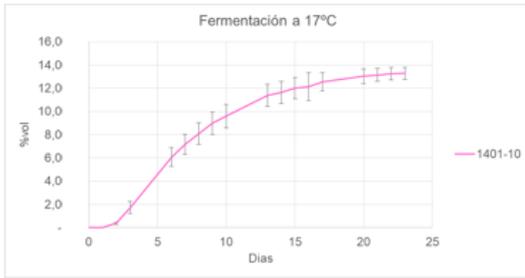


Fig. 19: Levadura 1401-10.

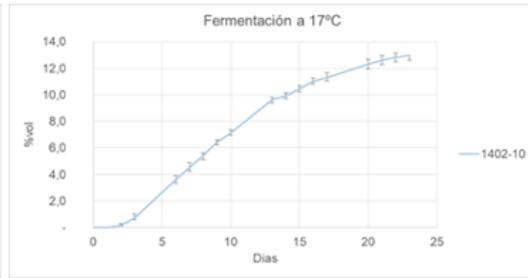


Fig. 20: Levadura 1402-10.

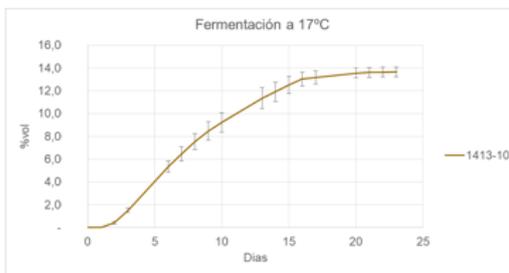


Fig. 21: Levadura 1413-10.

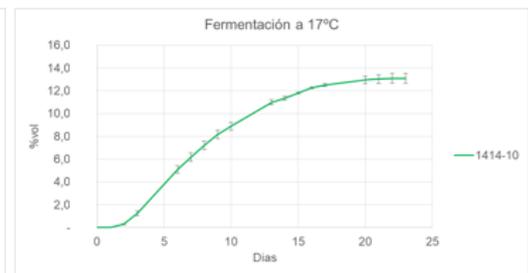


Fig. 22: Levadura 1414-10.

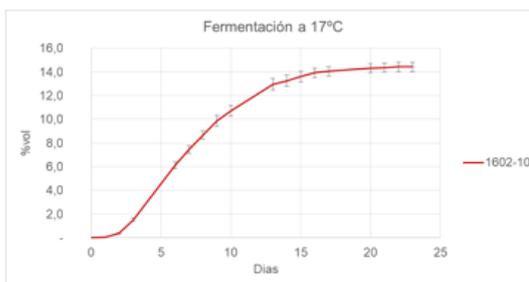


Fig. 23: Levadura 1602-10.

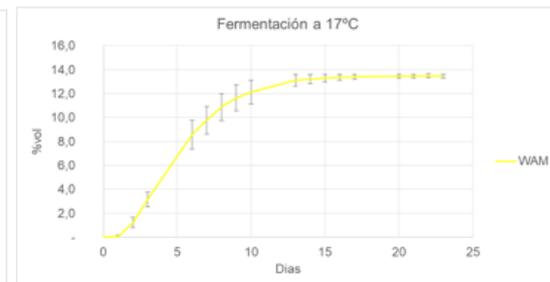


Fig. 24: Levadura WAM.

Por otro lado, en la fermentación a 17°C observamos que, solo la levadura WAM representa un comienzo de la fermentación (Fig. 25).

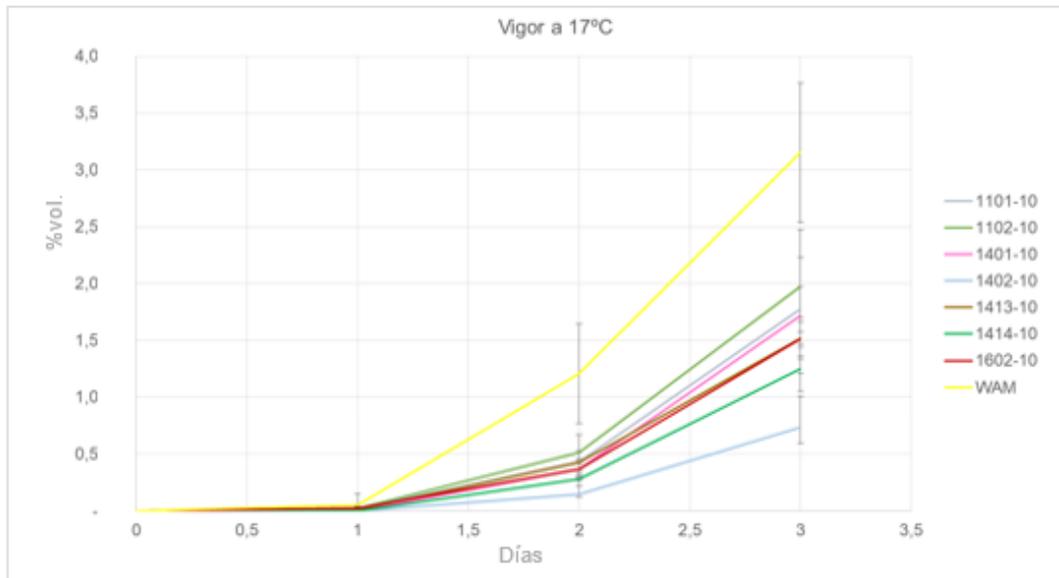


Fig. 25: Vigor fermentativo a 17°C.

Finalmente, se descarta la levadura 1402-10, ya que no pudo acabar la fermentación. La levadura que presenta mejores resultados a esta temperatura es la 1602-10, ya que presenta un leve inicio de la fermentación el día 1 y acabó un día antes que las demás levaduras. Sin embargo, también podríamos considerar buena la levadura 1413-10, ya que presenta un buen inicio y una buena finalización de la cinética fermentativa.

4.1.3. Cinética fermentativa a 14°C.

Los resultados obtenidos en la fermentación a 14°C indican que la fermentación no acabó y en la curva no se aprecia una curva cinética enológica interesante (Tabla 12 del Anexo 1 y la Fig. 30 del Anexo 2). El vigor fermentativo a 14°C indica que el inicio de la fermentación es muy lento para todas las levaduras y esto podría causar problemas a la hora de realizar una fermentación en bodega (Tabla 15, Anexo 3 y la Fig. 31, Anexo 4).

4.2. Poder fermentativo.

El poder fermentativo alcanzado por cada levadura se determinó al finalizar la fermentación según se describe en el apartado 3.2.1. Los resultados se recogen en la tabla que se observa a continuación:

Levadura	Poder fermentativo a 20°C (%vol.)	Poder fermentativo a 17°C (%vol.)	Poder fermentativo a 14°C (%vol.)
1101-10	14,05 ± 0,48	13,79 ± 0,28	12,72 ± 0,20
1102-10	14,54 ± 0,32	13,41 ± 0,37	12,66 ± 0,54
1401-10	14,12 ± 0,23	13,27 ± 0,51	12,56 ± 0,34
1402-10	13,33 ± 0,08	12,95 ± 0,34	10,92 ± 0,58
1314-10	13,96 ± 0,08	13,65 ± 0,42	12,57 ± 0,42
1414-10	14,09 ± 0,35	13,10 ± 0,45	12,77 ± 0,56
1602-10	14,12 ± 0,37	14,43 ± 0,40	13,53 ± 0,82
WAM	14,23 ± 0,31	13,45 ± 0,16	12,27 ± 0,28

Tabla 2: Poder fermentativo y desviación estándar a temperaturas de 20°C, 17°C y 14°C.

Como se recoge en (AYG/1405/2008, 2008) del reglamento de la Denominación de Origen Rueda los vinos no pueden tener menos 11 %Vol., por lo tanto, la levadura 1402-10 como observamos en la Tabla 2 no entraría dentro de los parámetros aceptables, ya que a temperaturas bajas no llegaría a obtener el grado aceptado por este organismo.

A 17°C y 14°C, las levaduras no lograron acabar la fermentación en el plazo de 20 días como se nombra en el método descrito en el apartado 3.2.1. A consecuencia, estas dos temperaturas quedarían descartadas para una fermentación en bodega, ya que lo que queremos es una fermentación rápida, que se obtenga el grado alcohólico deseado y dentro de los límites del reglamento, que conserve los aromas varietales y de óptimas características, físico-químicas y organolépticas.

Si analizamos en profundidad el poder fermentativo a 20°C, se puede observar que al realizar la media aritmética entre las tres medidas de cada levadura, las levaduras que menor desviación estándar poseen son las 1314-10 y 1402-10. Por tanto, al utilizar las levaduras reiteradamente, estas tendrán un comportamiento similar en cada una de sus actuaciones.

Los resultados de la determinación de los azúcares residuales tras la fermentación se realizaron mediante el método Rebelein descrito en el apartado 3.2.2, para comprobar que todas las levaduras tienen acabada su fermentación.

Levadura	Azúcares reductores (g/l azúcares reductores)
1101-10	1,9±0,26
1102-10	0,8±0,40
1401-10	0,6±0,06
1402-10	5,4±0,84
1413-10	1,4±0,67
1414-10	1,0±0,35
1602-10	1,4±0,75
WAM	1,4±0,21

Tabla 3: Media aritmética de las tres medidas obtenidas al medir los azúcares reductores a 20°C mediante el método Rebeleim.

Las levaduras 1401-10, 1413-10 presentan una correcta cinética fermentativa y un poder fermentativo dentro de los límites, además de acabar la fermentación dejando 0,6 y 1,4 g/l de azúcares residuales respectivamente. Quedaría descartada la levadura 1402-10, al no cumplir con el reglamento.

4.3 Producción de SH₂

El SH₂ es un compuesto que se obtiene al final de la cadena de reducción de sulfatos por las levaduras y también es un producto intermedio en la síntesis de aminoácidos azufrados. La producción de esta sustancia se aumenta con temperaturas altas de fermentación, valores altos de pH y niveles bajos de nitrógeno fácilmente asimilable en mostos (Hidalgo Togores, 2011).

Se observaron tras las fermentaciones a diferentes temperaturas que ninguna de las levaduras produce SH₂, esto es un aspecto positivo debido a que la producción de SH₂ genera aromas desagradables como el olor a huevo podrido.

Los resultados que se observan en las Fig. 26 y 27 muestran que en ningún caso se produce SH₂.

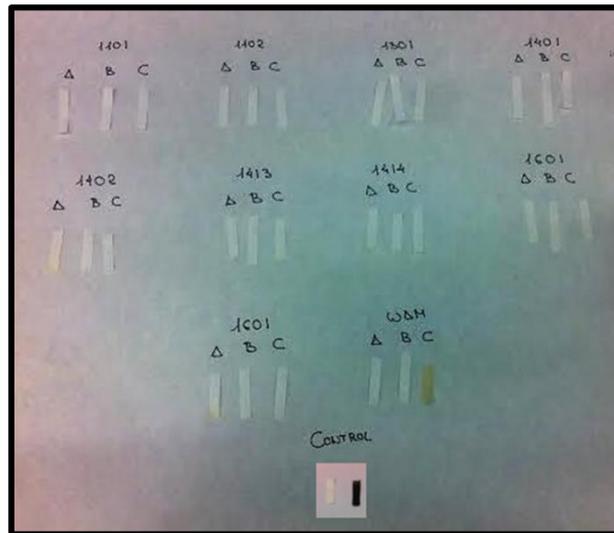


Fig. 26: Producción SH₂ a 20°C.

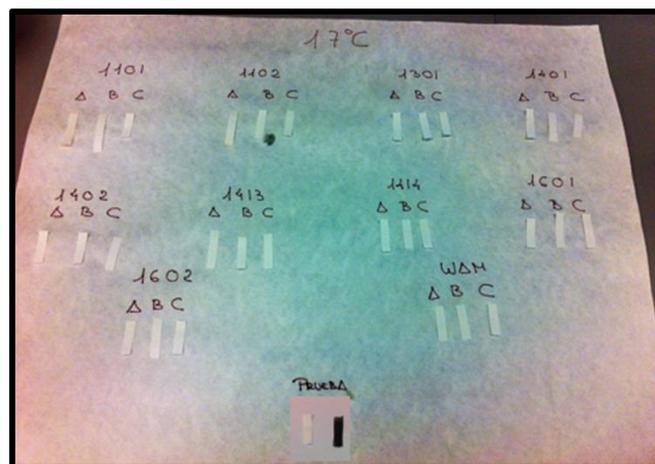


Fig. 27: Producción SH₂ a 17°C.

Según estos resultados, ninguna de las levaduras estudiadas produce SH₂, por lo que este parámetro no va a marcar diferencias en la selección de levaduras en este caso.

4.4 pH.

Según los límites de pH descritos por la D.O. Rueda (AYG/1405/2008, 2008) para vinos blancos, al final de la fermentación todos entrarían dentro de estos límites. En el caso de que el pH no estuviera dentro de los límites, se procedería a descartar esa levadura, ya que podría afectar a la evolución, características físico-químicas y sensoriales del vino.

Durante la fermentación el nivel de pH puede ascender o descender debido a que se pueden sintetizar ácidos como el succínico y acético, y degradar otros como el málico presentes en el mosto (Hidalgo Togados, 2011).

Levadura	pH fermentación a 20°C	pH fermentación a 17°C
1101-10	3,30±0,03	3,28±0,02
1102-10	3,30±0,01	3,26±0,02
1401-10	3,28±0,02	3,26±0,01
1402-10	3,30±0,03	3,22±0,03
1314-10	3,30±0,02	3,27±0,01
1414-10	3,31±0,01	3,29±0,03
1602-10	3,33±0,05	3,27±0,01
WAM	3,31±0,01	3,35±0,02
Mosto sin fermentar	3,32±0,01	3,36±0,02

Tabla 4: Media aritmética de las tres medidas obtenidas al medir el pH tras la realización de la cinética fermentativa.

4.5 Acidez volátil.

Los resultados obtenidos en la tabla 5 son más altos que los límites aceptables por la D.O. Rueda (AYG/1405/2008, 2008). Esto puede ser debido a que los mostos blancos excesivamente desfangados pueden tener una acidez volátil más elevada, ya que el aporte de ácidos grasos insaturados de cadena larga evita la formación excesiva de ácido acético. Esta acidez volátil puede ser explicada por una vía bioquímica a partir de acetaldehído que se transforma directamente debido a la oxidación del mosto en ácido acético (Hidalgo Togores, 2011). Esta oxidación puede estar debida a que este mosto antes de ser esterilizado no ha sido sulfitado ya que trabajamos con mosto de parcelas ecológicas. Además, las fermentaciones a escalas tan pequeñas y aireación limitada en el matraz favorecen la producción de volátiles altas alejadas del comportamiento en bodega.

Levadura	A. Volátil fermentación a 20°C (g/l de ácido acético)	A. Volátil fermentación a 17°C (g/l de ácido acético)
1101-10	1,20±0,05	1,20±0,11
1102-10	1,00±0,03	1,00±0,09
1401-10	0,90±0,08	1,00±0,09
1402-10	1,00±0,09	1,20±0,02
1314-10	0,90±0,09	1,00±0,08
1414-10	0,90±0,11	1,00±0,02
1602-10	1,40±0,13	1,30±0,05
WAM	1,10±0,09	1,00±0,06
Mosto sin fermentar	0,40±0,02	0,34±0,02

Tabla 5: Media aritmética de las tres medidas obtenidas al medir la A. Volátil mediante el método Garcia Tena tras la realización de la cinética fermentativa.

Por lo tanto, observamos que el mosto sin inocular a temperaturas de 20 y 17°C parte con una acidez volátil de 0,40 y 0,34 g/l respectivamente. Podemos observar que las levaduras que menos produjeron ácido acético durante la fermentación fueron 1401-10, 1413-10 y 1414-10, aunque de todos ellos solo descartaríamos la 1602-10, ya que, es la que más se aleja de la levadura patrón.

Las levaduras 1401-10 y 1413-10, además de tener una óptima cinética fermentativa observamos en la tabla 5, que son las levaduras que menos acidez volátil producen. Al obtener valores más altos de los permitidos, en un futuro sería necesario la vinificación en bodega para determinar la acidez volátil producida por estas levaduras en condiciones reales de vinificación.

4.6 Crecimiento en medio líquido.

Tras realizar la prueba de crecimiento en medio líquido descrita en el apartado 2.2.6, se observó que todas las levaduras son ligeramente flocúlenas (Tabla 6). Este resultado nos da aspectos positivos; ya que al ser ligeramente flocúlenas, ejercerán de sustento durante la fermentación para las otras levaduras y, además, no presentarán problemas a la hora de clarificar y filtrar el vino (Pretorius S & F.bauer, 2002).

Levaduras	600nm	620nm	Tras 10min a 620nm	Resultados (%)	Descripción
1101	0,78	0,93	0,90	96,84	Ligeramente floculentas
1102	0,83	1,00	0,98	98,46	Ligeramente floculentas
1401	0,88	1,05	1,02	97,49	Ligeramente floculentas
1402	0,71	0,87	0,86	98,59	Ligeramente floculentas
1413	1,06	1,23	1,20	97,81	Ligeramente floculentas
1414	0,72	0,86	0,83	96,81	Ligeramente floculentas
1602	1,14	1,20	1,19	99,11	Ligeramente floculentas
WAM	0,75	0,73	0,76	103,13	Floculentas

Tabla 6: Media aritmética de las tres medidas obtenidas al realizar el crecimiento en medio líquido.

4.7 Carácter *killer*.

Se realizó la prueba *killer* como se describe en el apartado 3.2.5. Los resultados indican que las levaduras 1101-10, 1102-10, 1402-10, 1414-10, 1602-10, son sensibles y por lo tanto sería arriesgado utilizarlas como inóculo en una fermentación ya que al ser sensibles otras levaduras que permanezcan en el medio podrían sustituirlas. En cambio, si tenemos en el medio una levadura *killer* o neutra es una ventaja debido a que las levaduras *killer* compiten con las levaduras sensibles y predominan en el medio. Sin embargo, otras levaduras con el mismo factor podrían ser también competidoras. En cambio, las levaduras con carácter neutro no son afectadas (Hidalgo Togores, 2011).

Por lo tanto, se puede concluir que las levaduras que serían adecuadas para ser seleccionadas 1413-10 y 1401-10, estas dos levaduras presentan en los ensayos anteriores resultados positivos. Además, siendo la levadura 1401-10 neutra siempre obtendríamos una buena cinética fermentativa ya que las otras levaduras del medio no le afectarían su crecimiento durante la fermentación. La levadura 1413-10, al ser una levadura *killer* predominaría durante la fermentación y realizaría una fermentación correcta.

Hoy en día hay autores (Raynal, et al., 2010) que consideran que el carácter *killer* no es tan necesario dado que al inocular la levadura se realiza en cantidades elevadas que permite que esta se imponga sobre las autóctonas.

Levadura	TEST KILLER	TEST SENSIBLE	RESULTADO
1101	-	-	Sensible(S)
1102	-	-	Sensible(S)
1401	-	+	Neutro (N)
1402	-	-	Sensible(S)
1413	+	+	Killer(K)
1414	-	-	Sensible(S)
1602	-	-	Sensible(S)
WAM	+	+	Killer(K)

Tabla 7: Resultado factor *killer* y sensible. +; Resultado positivo, -; Resultado negativo en el ensayo.

En la Fig. 28 se observa un ejemplo del halo de inhibición y en Fig. 29 la siembra no presenta inhibición.



Fig. 28: Presencia del halo de inhibición.



Fig. 29: No presenta halo de inhibición en la siembra.

5. CONCLUSIONES.

En el estudio realizado se puede concluir lo siguiente:

1. La levadura 1401-10 es candidata para ser seleccionada por los motivos que se explican a continuación:
 - Levadura 1401-10 presenta una buena fermentación a 20°C, a temperaturas de 17°C tendría una cinética fermentativa aceptable, es una de las levaduras que produce menos acidez volátil, es neutra, no produce SH₂ y el pH está dentro de los límites aceptables por la denominación de origen.
 - Por otro lado, la levadura 1401-10 comparte perfil mitocondrial con la que predomina durante la fermentación espontánea en la vinificación realizada en 2012. Esto quiere decir que esta levadura se adapta muy bien a las condiciones de fermentación y al medio de fermentación (mosto), que se utilizan en la bodega.
2. La levadura 1413-10 es candidata para ser seleccionada por los motivos que se explican a continuación:
 - Levadura 1413-10 presenta una buena fermentación a 20°C, tiene un buen poder fermentativo, no produce SH₂, el pH entra dentro de los límites aceptables por la D.O. Rueda, es una de las levaduras que menos acidez

volátil produce y además presenta el carácter *killer* por lo que predominaría durante la fermentación.

Las levaduras que han obtenido buenos resultados en los ensayos realizados y por lo tanto buenas características enológicas se deben seguir estudiando para obtener más información sobre su comportamiento enológico a escala de bodega.

6. BIBLIOGRAFIA.

AYG/1405/2008, 2008. *Parámetros físico químicos exigibles a los vinos acogidos a la denominación de origen Rueda*.

Bartra, E., 2000. *Genética de levaduras*. 3 ed. Estación de Viticultura y Enología de Villafranca del Penedés: INCAVI.

Beech, W. & Thomas, S., 1985. Bulletin. *O.I.V*, Issue 564, pp. 652-653.

Boned, F., Colomo, B. & Suarez, J., 1992. Selección de levaduras vínicas en D.O Bierzo. *Vitivinicultura*, p. 37.

De Rosa, T., 1998. *Tecnología de los vinos blancos*. Mundi Prensa, pp. 141-176.

Del Álamo Sanza, M., 2002. *Prácticas de análisis de vinos*. Palencia: Publicaciones E.T.S.II.A.

Doyle, M., Beuchat, L. & Montville, T., 2001. *Microbiología de los alimentos. Fundamentos y fronteras*. 2 ed. Washington DC: ASN Press.

Fernandez-Espinar, M., Barrio, E. & Querol, A., 2005. *Identificación y caracterización molecular de las levaduras vínicas*. Madrid.

Fleet, G., Prakitchaiwattana, C., Beh, A. & Heard, G., 2002. The Yeast Ecology of Wine Grapes. *Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeast*, pp. 1-17.

Heard, G. & Fleet, G., 1986. Ocurrencia y crecimiento de especies de levadura durante la fermentación de algunos vinos australianos.

Hidalgo Togores, J., 2011. *Tratado de Enología*. 2º ed. Madrid, Mexico: Mundi-Prensa.

Izgu, F., Altinbay, D. & Yucelis, A., 1997. Identification and killer activity of a yeast contaminating starter cultures of *Saccharomyces cerevisiae* strains used in Turkish baking industry. *Food Microbiology*, Issue 14, pp. 125-131.

Kreger-Van Rij, N., 1984. *The yeasts*. Elsevier Science Publishers.

Lamellard, 2015. *Lamellardwine*.

Available

at:<http://catalogapp.lallemmandwine.com/uploads/yeasts/docs/5a76143dcd9e1baafc60a0ea19928f96a59a5176.pdf>

Lema, C., García-Jares, C., Orriols, I. & Angulo, L., 1996. Contribución de las poblaciones *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* a la producción de algunos componentes del aroma del vino Albariño.

Longo, E., J, C., D, A. & TG, V., 1991. Efecto de las condiciones climáticas sobre la diversidad de levaduras en mostos de uva del noroeste de España.

López Enriquez, L., 2014/2015. *Monitorización molecular de la ecología levaduriforme de la uva al vino*.

López, V., Querol, A., Ramón, D. & Fernandez-Espinar, M., 2001. A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, Issue 68, pp. 75-81.

Martini, A., 1993. Origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces Cerevisiae*. *Journal of wine reasearch*, pp. 165-176.

Mortimer, R. & Polsinelli, M., 1999. *On the origins of wine yeast. Research in Microbiology*. pp. 199-204

Navascués, E., 1998. *Identificación y selección de levaduras autoctonas del Alto Aragón*. Madrid.

OIV-MA-F1-06, 2011. *Método pH*.

OIV, 2018. *Compendio métodos internacionales de análisis de los vinos y los mostos*.

OIV-OENO-310-12, 2012. Directrices para la caracterización de levaduras de vino del género *saccharomyces* aisladas de mediante vitivinícolas. p. 21.

OIV-OENO-370-012, 2012. Directrices para la caracterización de levaduras de vino del género *saccharomyces* aisladas de ambientes vitivinícolas. p. 4.

OIV-OENO-370-2012, 2012. Directrices para la caracterización de levaduras de vino del género *saccharomyces* aisladas de mediante vitivinícolas. p. 8.

Parle, J. & Di Mena, M., 1966. The source of yeast in New Zealand wines. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, Issue 9, pp. 98-107.

Pretorius S, I. & F.bauer, F., 2002. Meeting the consumer challenge through genetically customized wine-yeast strains. *TRENDS in biotechnology*, 20(10), pp. 426-432.

Querol, A., Barrio, E., Huerta, T. & Ramón, D., 1992. Monitoreo molecular de las fermentaciones del vino realizadas por cepas de levadura seca.

R.B, W., 1968. Killer of *Sacch. cerevisiae*: A double stranded ribonucleic acid plasmid. *J.Gen. Microbiology*, Volumen 51, p. 115.

Raynal, C. y otros, 2010. Fermentación controlada mediante la inoculación secuencial de una levadura no-*Saccharomyces* y de una levadura *Saccharomyces cerevisiae*, una herramienta innovadora para el enólogo. *Lallemand SAS, Lallemand Inc., Lallemand Península Ibérica*.

Ribéreau-Gayon, P., Dobourdieu, D., Donèche, B. & Lonvaud, A., 2003. *Tratado de enología*. Buenos Aires.

Rosini, G., 1983. The occurrence of killer charters in yeast. En: *Microbiology*. s.l.:s.n., pp. 1462-1464.

Suarez Lepe, J., 1997. *Levaduras vinicas: Funcionalidad y uso en bodega*. Madrid, Barcelona, México: Mundi-Prensa.

Suarez, J. & Leal, B. I., 2004. *Microbiología enológica: fundamentos de la vinificación*. 3º ed. MADRID; BARCELONA; MÉXICO: MUNDI-PRENSA.

Suarez-Lepe, J., 1997. Levaduras vínicas. En: *Funcionalidad y uso en bodega*. Madrid: Mundiprensa, pp. 23-24.

Toquero Gonzalez, B., 2011. Estudio sobre la influencia del terruño en la población levaduriforme de los viñedos de la variedad verdejo de D.O. Rueda. *Proyectos fin de carrera de la ETSIA*, Octubre.

Anexos.

Comportamiento enológico de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* procedentes de una parcela de D.O. Rueda.

ANEXOS

ANEXO 1. Tablas cinéticas fermentativas.

LEVADURAS/	0	1	2	3	7	8	9	10	13	14	15	16	17	20
DIAS	(%vol.)	(%vol.)	(%vol.)	(%vol.)	(%vol.)	(%vol.)	(%vol.)	(%vol.)	(%vol.)	(%vol.)	(%vol.)	(%vol.)	(%vol.)	(%vol.)
1101-10	-	0,1±0,02	1,4±0,10	3,7±0,19	9,8±0,39	10,8±0,49	11,7±0,53	12,4±0,54	13,7±0,52	13,9±0,49	14,0±0,48	14,0±0,47	14,1±0,46	14.05 ± 0,48
1102-10	-	0,3±0,05	2,1±0,04	4,4±0,06	9,5±0,30	10,4±0,28	11,2±0,29	11,9±0,34	13,4±0,37	14,1±0,28	14,2±0,28	14,4±0,30	14,4±0,31	14.54 ± 0,32
1401-10	-	0,2±0,05	2,5±0,38	5,4±0,74	11,2±1,09	11,9±0,98	12,5±0,90	13,0±0,76	13,8±0,40	14,0±0,32	14,0±0,26	14,1±0,24	14,1±0,24	14.12 ± 0,23
1402-10	-	0,2±0,01	2,5±0,05	5,4±0,10	11,2±0,10	11,9±0,06	12,5±0,07	13,0±0,09	13,8±0,13	14,0±0,12	14,0±0,09	14,1±0,10	14,1±0,04	13.33 ± 0,08
1413-10	-	0,2±0,02	1,6±0,11	3,8±0,14	9,8±0,19	10,8±0,17	11,6±0,14	12,3±0,13	13,6±0,10	13,8±0,10	13,9±0,09	13,9±0,08	14,0±0,08	13.96 ± 0,08
1414-10	-	0,1±0,02	1,2±0,05	3,4±0,08	9,4±0,14	10,5±0,09	11,3±0,10	12,0±0,14	13,5±0,31	13,8±0,33	13,9±0,34	14,0±0,34	14,1±0,34	14.09 ± 0,35
1602-10	-	0,1±0,01	1,3±0,13	3,9±0,06	10,7±0,42	11,8±0,47	12,6±0,50	13,2±0,49	14,0±0,39	14,1±0,38	14,2±0,36	14,2±0,36	14,2±0,36	14.12 ± 0,37
WAM	-	0,3±0,09	2,1±0,20	4,7±0,24	10,7±0,29	11,6±0,27	12,3±0,22	12,9±0,12	13,8±0,09	14,0±0,14	14,1±0,18	14,2±0,22	14,2±0,25	14.23 ± 0,31

Tabla 8: Representación de la evolución de poder fermentativo a lo largo de los días en los que se desarrolla la cinética fermentativa a 20°C. El poder fermentativo lo medimos en (%vol.).

Comportamiento enológico de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* procedentes de una parcela de D.O. Rueda.

LEVADURAS/ DIAS	0 (%vol.)	1 (%vol.)	2 (%vol.)	3 (%vol.)	7 (%vol.)	8 (%vol.)	9 (%vol.)	10 (%vol.)	13 (%vol.)	14 (%vol.)	15 (%vol.)	16 (%vol.)	17 (%vol.)	20 (%vol.)	21 (%vol.)	22 (%vol.)	23 (%vol.)
1101-10	0,00±0,00	0,02±0,01	0,43±0,02	1,77±0,20	6,21±0,69	7,45±0,83	8,58±0,86	9,65±0,90	10,48±0,83	12,59±0,48	12,98±0,30	13,34±0,21	13,57±0,21	13,63±0,22	13,75±0,25	13,78±0,27	13,80±0,28
1102-10	0,00±0,00	0,02±0,02	0,51±0,15	1,97±0,50	5,91±0,84	6,88±0,96	7,80±0,97	8,65±1,03	9,26±1,04	11,06±1,01	11,36±0,99	11,83±0,94	12,28±0,84	12,50±0,78	13,11±0,53	13,27±0,45	13,37±0,40
1401-10	0,00±0,00	0,00±0,02	0,36±0,10	1,72±0,51	6,05±0,81	7,17±0,86	8,09±0,93	8,98±0,97	9,59±1,00	11,37±0,95	11,64±0,95	12,00±0,91	12,13±1,19	12,55±0,80	13,03±0,63	13,15±0,57	13,25±0,54
1402-10	0,00±0,00	0,00±0,00	0,15±0,02	0,73±0,14	3,62±0,28	4,54±0,31	5,43±0,34	6,43±0,19	7,12±0,17	9,62±0,25	9,93±0,21	10,43±0,21	11,02±0,24	11,32±0,26	12,32±0,35	12,62±0,35	12,82±0,34
1413-10	0,00±0,00	0,01±0,02	0,42±0,11	1,52±0,18	5,35±0,50	6,47±0,62	7,54±0,69	8,47±0,81	9,22±0,84	11,36±0,94	11,92±0,85	12,50±0,73	13,02±0,59	13,18±0,59	13,56±0,44	13,61±0,43	13,64±0,42
1414-10	0,00±0,00	0,00±0,01	0,28±0,06	1,25±0,19	5,11±0,34	6,18±0,36	7,21±0,37	8,15±0,37	8,89±0,34	10,98±0,23	11,34±0,17	11,80±0,09	12,27±0,09	12,49±0,13	12,97±0,34	13,03±0,40	13,09±0,43
1602-10	0,00±0,00	0,02±0,01	0,37±0,06	1,51±0,15	6,13±0,29	7,44±0,33	8,67±0,33	9,86±0,46	10,71±0,46	12,96±0,48	13,26±0,47	13,62±0,44	13,93±0,40	14,05±0,39	14,31±0,37	14,37±0,38	14,43±0,39
WAM	0,00±0,00	0,05±0,10	1,21±0,44	3,15±0,61	8,56±1,20	9,77±1,17	10,87±1,14	11,65±1,10	12,13±0,98	13,13±0,49	13,22±0,39	13,30±0,31	13,38±0,25	13,41±0,22	13,46±0,17	13,46±0,17	13,48±0,17

Tabla 10: Representación de la evolución de poder fermentativo a lo largo de los días en los que se desarrolla la cinética fermentativa a 17°C. El poder fermentativo lo medimos en (%vol.).

Comportamiento enológico de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* procedentes de una parcela de D.O. Rueda.

Levadura/Día	0	1	2	3	6	7	8	9	10	13	14	15	16	17	20	21	22	23	24	27
	(%vol.)	(%vol.)	(%vol.)	(%vol.)	(%vol.)	(%vol.)	(%vol.)	(%vol.)	(%vol.)	(%vol.)	(%vol.)	(%vol.)	(%vol.)	(%vol.)	(%vol.)	(%vol.)	(%vol.)	(%vol.)	(%vol.)	(%vol.)
1101-10		0,01±0,00	0,04± 0,01	1,08±0,14	4,66±0,43	5,76±0,46	6,73±0,46	7,73±0,48	8,49±0,48	10,82±0,46	11,25±0,43	11,77±0,41	12,33±0,40	12,58±0,36	13,30±0,32	13,44±0,29	13,54±0,27	13,65±0,24	13,73±0,22	13,80±0,20
1102-10		0,01±0,02	0,29±0,08	1,25±0,21	4,92±0,40	5,97±0,47	6,87±0,52	7,73±0,56	8,39±0,61	10,29±0,66	10,64±0,67	11,10±0,66	11,63±0,65	11,93±0,62	12,84±0,64	13,08±0,64	13,23±0,64	13,46±0,63	13,66±0,59	13,91±0,54
1401-10		0,03±0,02	0,28±0,03	1,29±0,09	5,38±0,35	6,44±0,46	7,32±0,51	8,02±0,92	8,57±1,10	10,67±0,86	11,04±0,90	11,48±0,91	11,94±0,91	12,42±0,54	13,11±0,52	13,31±0,47	13,31±0,44	13,57±0,41	13,67±0,38	13,85±0,34
1402-10		0,01±1 0,01	0,04±0,01	0,30±0,03	2,21±0,01	2,94±0,09	3,55±0,07	4,19±0,10	4,72±0,13	6,42±0,24	6,75±0,26	7,22±0,29	7,76±0,32	8,09±0,31	9,09±0,42	9,56±0,46	9,75±0,51	10,10±0,50	10,45±0,53	11,22±0,58
1413-10		0,00±0,01	0,17±0,01	0,69±0,04	3,77±0,15	4,78±0,60	5,68±0,58	6,65±0,56	7,38±0,57	9,58±0,58	10,00±0,59	10,54±0,60	11,12±0,62	11,42±0,59	12,36±0,53	12,60±0,50	12,69±0,45	12,90±0,47	13,02±0,45	13,25±0,42
1414-10		0,01±0,01	0,10±0,04	0,46±0,24	3,01±0,41	4,07±0,42	4,97±0,43	5,93±0,43	6,69±0,45	8,99±0,49	9,43±0,51	9,98±0,53	10,61±1,01	10,98±0,59	12,10±0,40	12,35±0,30	12,52±0,25	12,77±0,42	12,95±0,45	13,23±0,45
1602-10		-0,00±0,01	0,12±0,20	0,49±0,48	3,57±0,74	4,64±0,68	5,59±0,69	6,51±0,64	6,86±0,76	9,37±0,49	9,78±0,47	10,33±0,44	11,33±0,47	11,78±0,63	12,78±0,65	13,05±0,61	13,35±0,70	13,50±0,75	13,70±0,78	14,02±0,82
WAM		0,01±0,01	0,20±0,15	0,84±0,68	4,28±0,60	5,23±0,62	6,15±0,67	6,97±0,71	7,62±0,74	9,49±0,86	9,81±0,80	10,28±0,81	10,78±0,78	11,08±0,78	12,11±0,43	12,37±0,41	12,59±0,38	12,68±0,37	12,85±0,34	13,11±0,28

Tabla 12: Representación de la evolución de poder fermentativo a lo largo de los días en los que se desarrolla la cinética fermentativa a 14°C. El poder fermentativo lo medimos en (%vol.).

Comportamiento enológico de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* procedentes de una parcela de D.O. Rueda.

ANEXO 2. Grafica cinética fermentativa a 14°C.

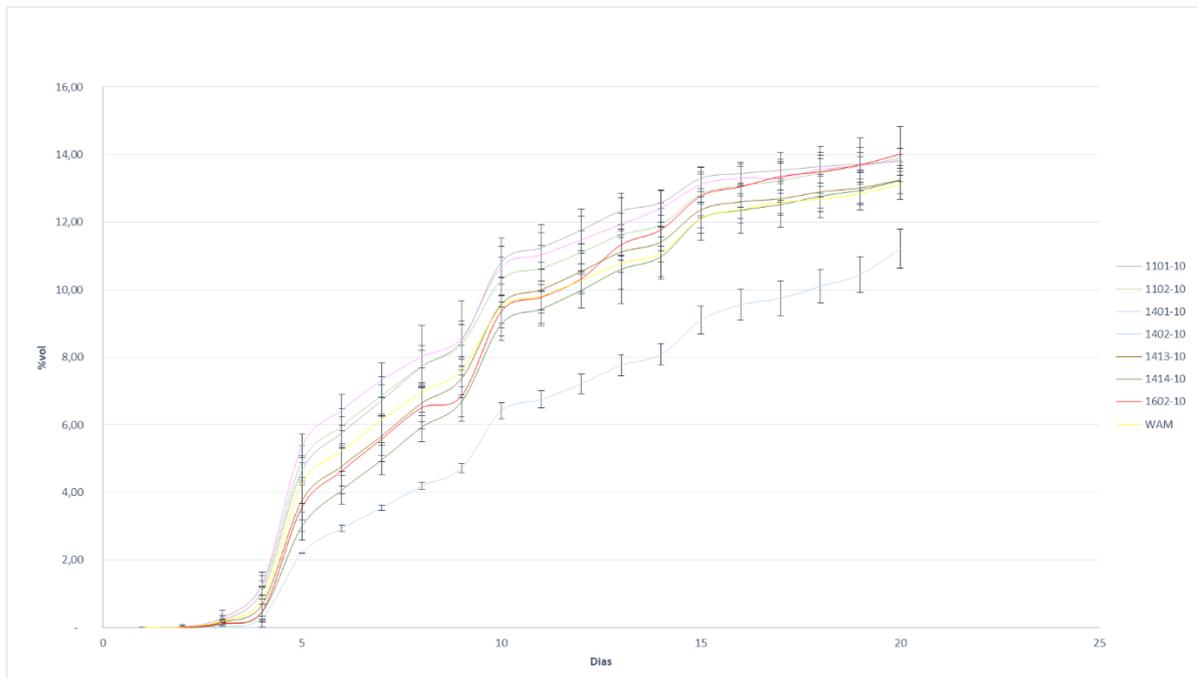


Fig. 30: Cinética fermentativa a 14°C.

ANEXO 3. Tablas vigor fermentativo.

LEVADURAS/ DIAS	0	1	2	3
1101-10	-	0,1±0,02	1,4±0,10	3,7±0,19
1102-10	-	0,3±0,05	2,1±0,04	4,4±0,06
1401-10	-	0,2±0,05	2,5±0,38	5,4±0,74
1402-10	-	0,2±0,01	2,5±0,05	5,4±0,10
1413-10	-	0,2±0,02	1,6±0,11	3,8±0,14
1414-10	-	0,1±0,02	1,2±0,05	3,4±0,08
1602-10	-	0,1±0,01	1,3±0,13	3,9±0,06
WAM	-	0,3±0,09	2,1±0,20	4,7±0,24

Tabla 13: Representación de la evolución de poder fermentativo en los tres días que representan el vigor fermentativo 20°C. El poder fermentativo lo medimos en (%vol.).

LEVADURAS/ DIAS	0 (%vol.)	1 (%vol.)	2 (%vol.)	3 (%vol.)
1101-10	-	0,02±0,01	0,43±0,02	1,77±0,20
1102-10	-	0,02±0,02	0,51±0,15	1,97±0,50
1401-10	-	0,00±0,02	0,36±0,10	1,72±0,51
1402-10	-	0,00±0,00	0,15±0,02	0,73±0,14
1413-10	-	0,01±0,02	0,42±0,11	1,52±0,18
1414-10	-	0,00±0,01	0,28±0,06	1,25±0,19
1602-10	-	0,02±0,01	0,37±0,06	1,51±0,15
WAM	-	0,05±0,10	1,21±0,44	3,15±0,61

Tabla 14: Representación de la evolución de poder fermentativo en los tres días que representan el vigor fermentativo a 17°C. El poder fermentativo lo medimos en (%vol.).

Levadura/Día	0(%vol.)	1(%vol.)	2(%vol.)	3(%vol.)
1101-10	-	0,01±0,00	0,04± 0,01	1,08±0,14
1102-10	-	0,01± 0,02	0,29±0,08	1,25± 0,21
1401-10	-	0,03±0,02	0,28± 0,03	1,29± 0,09
1402-10	-	0,01± 0,01	0,04±0,01	0,30± 0,03
1413-10	-	0,00±0,01	0,17± 0,01	0,69± 0,04
1414-10	-	0,01±0,01	0,10±0,04	0,46± 0,24
1602-10	-	- 0,00±0,01	0,12± 0,20	0,49± 0,48
WAM	-	0,01± 0,01	0,20± 0,15	0,84± 0,68

Tabla 15: Representación de la evolución de poder fermentativo en los tres días que representan el vigor fermentativo a 14°C. El poder fermentativo lo medimos en (%vol.).

ANEXO 4. Gráfica vigor fermentativo a 14°C.

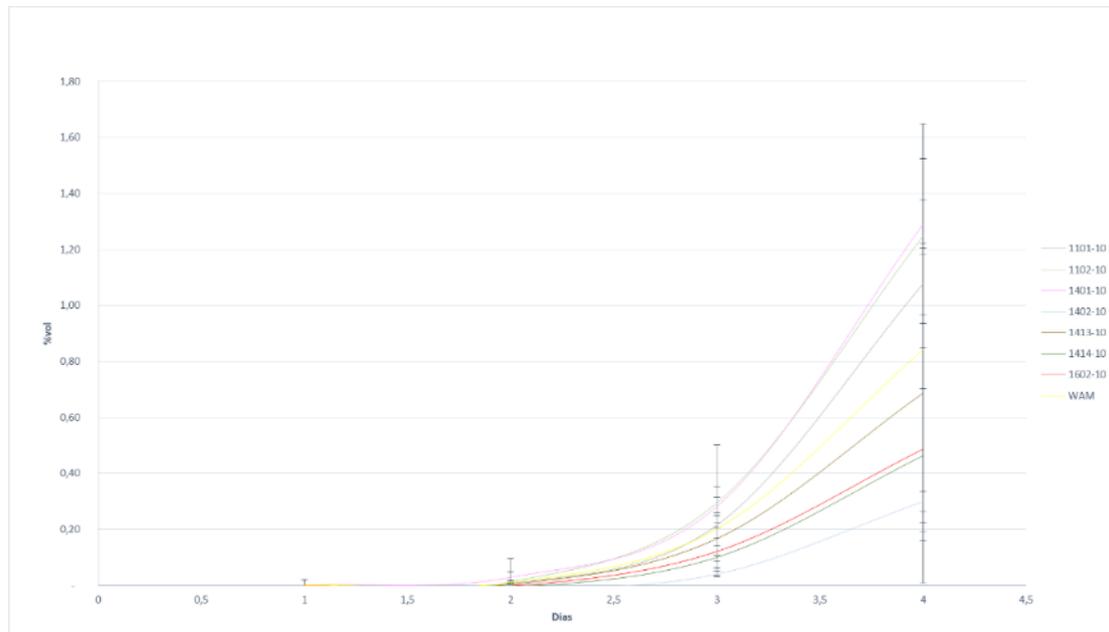


Fig. 31: Vigor fermentativo a 14°C.