



Universidad de Valladolid

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERIAS AGRARIAS**

Grado en Enología

Estudio de la tolerancia a elevadas concentraciones de
azúcar de *Saccharomyces cerevisiae* vínicas

Alumna: Beatriz Oteruelo Morales

Tutoras: Josefina Vila Crespo

Violeta Ruipérez Prádanos

Julio 2018

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. ANTECEDENTES	6
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	7
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
4.1. Microorganismos del estudio.....	8
4.2. Mantenimiento y cultivo de microorganismos	8
4.2.1. Mantenimiento microorganismos.....	9
4.2.2. Cultivo microorganismos	9
4.3. Mosto de Verdejo	9
4.4. Determinación de la cinética fermentativa	10
4.4.1. Cinética Fermentativa	10
4.4.2. Poder fermentativo y vigor fermentativo	10
4.5. Determinación de parámetros bioquímicos	10
4.5.1. pH.....	10
4.5.2. Azúcares reductores: REBELEIN.....	10
4.5.3. Azúcares reductores: MÉTODO DNS	11
4.5.4. Glicerol.....	11
4.6. Tratamiento estadístico de datos	12
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
5.1. Cinética Fermentativa	13
5.2. Parámetros bioquímicos.....	19
5.2.1. Poder fermentativo.....	19
5.2.2. pH.....	21
5.2.3. Azúcares reductores:	21
5.2.4. Glicerol.....	23
6. CONCLUSIONES.....	26
BIBLIOGRAFÍA	27
ANEXOS	30

RESUMEN

Durante los últimos años el cambio climático está suponiendo un gran problema para las bodegas ya que tienen que adaptarse a la cambiante composición de las características analíticas de la uva (pH, acidez, azúcar...). En este trabajo se estudiará el comportamiento enológico en condiciones de alta concentración de azúcar de distintas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas en laboratorio durante distintas etapas del proceso fermentativo del mosto de uva de la variedad Verdejo durante las vendimias de 2010 y 2012.

Tras el análisis de la cinética fermentativa y de los distintos parámetros bioquímicos estudiados (poder fermentativo, pH, azúcares residuales y glicerol), se pueden sugerir posibles levaduras candidatas para su posterior uso en el proceso de vinificación. Con esta caracterización se pretende conseguir que la calidad del vino final no varíe a pesar de las modificaciones que causa el cambio climático en la composición de la uva, especialmente el aumento en la concentración de azúcar y, por consiguiente, el grado alcohólico final.

ABSTRACT

In the last few years, climate change has become a big problem for wineries since they have to adapt to the changing composition of the analytical characteristics of the grape (pH, acidity, sugar...). In this work, it will be studied the oenological behavior of different strains of *Saccharomyces cerevisiae* in conditions of high concentration of sugar isolated in our laboratory during different stages of the fermentative process of the must of Verdejo grape in 2010 and 2012 harvests.

After the analysis of the fermentative kinetic, and the other biochemical parameters (fermentative power, pH, residual sugars and glycerol), it is possible to suggest yeasts as possible candidates for their later use during winemaking process. With this characterisation we aim to get no differences in the final wine quality, despite the changes caused by climate change in the composition of the grape, particularly the concentration of sucrose leading to an increase of the final alcoholic degree.

1. INTRODUCCIÓN

El aumento de las temperaturas en todo el mundo tendrá un efecto extraordinario en la agricultura; sin embargo, pocos cultivos son susceptibles a cambios mínimos en el clima, como lo son las uvas, especialmente las uvas de calidad Premium (Hannah *et al.*, 2013). España, uno de los países vitivinícolas tradicionales, podría convertirse en una de las primeras zonas vitícolas del mundo donde el desarrollo de la uva se vuelve inviable a causa de estos cambios (Duarte and O'Neill, 2011).

Actualmente el cambio climático está provocando un cambio notable en la composición de la uva, lo que deriva en una microbiota, una química y un análisis sensorial del vino distintos. Cualquier cambio en el clima o en los patrones climáticos conocidos puede afectar a las bodegas, dejando en riesgo, como producto económico a las uvas y el vino (Renée and Mozzel, 2014). Entre los efectos más importantes relacionados con el cambio climático se encuentran las vendimias tempranas, el aumento de la concentración de azúcar (llevando a altos niveles de alcohol en el vino), una menor acidez y la modificación de los compuestos aromáticos varietales. En temperaturas extremadamente cálidas, presentes actualmente en muchas zonas, el metabolismo de la vid puede inhibirse, reduciendo la acumulación de metabolitos, y afectando por ello al aroma y al color del vino (Mira de Orduña, 2010).

Entre los cambios en la composición de la uva, el aumento de la concentración de azúcar resulta de interés para los enólogos ya que puede derivar en un contenido de alcohol elevado en el producto final, además de causar un estrés en la levadura que puede derivar en la formación de otros metabolitos durante la fermentación como el ácido acético. Si este problema no se controla, puede dar lugar a pHs más altos cambiando la ecología microbiana de los mostos y vinos y perder características sensoriales importantes (Mira de Orduña, 2010).

La solución ante este problema, difícil de tratar, podrían ser cambios en los tratamientos o manejo del viñedo, pero también puede tratarse de una estrategia que identifique levaduras tolerantes a un estrés ocasionado por el etanol o a un estrés osmótico al contar con altas concentraciones de azúcar (Mira de Orduña, 2010; E-VitiClimate, 2012).

Las posibles soluciones en la gestión y mantenimiento del viñedo se centran en disminuir tanto la superficie foliar como quitar racimos para reducir la fotosíntesis y la acumulación de azúcar en las uvas, usar reguladores del crecimiento en el racimo, o por todo el viñedo, para retrasar la maduración de la uva y optimizar la fecha de la cosecha para evitar sobre maduraciones (Goold *et al.*, 2017).

Por otro lado, entre las estrategias sugeridas para bajar el contenido de azúcar después de vendimiar la uva y antes de su fermentación, se encuentran mezclar con uvas de vendimia temprana con bajo contenido en azúcar y un sabor maduro, el uso de la nanofiltración para eliminar azúcar del mosto o la adición de enzimas tales como glucosa - oxidasa de *Aspergillus niger* (Goold *et al.*, 2017).

Adicionalmente, se han sugerido estrategias que podrían aplicarse tras la fermentación como el *coupage* entre vinos de alto grado alcohólico con vinos con bajo grado o la eliminación del alcohol utilizando sistemas de membrana (ósmosis inversa) u otras técnicas (Goold *et al.*, 2017).

Las ventajas e inconvenientes y la efectividad de estas posibles soluciones aún son tema de estudio (Varela *et al.*, 2015).

Por último, se ha propuesto mitigar los efectos del cambio climático en enología mediante prácticas microbiológicas (Goold *et al.*, 2017). Por lo tanto, la identificación de levaduras autóctonas tolerantes al estrés ocasionado por el aumento de los azúcares, producido por un cambio en la composición, puede ayudarnos a mermar el efecto del cambio climático (García *et al.*, 2016).

Hay aproximadamente 150 géneros de levadura descritos y de las 1500 especies de levadura conocidas, más de 40 se han encontrado en viñedos y bodegas de todo el mundo (Jolly *et al.*, 2014).

Varios autores han mencionado que las especies de levadura no-*Saccharomyces*, como *K. apiculata*, *C. stellata* y *T. delbrueckii*, pueden tener una mejor capacidad que *Saccharomyces cerevisiae* para crecer durante las fermentaciones realizadas con altas concentraciones de azúcar (> 200 g/L) y la capacidad de las cepas *Candida apicola* y *Candida zemplinina* para crecer a 14% v/v de etanol (Tofalo *et al.*, 2009).

Sin embargo, las levaduras del género *Saccharomyces*, en general, dominan en el proceso de fermentación, siendo en las etapas finales cepas de *Saccharomyces cerevisiae* tolerantes al alcohol las dominantes (Cray *et al.*, 2013). La función principal de las levaduras es catalizar la conversión rápida, completa y eficiente de azúcares de uva a etanol, dióxido de carbono y otros metabolitos secundarios (Pretorius, 2000; Borneman *et al.*, 2007). Además, esta especie ha desarrollado un metabolismo de carbono positivo para el uso del azúcar (preferentemente glucosa) que maximiza la producción de etanol (Pfeiffer y Morley, 2014). Por otro lado, es una de las especies más interesantes para fermentación en mostos con un contenido de azúcar superior a 240 g/L pudiendo reducir la formación de etanol final (Pretorius *et al.* 2016), derivando la fermentación hacia otras rutas. Los mostos contienen generalmente entre 200-250 g/L de una mezcla equimolar de glucosa y fructosa (Attfield, 1997; Jiménez-Martí *et al.*, 2010). Un contenido de azúcar como el citado podría dar lugar una concentración de alcohol mayor en el vino final (<13,5% vol.), a pesar de que la mayoría de los vinos se encuentran entre 11,5% y 13,5% vol. Sin embargo, en algunas regiones más soleadas influenciadas por el cambio climático, el contenido medio de alcohol ha aumentado aproximadamente un 2% vol., llegando a encontrar vinos con un 16% vol. (Varela *et al.*, 2015). Por ello, resulta interesante el uso de cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* para desviar la fermentación hacia la formación de otros metabolitos.

▪ **Influencia de la composición del mosto**

La composición del mosto influye en el proceso de vinificación, por lo que la concentración de azúcar, la acidez, la disponibilidad de nutrientes y factores de crecimiento y el contenido en sustancias fenólicas juegan un papel fundamental en la calidad final del producto. Es necesario su estudio ya que puede marcar la diferencia entre un tipo de uvas u otras según sus características.

El aumento en la concentración de azúcar, principal factor de nuestro trabajo puede acarrear peligros por fermentaciones difíciles, produciendo plasmólisis y reducción de la actividad fermentativa de las levaduras cuando el alcohol encontrado es superior al 14% (Gray *et al.*, 1941).

El contenido en etanol, encontrado tras la fermentación alcohólica, también es determinante ya que durante este proceso las levaduras están expuestas al estrés de la acumulación de etanol y, otras sustancias tóxicas (Salvadó *et al.* 2008). Para que no se produzca una pérdida de viabilidad, éstas han desarrollado una respuesta para las condiciones medioambientales adversas llamada Respuesta al Estrés Ambiental, (REA) (Dequin y Casaregola, 2011).

Pueden existir diferencias en el rendimiento en alcohol dependiendo de las cepas, pero son mucho menos importantes que los efectos externos dependiendo de las condiciones de fermentación empleadas en bodega, como la temperatura que puede hacer variar el ratio de la cepa un 70% o la concentración inicial de azúcar, de lo que también depende la producción de glicerol (Rankine, 1953). La producción del etanol está limitada por el efecto que tiene este sobre las levaduras y por el aumento de la presión osmótica por la concentración de sustrato existente en el medio. Además, existe un sinergismo entre etanol-azúcar, y entre etanol-derivados metabólicos, que aumentan la inhibición en la fermentación (Jiménez, 1986). Se está tratando de desarrollar una cepa de levadura de “bajo contenido alcohólico” que redirecciona el metabolismo del carbono (Fig.1), de la producción de etanol hacia otros metabolitos como el glicerol (Pretorius *et al.*, 2016).

El glicerol, cuya concentración final varía entre 5 y 12 g/L, sirve a *Saccharomyces cerevisiae* para hacer frente a las presiones osmóticas, abandonando la célula posteriormente por difusión pasiva a través de la membrana. Su estudio es importante ya que la glicerina es el tercer componente más abundante en el vino, pudiendo llegar al 1%. Se origina en la fermentación alcohólica, especialmente al inicio. Desde el punto de vista enológico, la glicerina proporciona sabor dulce y cuerpo al vino, y permite comprobar la autenticidad mediante reglas enológicas, que relacionan el etanol y la glicerina (Díez de Betencourt y Burdiel Frontelo, 1972). La glicerina se puede cuantificar por métodos químicos (Ribéreau Gayon *et al.*, 1982) y enzimáticos. Según un estudio de Radler y Schütz (1982) sobre cepas del género *Saccharomyces* y su producción de glicerol, se determinó que existía una correlación entre el glicerol producido y la concentración en azúcar, pero esta relación no era tan significativa como las condiciones externas de vinificación que afectan a la cepa de levadura en bodega.

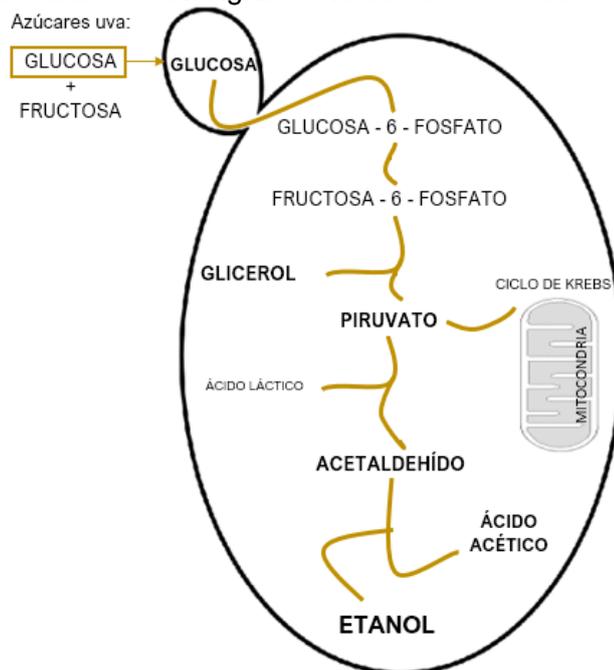


Figura 1. Esquema del metabolismo del carbono de la levadura con las distintas vías de degradación interesantes en el estudio: Glicerol, ácido acético, Etanol y otros metabolitos secundarios minoritarios, a partir, principalmente de la glucosa. Fuente propia.

▪ Criterios de selección de levaduras

Los criterios básicos para la selección de levaduras consisten en una serie de parámetros enológicos y bioquímicos que describen las características que las levaduras deben tener para ser adecuadas para realizar la fermentación. Estas levaduras deben tener un elevado poder fermentativo, dejando los vinos con una concentración de azúcares residuales mínima o secos, acidez volátil baja y correcta cinética fermentativa (Abad, 2006).

Para conseguir un poder fermentativo elevado se deben cumplir dos requisitos: producción y tolerancia al alcohol y ausencia de problemas en el acabado. El poder fermentativo de una levadura puede ser medido por la cantidad de azúcar que fermenta, es decir, por la cantidad de alcohol producida. Esta cantidad dependerá de la composición inicial del mosto y del desarrollo de la fermentación (Suárez Lepe, 1997).

La cinética fermentativa se controla utilizando una curva con los gramos de CO₂ producidos entre el tiempo. Su determinación se basa en la duración de la fase de latencia o arranque de fermentación, disminuyendo la posibilidad de ataques microbianos y oxidaciones (Abad 2006), regularidad fermentativa y curva termodinámica de cada cepa (que garantice la ausencia de explosiones calóricas que provoquen elevaciones excesivas de la temperatura) , procurar un final de fermentación y la duración del proceso no excesiva (Suárez Lepe *et al.* 2004) y una respuesta al estrés fermentativo, por el etanol y el CO₂ producidos (Abad , 2006). Otros parámetros interesantes para su control son la pendiente de la curva en la fase logarítmica, la duración de la fase estacionaria y la longitud y pendiente de la curva en la fase final (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006).

En las representaciones de la cinética fermentativa pueden diferenciarse 3 fases. La primera fase, de latencia, donde el medio se saturará de CO₂ y se comenzarán a multiplicar las levaduras, al encontrarse en temperaturas óptimas. La segunda fase, de crecimiento exponencial, donde las levaduras se multiplican durante 6 o 7 generaciones (Suárez Lepe, 1997), generando una población máxima de $1,2 - 1,3 \cdot 10^8$ células por mililitro. La tercera fase, la estacionaria, donde las levaduras ya han alcanzado su máximo, dejan de multiplicarse y comienzan a perder viabilidad por la ausencia de nutrientes en el medio (Salmon *et al.*, 1993). Al final de la fermentación cuando los azúcares residuales están en bajas concentraciones la velocidad disminuye.

La velocidad de fermentación, la regularidad en la actividad fermentativa, duración total del proceso, y contenido en etanol conseguido, se determinará en idénticas condiciones experimentales (composición química del sustrato, recipiente de microvinificación, volumen de aire del interior, temperatura de incubación), tratando de seguir la actividad metabólica de las levaduras en cada momento (Abad, 2006).

2. ANTECEDENTES

Las levaduras utilizadas en este estudio han sido seleccionadas en la Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias de Palencia durante las diferentes etapas de vinificación mediante fermentación espontánea en una bodega de la Denominación de Origen Rueda durante las vendimias 2010 y 2012.

El aislamiento se realizó tomando muestras durante el proceso de elaboración: Mosto de Uva Recién Estrujado (MURE), Mosto Desfangado en Bodega (MDB), Inicio de Fermentación en Bodega (IFB), Fermentación Tumultuosa en Bodega (FTB) y Final de Fermentación en Bodega (FFB). Los aislados se conservaron en medio sólido en tubos de ensayo y liofilizados.

Todas las levaduras aisladas fueron caracterizadas molecularmente a nivel de cepa por nuestro grupo (datos no publicados) mediante la técnica de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción del ADN mitocondrial (RFLP-mtDNA) (Resolución OIV-OENO 408-2011), obteniendo diferentes perfiles genéticos. Tras obtener los perfiles mitocondriales de las cepas, se agruparon los que compartían el mismo perfil mitocondrial y se analizó un aislado representante de cada grupo.

Adicionalmente se identificaron a nivel de especie mediante PCR de la región ITS-5.8S ribosomal y secuenciación (Oliva *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos confirman que todas las levaduras utilizadas en este trabajo pertenecen a la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

Por lo tanto, las levaduras analizadas en este estudio forman parte de una colección de cepas genéticamente distintas de fuerte implantación durante el proceso de vinificación de esta bodega.

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Los efectos del cambio climático han supuesto un aumento en la concentración de azúcar, entre otros cambios en la composición de la uva (modificaciones en el pH y la acidez, sustancias fenólicas, nutrientes...), que pueden afectar al desarrollo del proceso fermentativo y a las características del producto final.

El objetivo principal de este trabajo es validar el uso de levaduras aisladas durante el proceso de fermentación espontánea como estrategia para mitigar los efectos del cambio climático asociados al aumento de la concentración de azúcar de la uva, lo que se traduce en un posible aumento del grado alcohólico en los vinos.

Para lograr la consecución de este objetivo principal tendremos que caracterizar enológicoamente las levaduras seleccionadas *Saccharomyces cerevisiae* en mostos con alta concentración de azúcares. En esta caracterización se pretende identificar levaduras que lleven a cabo una correcta fermentación alcohólica sin aumentar la concentración de etanol final en el vino. Por lo tanto, se proponen los siguientes objetivos específicos:

- Estudio de una correcta cinética fermentativa comparativa entre mostos con concentración de azúcar actual y con una concentración alta.
- Estudio de los cambios producidos en el metabolismo de los azúcares, evaluando la capacidad de las levaduras para elaborar vinos secos y la producción de glicerol.
- Determinar las levaduras interesantes para fermentar mostos altamente azucarados sin aumentar el grado alcohólico final.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Microorganismos

Se utilizaron 23 cepas de levaduras aisladas en las diferentes etapas de la vinificación de 2010 y 2012. Como levadura control utilizamos la levadura Uvaferm WAM, seleccionada en la E.T.S. de Ingenierías Agrarias de Palencia, Universidad de Valladolid y comercializada por Lallemand. Esta levadura procede de la D.O. Rueda. Se empleó como control de fermentación debido a que posee una velocidad de fermentación rápida y una fase de latencia corta, características de una correcta cinética fermentativa.

Tabla 1. Distribución en el proceso fermentativo de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* del estudio.

LEVADURA	PROCESO ELABORACIÓN
1101 -10	MURE, MDB (2010)
1102 -10	MURE (2010)
1401 -10	MDB, IFB, FTB, FFB (2010) y MURE, MDB, IFB, FTB, FFB (2012)
1402 -10	IFB (2010)
1413 -10	IFB (2010)
1414 -10	IFB, FTB, FFB (2010) y FFB (2012)
1602 -10	FFB (2010) y FFB (2012)
1302 -12	MDB (2012)
1303 -12	MDB (2012)
1310 -12	MDB (2012)
1404 -12	IFB (2012)
1405 -12	IFB (2012)
1413 -12	MURE, IFB (2012)
1502 -12	MURE, MDB, IFB, FTB (2012)
1503 -12	MURE, MDB, IFB, FTB, FFB (2012)
1504 -12	MDB, IFB, FTB, FFB (2012)
1505 -12	FTB (2012)
1517 -12	FTB (2012)
1604 -12	FFB (2012)
1606 -12	FFB (2012)
1614 -12	FFB (2012)

Estudios previos realizados por el grupo de investigación (datos no publicados), indican que algunas de estas levaduras predominan durante el proceso fermentativo destacando: 1401-10, en la vendimia 2010, encontrándose en un 47%, y la 1502 -12, 1503 -12 y 1504-12 en la vendimia 2012, encontrándose en un 15%, 37% y 24% de los aislados durante el proceso fermentativo, respectivamente.

4.2. Mantenimiento y cultivo de microorganismos

Todos los procedimientos llevados a cabo, de mantenimiento y cultivo, se realizaron en una cabina de flujo laminar (INDELAB), para evitar contaminaciones. Todos los medios de cultivo se esterilizaron en el autoclave durante 15 minutos a 121° antes de su uso.

4.2.1. Mantenimiento microorganismos

Las cepas de levaduras utilizadas se sembraron en placas con medio de cultivo sólido YPD, cuya composición es: extracto de levadura Labkem 1% p/v, peptona bacteriológica Panreac 2% p/v, glucosa Labkem 2% p/v, agar Biolife 1,5% p/v. El cultivo se realizó a 24 °C, realizando pases frecuentes para su mantenimiento.

4.2.2. Cultivo microorganismos

Para la obtención de la biomasa requerida para la inoculación de los ensayos se utilizó medio YPD (descrito en 4.2.1.) en ausencia de agar.

El crecimiento en medio líquido se realizó en 8 ml de medio de cultivo en tubos de ensayo. Se incubó a 21°C durante 24 horas y posteriormente se procedió a su inoculación en cada uno de los matraces.

4.3. Mosto de Verdejo

Este mosto procede de la vendimia 2016, se trasladó a la E.T.S. de Ingenierías Agrarias desde la bodega tras su desfangado y se esterilizó a vapor fluyente, conservándose posteriormente a - 20°C hasta su uso.

Antes de su uso, se determinó el grado alcohólico (% Vol.), determinado por el método ebullométrico con un ebullómetro eléctrico de GAB SYSTEM, la concentración de azúcar (°Brix) medido con un refractómetro científico SAC y el pH con un peachímetro Crison. En todas las medidas se realizaron triplicados, excepto en el pH que se midió por estabilidad. Se obtuvieron los siguientes datos en el mosto de partida: **0% ± 0,01 % vol., 23,5 ± 0,1 °Brix (231,1 g/L azúcar) y pH 3,42 ± 0,02.**

Protocolo de concentración de los azúcares del mosto Verdejo



Figura 2. Rotavapor (Nahita R.E.)

Para llevar a cabo la concentración del mosto se utilizó un Rotavapor (Nahita Rotary Evaporator) y se determinó el °Brix del mosto y grado probable antes de la esterilización y fermentación.

Se concentró el mosto necesario para las microvinificaciones hasta llegar a $25,2 \pm 0,2$ °Brix (251,8 g/L azúcar), logrando así aumentar teóricamente el grado alcohólico final 1% vol.

Una vez terminada la concentración del mosto se midió el grado alcohólico, para comprobar que durante la exposición a altas temperaturas no se ha producido una fermentación espontánea.

4.4. Determinación de la cinética fermentativa

4.4.1. Cinética Fermentativa

Las levaduras fueron previamente cultivadas según lo descrito en el apartado 4.2. El procedimiento seguido para la determinación de la cinética fermentativa es el descrito en la OIV (Resolución OIV-OENO 370-2012), pero con algunas modificaciones adaptadas al ensayo.

Brevemente se inoculó 1 ml de cada levadura en matraces Erlenmeyer de 100 ml con 50 ml de mosto a: i) 232,3 g/L de azúcar (23,5°Brix) y ii) 250 g/L de azúcar (25,2°Brix). Los matraces se sellaron con una válvula Müller (García Barceló, 1990) y se incubaron a 20°C en estufa (Scalab) durante 22 días. Los ensayos se realizaron por triplicado.

El seguimiento de la microvinificación se realizó por análisis gravimétrico con una balanza RADWAG con una precisión de 0,001 g. Los matraces se pesaron diariamente hasta lograr un peso estable, dando por finalizada la fermentación y los resultados se expresaron como la producción de CO₂ en gramos por litro desprendidos durante la fermentación (Suárez Lepe *et al.*, 1997).

4.4.2. Poder fermentativo y vigor fermentativo

El poder fermentativo se determinó tras finalizar la fermentación, estimando la cantidad de etanol producida por las levaduras en ambos mostos. Se expresa cómo % vol. calculado de la siguiente manera:

$$\text{Poder fermentativo} = 2,5 \cdot \Delta \text{ peso (Peso inicial matraz - Peso Final matraz)}$$

El vigor fermentativo es la velocidad a la que la levadura inicia la fermentación, expresado en gramos de CO₂ producidos en las primeras 48 - 72 horas después del comienzo de la fermentación (Resolución OIV-OENO 370-2012).

4.5. Determinación de parámetros bioquímicos

4.5.1. pH

Tras finalizar la fermentación alcohólica se determinó el pH a 20° con un peachímetro CRISON. Las medidas se realizaron por medida estable dentro del matraz tras quitar la válvula Müller. Los resultados se expresan con 2 decimales realizando una única medida.

4.5.2. Azúcares reductores: REBELEIN

Para determinar los azúcares por el método de Rebelein se tomó 2 ml de muestra, en primer lugar, de patrones de glucosa de concentración conocida para poder realizar la recta de calibrado, y posteriormente de muestras de vino. A cada uno de ellos se le añadió 10 ml de solución cúprica (0,168 mol/L) y 5 de solución alcalina (potasio sodio tartrato, 0,886 mol/L).

Posteriormente se introdujeron perlas de vidrio en el matraz, y se calentó durante 2 minutos, desde que comienza la ebullición. Se enfrió el matraz bajo el agua y

se añadieron sucesivamente los reactivos según el método Rebelein (10 ml de KI 30% p/v, 10 ml de H₂SO₄ 16% p/v y 10 ml de almidón 2%).

La determinación de los azúcares se realizó mediante la valoración de los matraces con tiosulfato sódico (0,0551 N) hasta conseguir la coloración blanco marfil. Se realizaron triplicados de las muestras y se hizo una media de los valores obtenidos, restando el volumen gastado de tiosulfato en la muestra al del blanco. Los resultados se expresan como g/L de azúcar residual.

4.5.3. Azúcares reductores: MÉTODO DNS

El método DNS (Dinitrosalicylic Colorimetric Method) (Miller, 1959) es una técnica colorimétrica que sirve para cuantificar los azúcares reductores producidos en fermentación. Emplea ácido 3,5-dinitrosalicílico para la hidrólisis de los azúcares presentes en una muestra, basándose en la reducción del DNS (amarillo), por la glucosa u otro azúcar reductor al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (rojo ladrillo), cuya presencia puede detectarse por lectura de las absorbancias con el espectrofotómetro a 575 nm.

El procedimiento seguido para la determinación se detalla a continuación: 1 ml de reactivo DNS (ácido dinitrosalicílico 0,5 g/L; sulfito sódico 0,025 g/L, hidróxido sódico 0,5 g/L) (Panreac), se añadió a 0,2 ml de muestra y 0,8 ml de agua destilada en un tubo de rosca. La muestra se llevó a ebullición durante 15 minutos observando un cambio en la coloración. Tras la ebullición los tubos se enfriaron y se añadió 1 ml de sal de Rochelle (tartrato sódico potásico 40% Panreac) para estabilizar el color. Por último, se leyó la absorbancia a 575 nm.

4.5.4. Glicerol

La determinación del glicerol se realizó por un método enzimático basado en la fosforilación de la glicerina con ATP, produciendo peróxido de hidrógeno (H₂O₂) por la acción de la enzima glicerol-3-fosfato oxidasa. La cantidad de H₂O₂ producido se determina mediante colorimetría. El ensayo se realizó según las indicaciones del Kit Enzimático (Tecnología Difusión Ibérica S.L. (TDI)) con modificaciones para optimizar nuestro ensayo.

En este ensayo se utilizaron placas de 96 pocillos donde se añadieron 8 µL de muestra diluida 1:30 o de estándar y 160µL de Reactivo 1 (según el kit).

Tras 5 minutos a temperatura ambiente se determinó la absorbancia (A1) a 546 nm en un espectrofotómetro para microplacas Multiskan™Go (Thermo-Scientific). Tras la lectura se añadió 40 µL del Reactivo 2 y después de 25 minutos se determinó la absorbancia (A2) a 546 nm. La cantidad de glicerol se expresa en gramos contenidos por litro de vino, y se calcula de la siguiente forma:

$$\text{Glicerina} \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) = \frac{A2 - (A1 \cdot 0.808) \text{ muestra}}{A2 - (A1 \cdot 0.808) \text{ estándar}} \cdot [\text{estándar sin diluir}]$$

4.6. Tratamiento estadístico de datos

Para el análisis estadístico de datos se utilizará el T-Test o T de student. En los análisis realizados se utiliza un intervalo de confianza de al menos el 95% ($p > 0,05$) indicado con un asterisco (*), o intervalo superior al 99% ($p > 0,005$) indicado con doble asterisco (**).

Los análisis se realizaron en base a dos criterios, el primero atendiendo de forma global a todo el conjunto de levaduras (agrupadas por vendimias) y el segundo individualmente de cada levadura.

El análisis por vendimia se realizó con la media de los datos medios de los parámetros de estudio (etanol, pH, azúcares residuales y glicerol). También se realizó un análisis individual de cada una de las cepas de levadura, obteniendo así la influencia particular de cada una de ellas en los parámetros anteriores.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Cinética Fermentativa

Las cinéticas fermentativas elaboradas por la pérdida diaria de CO₂ (figuras 3 - 11) muestran a distintos niveles, o gradientes de concentración azucarada, variaciones en el tiempo dando lugar a distintas curvas de fermentación. Con esta cinética podremos realizar un seguimiento de todas las levaduras, agrupando aquellas que mantengan una correcta cinética fermentativa, se contemple en ellas un inicio rápido con una fase de latencia corta, y una pronta estabilización para sugerirlas como posibles candidatas para su posterior selección.

Como referencia, para el seguimiento de la fermentación alcohólica, se utilizó mosto estéril sin inoculación de levaduras y mosto con la levadura comercial WAM (apartado 4.1.).

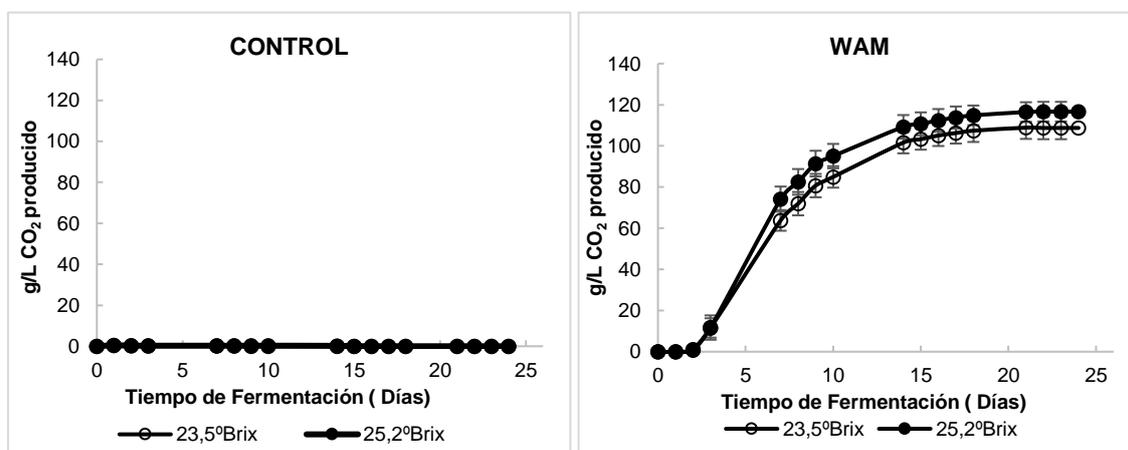


Figura 3. Representación del control negativo y de la cinética fermentativa de la levadura WAM.

Cómo se puede observar en el control negativo, la evolución durante el proceso fermentativo se mantiene estable sin producción de CO₂, por ello el contenido de azúcares será el inicial.

En la gráfica de la levadura comercial WAM, se observa que tiene un correcto vigor fermentativo y a las 72 horas ya ha iniciado su fase exponencial. La fase de latencia es corta, tiene una cinética fermentativa regular y correcta en ambas concentraciones, aunque la producción final de CO₂ tiene una ligera variación, superior en el mosto concentrado.

▪ Levaduras que comparten perfil mtDNA

Seguidamente se muestran las comparaciones entre las cinéticas fermentativas de las levaduras que tienen el mismo perfil mitocondrial (apartado 2.) en el año 2010 y su respectiva del 2012.

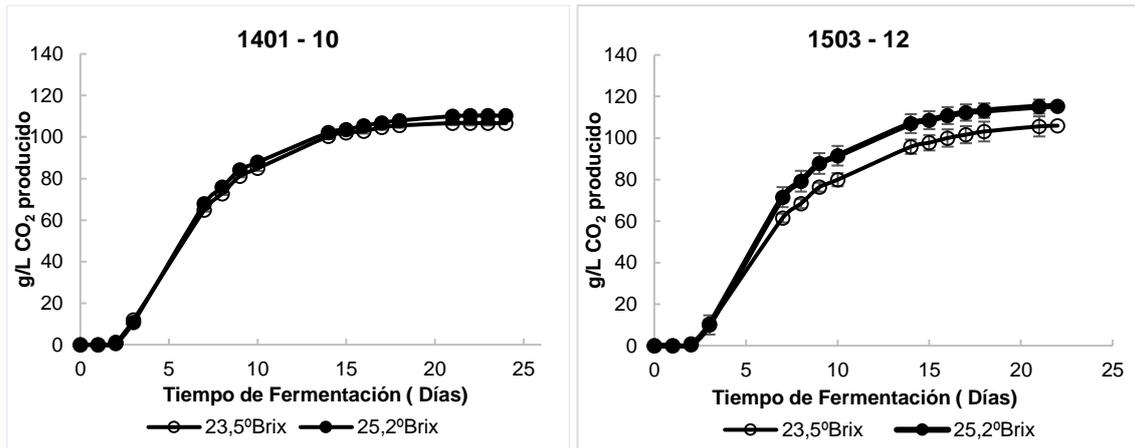


Figura 4. Representación de la cinética fermentativa de las levaduras 1401-10 y 1503-12.

Ambas levaduras representadas en la figura 4, son predominantes en el proceso fermentativo respectivo de cada año, teniendo por ello gran relevancia en las vinificaciones.

El inicio de la fermentación, contemplando el vigor fermentativo en los primeros días, nos revela que el comienzo es muy similar en ambas a la vez que rápido. Durante el transcurso de la fermentación la levadura 1401-10, en las dos concentraciones de azúcar, tiene un buen comportamiento exponencial y la pendiente seguida es correcta, mientras que la levadura 1503-12 se observa una leve desviación entre los dos mostos, dando lugar a un final de fermentación más dispar. La estabilización en la fase estacionaria de la cinética es mucho más extendida en la levadura del 2010, sin embargo la levadura del 2012 aún consume algún azúcar en los últimos días. La selección en este caso solo resultaría interesante de la levadura 1401-10.

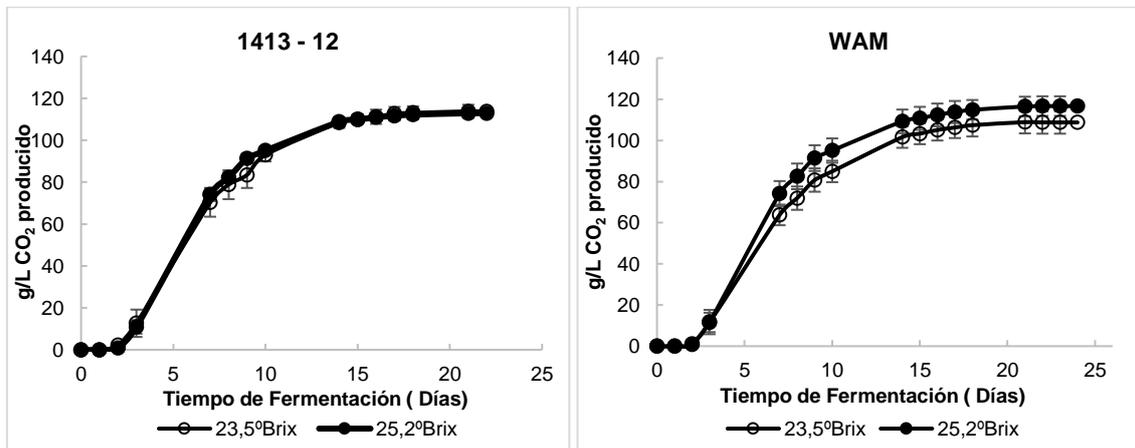


Figura 5. Representación de la cinética fermentativa de las levaduras 1413-12 y WAM.

La cinética fermentativa de las levaduras 1413-12 y la levadura comercial WAM es muy similar. El inicio de fermentación es rápido observando una latencia corta en ambos. La evolución es parecida en ambas levaduras con diferencias más visibles entre las concentraciones de los mostos de la levadura WAM, produciendo una mayor cantidad de CO₂ en el concentrado. La estabilización de la cinética es rápida en ambos casos con un alto rendimiento, logrando un proceso fermentativo eficaz.

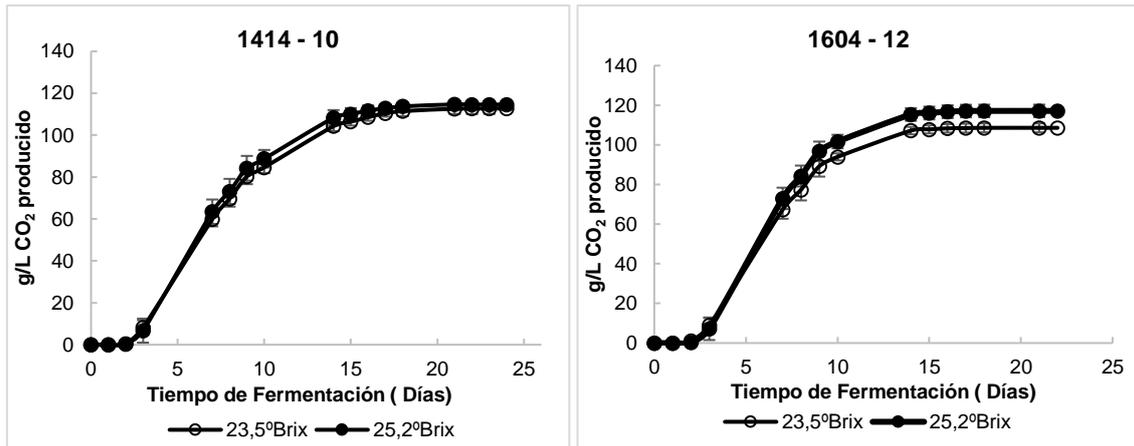


Figura 6. Representación de la cinética fermentativa de las levaduras 1414-10 y 1604-12.

En las levaduras de la figura 6 se puede observar un paralelismo entre ellas, a pesar de tener un inicio de fermentación aparentemente lento, el quinto día ya han manifestado una fase exponencial marcada. Al igual que en el caso anterior tiene una pronta estabilización en los dos casos, y mientras que la levadura 1414-10 en ambas concentraciones logra producir una misma cantidad de CO_2 , la levadura 1604-12 produce mayor cantidad en la inoculada en el mosto concentrado. Por ello la levadura interesante en este caso sería la 1414-10.

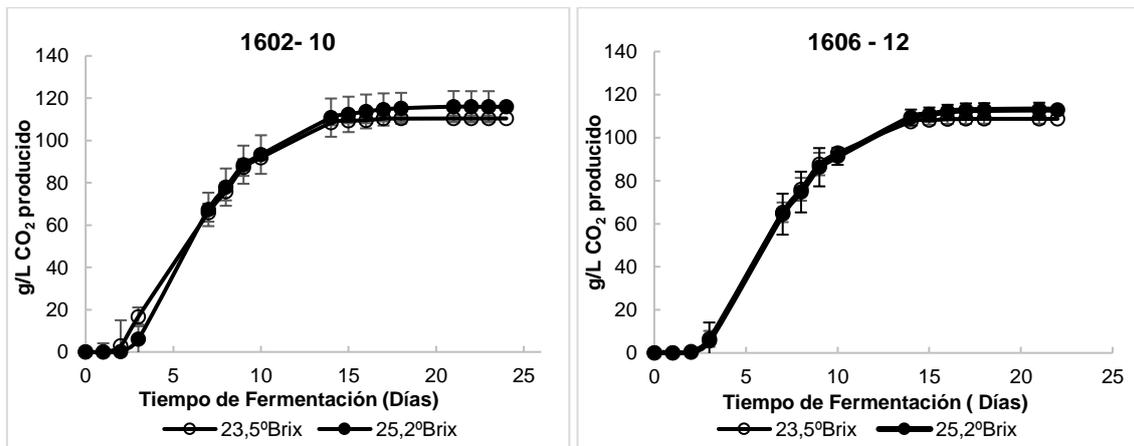


Figura 7. Representación de la cinética fermentativa de las levaduras 1602-10 y 1606-12.

En la figura 7, aunque los arranques son correctos y logran una fase exponencial aceptable, la fase de latencia en estas representaciones es algo más lenta que las anteriores. El final de la fermentación es muy similar teniendo una medida estable durante varios días y logrando un alto rendimiento. Existe una ligera diferencia en el final de fermentación con respecto a la producción de CO_2 en ambas levaduras, algo más notable en la 1602-10, pero sin gran relevancia. En este caso la levadura que podría resultar de interés sería la 1606-12, por su menor diferencia final.

En la figura 8, se realiza una comparación entre dos levaduras que tienen una amplia representación en el proceso fermentativo del año 2012, siendo junto con la levadura 1503 -12 las predominantes en la fermentación.

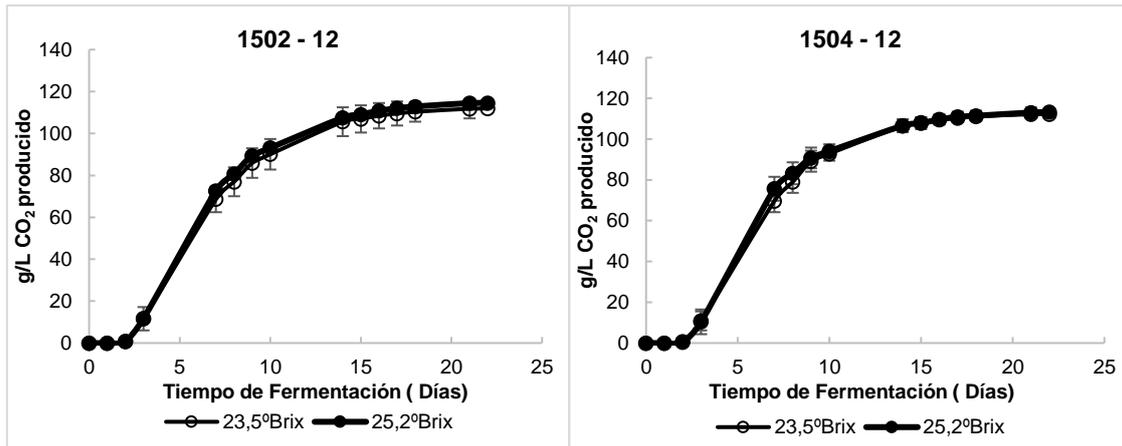


Figura 8. Representación de la cinética fermentativa de las levaduras 1502-12 y 1504-12.

Las levaduras 1502-12 y 1504-12 tienen una cinética casi idéntica desde el inicio hasta el final de fermentación, subrayando la similitud en la producción de CO₂. Tiene una corta fase de latencia, un rápido arranque y rápida fase exponencial, en ambos casos se denota una pronta estabilización y un final de fermentación similar. Ambas poseen una cinética fermentativa adecuada.

Seguidamente estudiaremos la cinética fermentativa del resto de levaduras organizadas según las dos añadas del estudio:

▪ Vendimia 2010

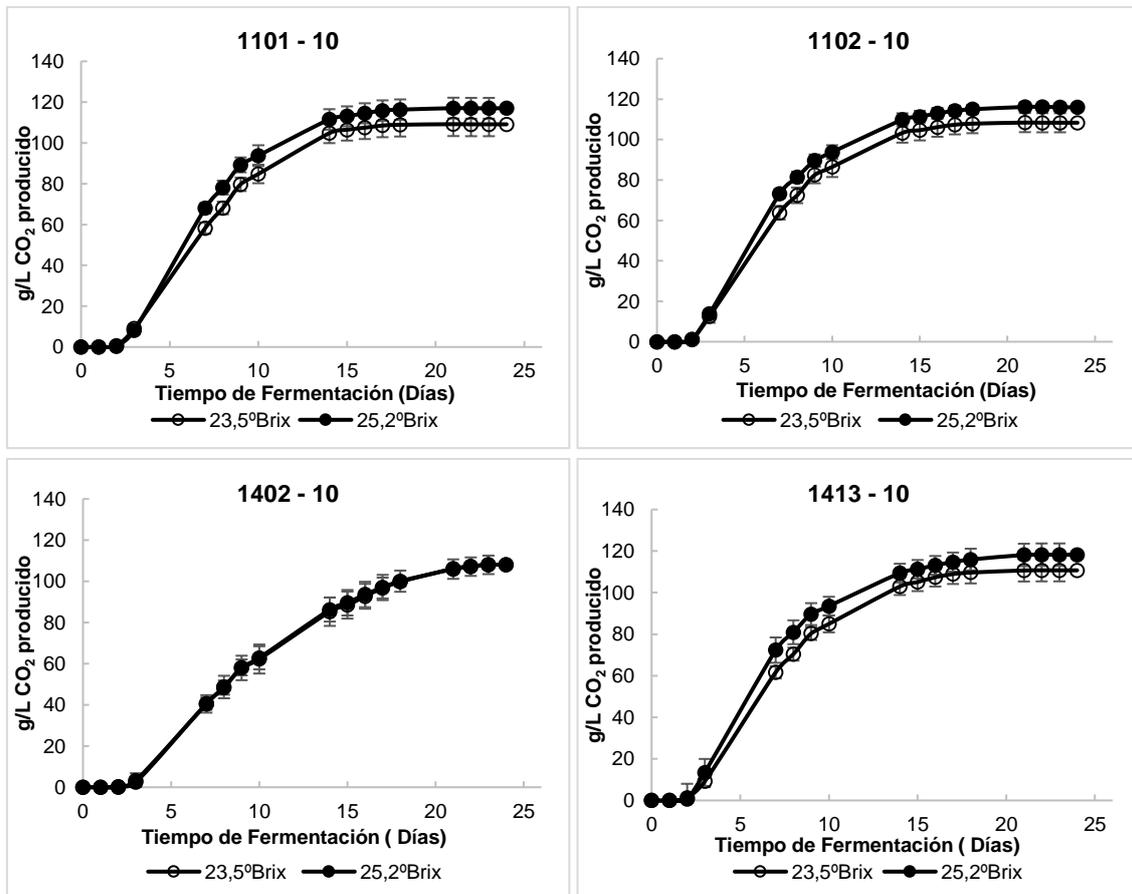


Figura 9. Representación de cinética fermentativa de las levaduras:1101-10,1102-10, 1402-10 y 1413-10.

Entre estas cuatro gráficas de la figura 9 se aprecia una diferencia notable en la levadura 1402-10 tanto de inicio de fermentación como en la evolución y cinética seguida durante el proceso, esta levadura no tiene una correcta cinética ya que la fase de latencia es larga, tiene un arranque difícil y una pendiente más lineal. Las otras 3 levaduras son muy similares, sus fases de latencia son cortas, con una rápida fase exponencial, más marcada en las levaduras 1102-10 y 1413-10, con una estabilización pronta. En los 3 casos se observa una ligera diferencia en ambos medios de concentración distinta, obteniendo una mayor producción de CO₂ en el mosto a 25,2 °Brix.

En este grupo de levaduras no seleccionamos ninguna de las levaduras como posibles candidatas ya que las 3 que mantienen una buena cinética, sus diferencias en el punto final nos influyen en el grado alcohólico final.

▪ Vendimia 2012

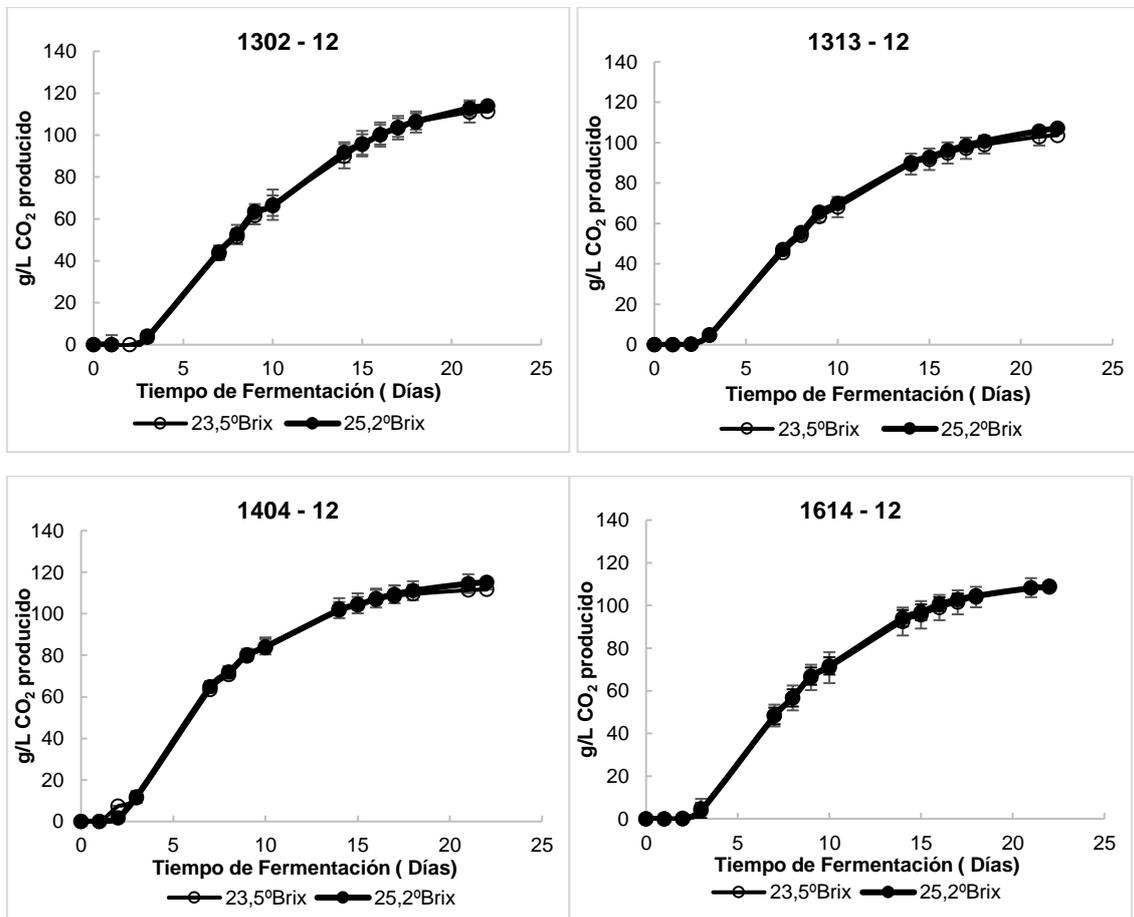


Figura 10. Representación de la cinética fermentativa de las levaduras: 1302-12, 1313-12, 1404-12 y 1614-12.

Las levaduras representadas en la figura 10, aisladas en el año 2012 tienen como característica general la producción similar de CO₂ en ambas concentraciones de los mostos, lo que nos indica la adaptación de la levadura a mostos más ricos en azúcar. Sin embargo, en las levaduras 1302-12, 1313-12 y 1614-12, su fase de latencia es más larga y su crecimiento exponencial más longevo en el tiempo, por lo que se descartarían como posibles candidatas para su selección. La levadura 1404-12 tiene una correcta

cinética, con un crecimiento exponencial rápido y tiene una pronta estabilización, siendo la candidata de este grupo.

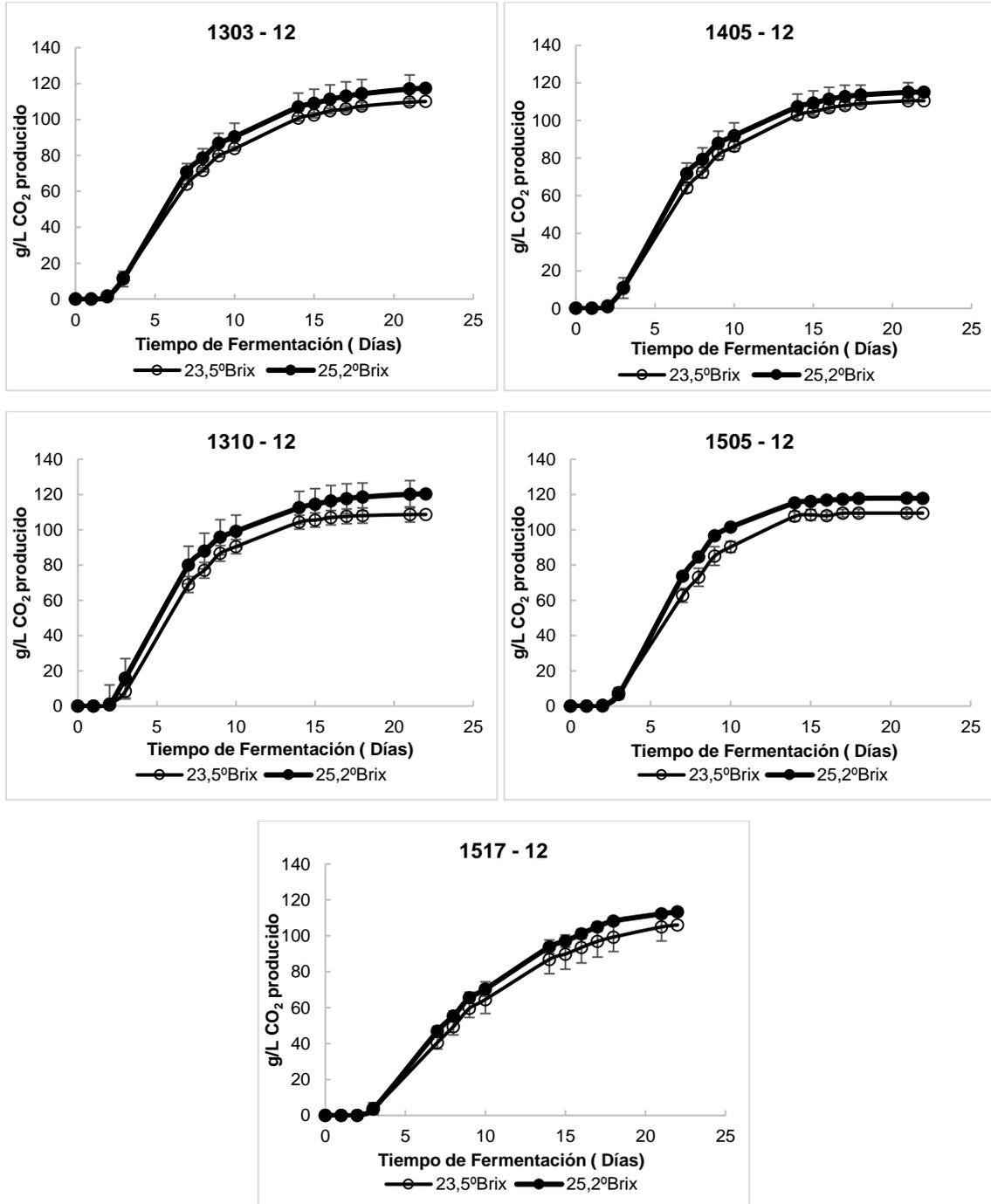


Figura 11. Representación de cinéticas fermentativas de las levaduras: 1405-12, 1303-12, 1310-12, 1505-12 y 1517-12.

En estas levaduras, también del 2012, encontramos una clara diferencia en la 1517-12, por su cinética incorrecta, tiene un inicio lento, una evolución más lineal y tarda mucho en estabilizarse por lo que no se considera una posible candidata. Por otro lado, encontramos las levaduras 1303-12 y 1405-12 que son más parecidas durante su evolución, teniendo parejas las producciones de CO₂ en ambas concentraciones de azúcar, terminando el mosto más azucarado con una mayor producción de CO₂.

En las levaduras 1310-12 y 1505-12, hay una mayor diferencia. La primera tiene un inicio rápido con una fase exponencial rápida pero distinta en ambas concentraciones con un final de fermentación más dispar. En la 1505-12 el inicio es rápido, pero algo menor que en la anterior, logrando una estabilización más pronta y una producción final, aunque distinta, menos pronunciada.

A pesar de que la cinética es correcta en la mayoría de las levaduras de esta vendimia, el punto final es decisivo para nuestra selección, ya que no nos interesa un aumento del grado alcohólico (mayor producción de CO₂) en ambas concentraciones. Las posibles candidatas para su selección por tener una correcta y rápida cinética fermentativa global son: 1401-10 y 1414-10 pertenecientes a los aislados del 2010, y 1404-12, 1413-12, 1502-12, 1504-12 y 1606-12, de los aislados del 2012.

5.2. Parámetros bioquímicos

Tras la determinación de las posibles cepas candidatas por una correcta cinética fermentativa se estudiaron otros parámetros significativos (Anexo I, tabla 1) y determinantes para las características del vino final, que nos ayudarán en una selección más concreta.

5.2.1. Poder fermentativo

El poder fermentativo se analiza mediante un tratamiento de datos estadístico global, por vendimia y otro más específico, por cada levadura. El análisis por vendimia nos muestra diferencias significativas en el aumento del grado alcohólico en mostos con mayor concentración de azúcar, mostrando un incremento en el grado alcohólico final significativo en ambas vendimias: 2010 ($p < 0,05$) y 2012 ($p < 0,005$) (Anexo IV, figura a).

Por otro lado, se realiza un análisis individual de las levaduras, analizándolas por separado, en este caso sólo las levaduras 1401-10 y 1604-12 muestran una diferencia significativa en el grado alcohólico final obtenido. Si bien, esto puede deberse a que se necesitan más repeticiones para el tratamiento estadístico de datos.

Tabla 2. Datos medios de grado alcohólico final de las levaduras del estudio con el error.

Levaduras	% Etanol (v/v)	Levaduras	% Etanol (v/v)
1101 -10	13,6 ± 0,7	1404-12	14,0 ± 0,6
1101*-10	14,6 ± 0,6	1404*-12	14,4 ± 0,6
1102 -10	13,5 ± 0,6	1405-12	13,8 ± 0,2
1102*-10	14,5 ± 0,3	1405*-12	14,4 ± 0,6
1401-10	13,3 ± 0,1	1413-12	14,2 ± 0,4
1401*-10	13,8 ± 0,1	1413*-12	14,1 ± 0,2
1402-10	13,5 ± 0,2	1502-12	14,0 ± 0,6
1402*-10	13,5 ± 0,7	1502*-12	14,3 ± 0,1
1413-10	13,8 ± 0,7	1503-12	13,2 ± 0,6
1413*-10	14,8 ± 0,7	1503*-12	14,4 ± 0,4
1414-10	14,1 ± 0,3	1504-12	14,0 ± 0,2
1414*-10	14,3 ± 0,2	1504*-12	14,2 ± 0,3

1602-10	13,8 ± 0,2	1505-12	13,7 ± 0,3
1602*-10	14,5 ± 0,9	1505*-12	14,7 ± 0,7
1302 -12	13,9 ± 0,6	1517-12	13,3 ± 1,0
1302*-12	14,3 ± 0,5	1517*-12	14,2 ± 0,3
1303 -12	13,8 ± 0,2	1604-12	13,6 ± 0,3
1303*-12	14,7 ± 1,0	1604* -12	14,7 ± 0,4
1310 -12	13,6 ± 0,5	1606 - 12	13,6 ± 0,4
1310* -12	15,0 ± 1,0	1606*-12	14,1 ± 0,5
1313 -12	13,0 ± 0,5	1614-12	13,6 ± 0,6
1313*-12	13,4 ± 1,6	1614*-12	13,6 ± 0,2

* Indica las levaduras inoculadas en el mosto concentrado (25,2 °Brix).

Las dos levaduras anteriormente citadas, 1401-10 y 1604-12, tienen un grado alcohólico final de: 13,3 ± 0,1 y 13,6 ± 0,3 para mosto sin concentrar, y 13,8 ± 0,1, 14,7 ± 0,4 para mosto concentrado, respectivamente. Al tener variación significativa se descartarán como posibles candidatas para la selección.

Además de esos 2 casos estadísticamente significativos, también existen otras levaduras que aumentan el grado que también se descartarían, quedando como candidatas las siguientes excepciones: 1402-10, 1414-10, 1302-12, 1313-12, 1404-12, 1405-12, 1413-12, 1502-12, 1504-12 y 1614-12.

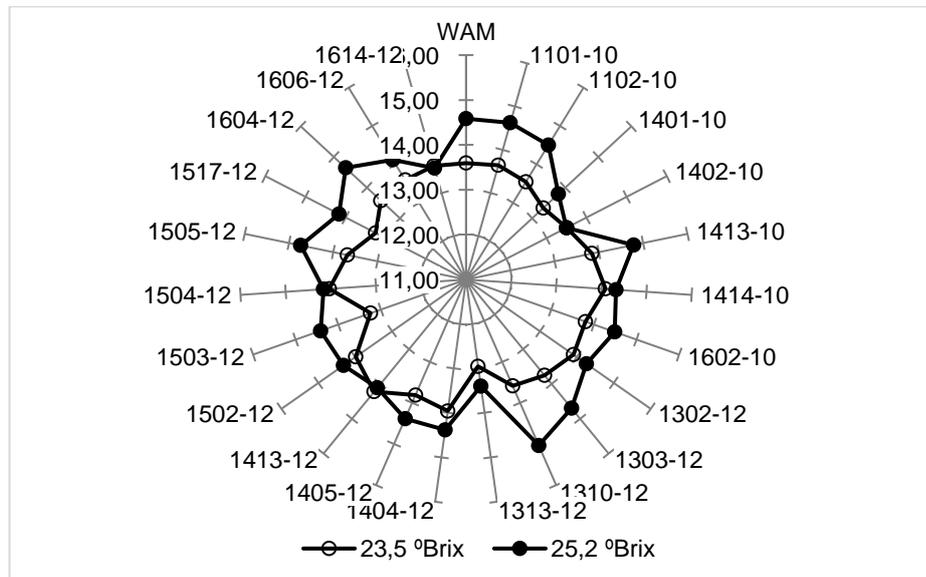


Figura 12. Representación del grado alcohólico final obtenido en las distintas levaduras del 2010 y 2012.

Tras el estudio del poder fermentativo, las levaduras que continúan siendo posibles candidatas por no aumentar el grado alcohólico y mantener una correcta cinética fermentativa son: 1414-10 del 2010, y 1404-12, 1413-12, 1502-12 y 1504-12, de los aislados del 2012.

5.2.2. pH

El pH de todas las muestras se encuentra en un rango de valores admitidos con diferencias mínimas entre las levaduras, oscilando los valores entre $3,30 \pm 0,1$ y $3,44 \pm 0,2$.

El análisis estadístico realizado por vendimia muestra que la variación en el pH en mostos con elevada concentración de azúcar no resulta estadísticamente significativa ($p > 0,05$), por lo que todas las levaduras serían válidas respecto a este parámetro (Anexo IV, figura b)).

5.2.3. Azúcares reductores:

En primer lugar, se estandarizó el método de análisis de azúcares. Se realizó una validación del Rebelein clásico y poder sustituirlo así, por el método DNS. Éste método se utilizó para optimizar nuestro trabajo debido a la amplia cantidad de muestras implicadas.

Se realizaron rectas de calibrado para cada uno de los métodos con patrones de agua y glucosa (diluciones seriadas desde 10 g/L hasta 0 g/L, agua destilada) y con una disolución hidroalcohólica que pretende simular al vino cuyas características eran: 13% vol. etanol, una acidez total de 4,6 g/L en ácido tartárico y un pH de 3.

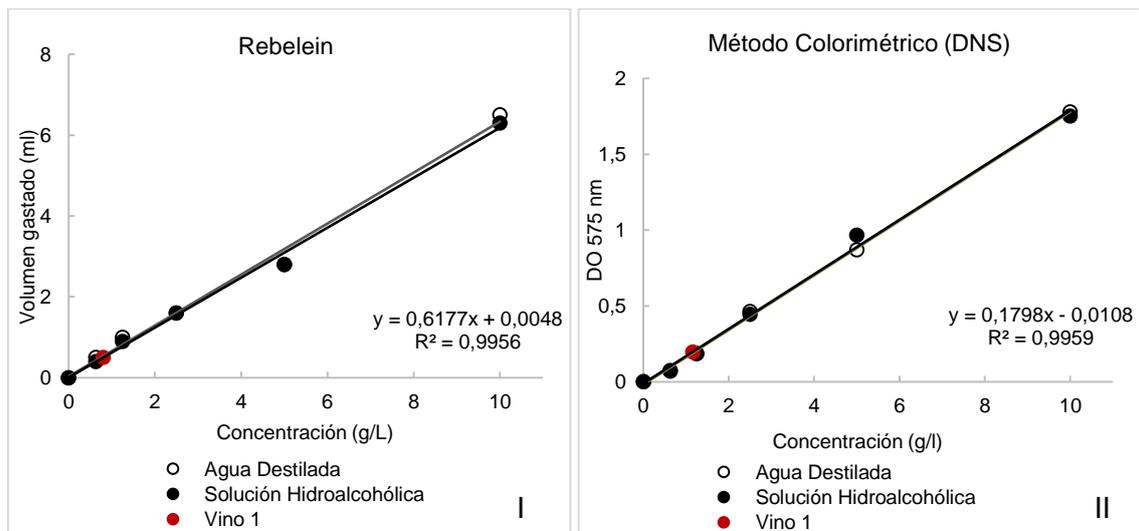


Figura 13. Recta de calibrado por comparación de dos métodos de análisis de azúcares residuales. En "I" método tradicional Rebelein por valoración, en "II" método DNS por espectrofotometría.

En el método Rebelein las rectas de calibrado, con los solventes previamente citados, son casi iguales. Con una muestra de vino al azar, medimos los gramos de azúcar por litro que tiene y lo introducimos dentro de la recta. Observamos que el punto se encuentra dentro de la recta. En el método DNS ambas rectas también son casi iguales y la muestra de vino también pertenece a ésta.

Para conocer la correlación entre los dos métodos realizamos, con muestras de vino aleatorias, una nueva recta de calibrado que nos relacione directamente los gramos por litro de vino por cada método.

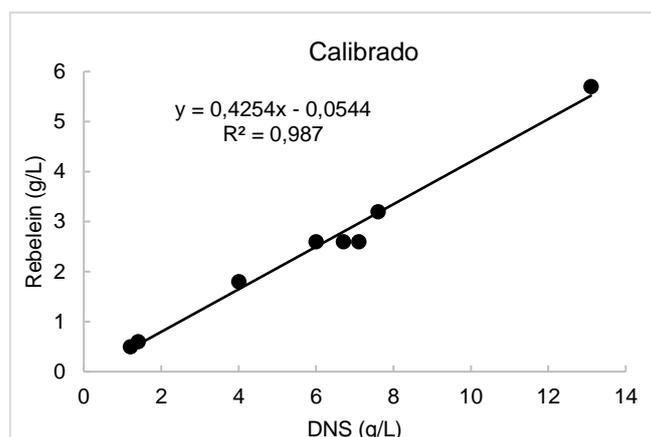


Figura 14. Recta de calibrado comparación métodos de análisis de azúcares residuales

Los valores que obtenemos con el método de DNS son 2,4 veces mayores que los obtenidos por Rebelein (Rebelein \cdot 2,4 = DNS (en nuestro ensayo)), pero se trata de una relación lineal por lo que se valida el método y será adaptado para optimizar nuestro ensayo (Anexo III, tabla 2).

Según el reglamento de la D.O. Rueda (Orden APA/ 2059/2002,V(2)) aquellos matraces cuyos azúcares superan los 4 g/L no se considerarán como vinos secos. Estos vinos probablemente han sufrido una parada de fermentación por una disminución de la actividad metabólica de las levaduras, entre otros factores, ocasionado por: una composición inicial del mosto, excesiva concentración de azúcares, acumulación de desechos o metabolitos tóxicos para la célula como el etanol (Suárez Lepe, 1997).

Nuestro objetivo es determinar las levaduras que son capaces de fermentar dejando los vinos secos.

Tabla 3. Datos medios de los azúcares residuales finales de las levaduras y su error

Levaduras	Azúcares Residuales Rebelein (g/L)	Levaduras	Azúcares Residuales Rebelein (g/L)
1101 -10	1,9 \pm 0,1	1404-12	2,0 \pm 0,1
1101*-10	1,6 \pm 0,1	1404*-12	2,4 \pm 0,2
1102 -10	1,8 \pm 0,0	1405-12	2,1 \pm 0,4
1102*-10	1,7 \pm 0,1	1405*-12	2,2 \pm 0,2
1401-10	2,0 \pm 0,2	1413-12	1,9 \pm 0,1
1401*-10	2,6 \pm 0,1	1413*-12	2,2 \pm 0,1
1402-10	3,4 \pm 0,4	1502-12	1,9 \pm 0,1
1402*-10	3,5 \pm 1,1	1502*-12	2,2 \pm 0,2
1413-10	1,9 \pm 0,1	1503-12	2,2 \pm 0,3
1413*-10	2,2 \pm 0,1	1503*-12	2,2 \pm 0,1
1414-10	2,0 \pm 0,0	1504-12	2,0 \pm 0,1
1414*-10	2,0 \pm 0,1	1504*-12	2,5 \pm 0,3
1602-10	1,9 \pm 0,2	1505-12	1,9 \pm 0,2
1602*-10	1,8 \pm 0,1	1505*-12	2,3 \pm 0,1
1302 -12	2,1 \pm 0,2	1517-12	3,8 \pm 1,0
1302*-12	4,5 \pm 1,0	1517*-12	4,6 \pm 0,8

1303 -12	2,2 ± 0,3	1604-12	1,5 ± 0,1
1303*-12	2,4 ± 0,2	1604* -12	2,1 ± 0,2
1310 -12	1,7 ± 0,0	1606-12	1,7 ± 0,1
1310* -12	2,3 ± 0,1	1606*-12	1,9 ± 0,1
1313-12	3,0 ± 1,1	1614-12	3,3 ± 0,2
1313*-12	6,6 ± 0,4	1614*-12	5,5 ± 0,6

* Indica las levaduras inoculadas en el mosto concentrado (25,2 °Brix).

La mayoría de las levaduras consiguen dejar los vinos secos, hay 4 excepciones que en los mostos concentrados no llegan a consumir los azúcares necesarios para ser considerados secos. Estas levaduras son: 1302-12, 1313-12, 1517-12 y 1614-12, dejando $4,5 \pm 1,0$, $6,6 \pm 0,4$, $4,6 \pm 0,8$ y $5,5 \pm 0,6$ g/L de azúcares respectivamente.

Teniendo en cuenta los azúcares residuales de las candidatas seleccionadas anteriormente, todas ellas dejan los vinos secos, por lo que se mantienen en este parámetro las levaduras: 1414-10, 1404-12, 1413-12, 1502-12 y 1504-12.

5.2.4. Glicerol

Para poder validar el cálculo del glicerol que describe el fabricante, realizamos una recta patrón. El procedimiento seguido se describe en el apartado 4.5.4.

Tras introducir los datos obtenidos en la recta patrón y en la ecuación que recomienda el fabricante obtenemos, con una muestra de vino al azar, 9,32 g/L y 9,22 g/L respectivamente; dado que el error es mínimo se determina que existe una relación lineal entre la absorbancia y la concentración y que ambos cálculos son válidos. Las muestras de cada matraz se introducen los pocillos obteniendo placas con distintas coloraciones (Figura 14).

El tratamiento estadístico de datos por vendimia, en este parámetro muestra diferencias significativas en ambas vendimias entre los vinos con distinto °Brix (Anexo IV, figura a)). En el análisis realizado por levadura obtenemos estadísticamente significativas las levaduras: 1413-10, 1310-12, 1313-12. Aunque solo obtenemos diferencias significativas en tres cepas, no implica que el resto no sean influyentes, esto se debe a que el tratamiento se realiza con triplicados y no con una muestra más amplia.



Figura 14 . Test de glicerol observado a finalizar la prueba. En la columna 1: medidas del estándar, en las columnas consecutivas (2-8) pruebas de las levaduras (A, B, C: vino sin concentrar; D, E: vino concentrado).

Tabla 4. Datos medios del contenido en glicerol en g·L⁻¹ con su respectivo error.

Levaduras	Glicerol (g/L)	Levaduras	Glicerol (g/L)
1101 -10	6,8 ± 0,2	1404-12	4,7 ± 0,2
1101*-10	9,1 ± 0,1	1404*-12	4,7 ± 0,2
1102 -10	4,3 ± 0,3	1405-12	4,4 ± 0,2
1102*-10	7,4 ± 0,1	1405*-12	9,7 ± 0,1
1401-10	7,0 ± 0,3	1413-12	7,6 ± 0,2
1401*-10	7,3 ± 0,1	1413*-12	6,0 ± 0,2
1402-10	3,3 ± 0,9	1502-12	5,8 ± 0,3
1402*-10	6,7 ± 0,2	1502*-12	13,3 ± 0,1
1413-10	3,2 ± 0,2	1503-12	10,0 ± 0,1
1413*-10	10,9 ± 0,2	1503*-12	6,6 ± 0,3
1414-10	6,0 ± 0,1	1504-12	6,1 ± 0,1
1414*-10	6,3 ± 0,1	1504*-12	7,7 ± 0,1
1602-10	5,6 ± 0,2	1505-12	4,1 ± 0,2
1602*-10	5,2 ± 0,1	1505*-12	3,8 ± 0,1
1302 -12	6,5 ± 0,1	1517-12	3,8 ± 0,3
1302*-12	5,1 ± 0,1	1517*-12	8,1 ± 0,4
1303 -12	5,7 ± 0,5	1604-12	7,2 ± 0,1
1303*-12	4,7 ± 0,2	1604* -12	10,7 ± 0,5
1310 -12	2,3 ± 0,2	1606-12	5,5 ± 0,2
1310* -12	7,6 ± 0,2	1606*-12	6,9 ± 0,1
1313-12	1,4 ± 0,1	1614-12	6,9 ± 0,4
1313*-12	9,8 ± 0,1	1614*-12	9,9 ± 0,1

* Indica las levaduras inoculadas en el mosto concentrado (25,2 °Brix).

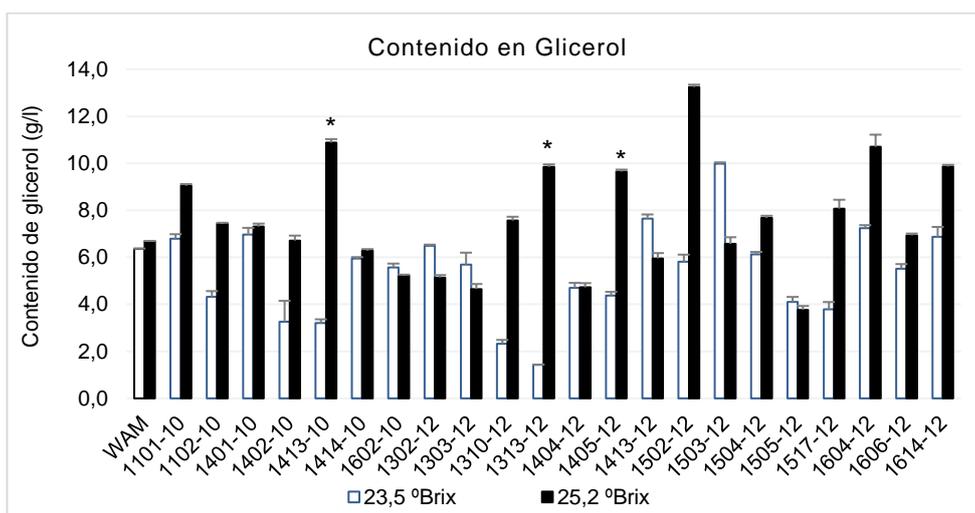


Figura 15. Contenido en glicerol de las cepas del estudio en ambas concentraciones. * Indica los puntos con diferencias estadísticamente significativas entre ambas concentraciones de azúcares ($p < 0,05$).

El contenido de glicerol de los vinos dependerá de las características que queramos que tenga, más o menos glicérico, por lo que en este parámetro cualquiera de las levaduras sería válida.

Finalmente se realiza una clasificación de las levaduras atendiendo a los parámetros bioquímicos relevantes, etanol y glicerol.

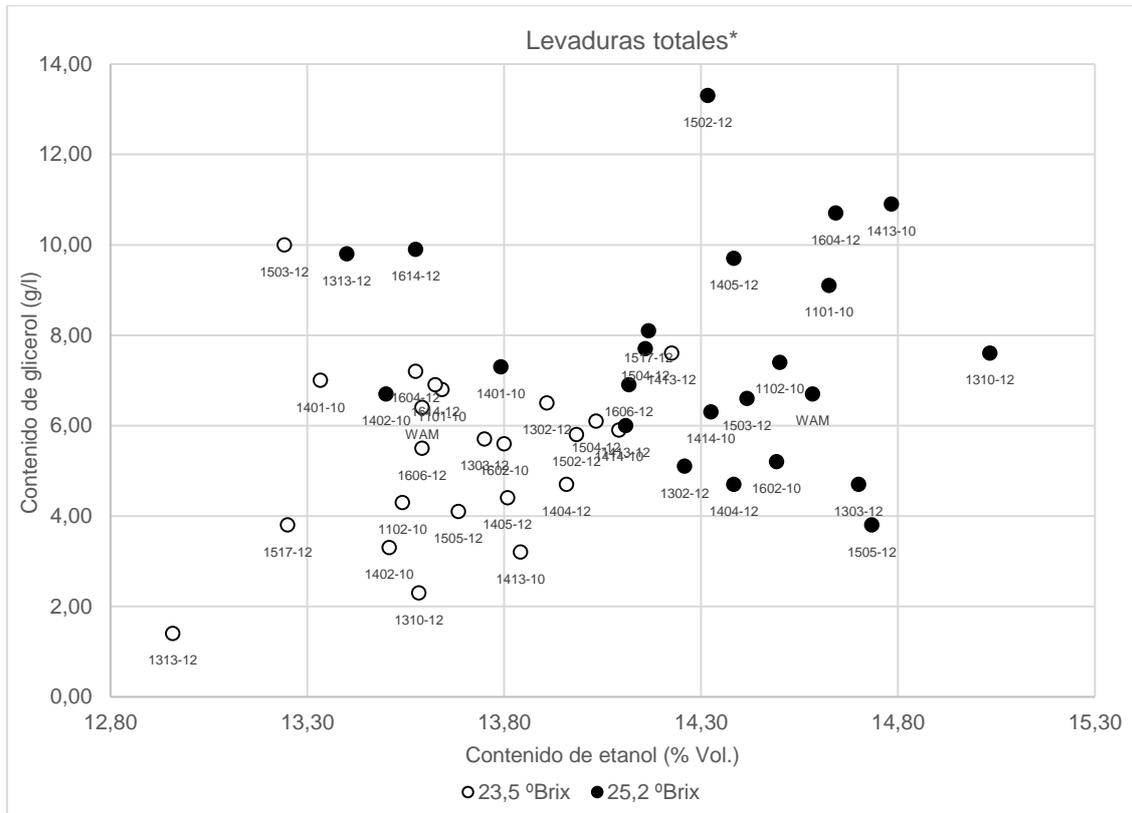


Figura 16. Distribución de las levaduras según sus contenidos en etanol y glicerol. *Indica el desglose por vendimias en Anexo IV, figuras c) y d).

En la figura 16 se observa cómo entre todas las cepas de levaduras del estudio, existen grupos que tienen características similares en la producción de los metabolitos significativos, etanol y glicerol. También se aprecia que la gran mayoría de las levaduras que fermentan en los mostos concentrados tienen un mayor grado alcohólico, salvo excepciones. Como no es de nuestro interés el aumento del etanol a distintas concentraciones de azúcar, tan sólo se tendrán en cuenta aquellas levaduras que se encuentren próximas a los 14 %vol., puesto que no resulta interesante una graduación más alta en los vinos blancos. Las levaduras encontradas dentro de este rango son: 1401-10, 1402-10, 1302-12, 1313-12, 1413-12, 1504-12, 1517-12, 1606-12 y 1614-12, aunque podría ampliarse si la graduación que nos interesa es más alta.

Tras los resultados obtenidos podemos proponer las levaduras 1414-10, 1404-12 y 1502-12 como candidatas potenciales ya que cumplen los requisitos de cinética, azúcares y glicerol adecuados, a pesar de que el grado alcohólico se aproxime más a altas cantidades.

Como candidatas viables encontramos las levaduras **1413-12 y 1504-12** que en todos los parámetros se adaptarían más a nuestras necesidades. Éstas podrían seleccionarse y aislarse por su correcta y rápida cinética fermentativa, por conseguir vinos secos, por no aumentar el grado alcohólico final, a pesar de tener mayor cantidad de azúcar en uno de los mostos, y porque el contenido en glicerol se encuentra dentro de los rangos marcados.

6. CONCLUSIONES

Tras la realización de estos ensayos los resultados obtenidos se resumen en las siguientes conclusiones:

- Se han detectado como parámetros de interés poder fermentativo y el glicerol de las levaduras según el medio en el que se encuentren, mostrando diferencias significativas entre ambas concentraciones de azúcar.
- En este estudio se han seleccionado las levaduras potencialmente viables para solucionar el problema de la influencia del cambio climático en el aumento del grado alcohólico, las cepas **1413-12** y **1504-12** las que han aportado mejores datos analíticos y comportamientos similares.
 - Se evaluó la cinética fermentativa, alcanzando en ambas una correcta fermentación con una fase corta de latencia, una regularidad fermentativa y una pronta estabilización.
 - El agotamiento de los azúcares residuales garantiza un final de fermentación, consiguiendo en nuestras microvinificaciones que ambos vinos están secos (< 4g/L).
 - El grado alcohólico alcanzado en las microvinificaciones se encuentra en torno a 14%vol. en ambas concentraciones. Esto indica que aun teniendo tener mayor cantidad de azúcar inicial no produce mayor cantidad de etanol, sino que el metabolismo deriva hacia la producción de otros compuestos.

La selección y estudio de cepas autóctonas de las bodegas nos aporta beneficios para asegurar un buen proceso fermentativo, conservando así las propiedades de cada *terroir* y conseguir vinos de mayor calidad. Por ello sería interesante continuar este trabajo con un mayor estudio de estas cepas, realizado más pruebas relevantes y vinificaciones en bodega que nos ayuden a conocer el comportamiento de cada una de las cepas.

BIBLIOGRAFÍA

Abad, A.E.,(2006). Selección de levaduras autóctonas para la elaboración de vinos tintos para bodegas y viñedos de Trujillo S.L. Departamento de tecnología de los alimentos. Universidad politécnica de Madrid.

Attfield, P.V., (1997). Stress tolerance. The key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nature Biotechnology* 15, 1351–1357.

BOE núm. 192. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Reglamento de la Denominación de Origen «Rueda» y de su Consejo Regulador Anexo II & Anexo III, Capítulo III, de la elaboración (2003).

Borneman, A.R., Chambers, P.J., and Pretorius, I.S. (2007) Yeast systems biology: modelling the winemaker's art. *Trends Biotechnol* 25: 349–355.

Cray, J.A., Bell, A.N.W., Bhaganna, P., Mswaka, A.Y., Timson, D.J. and Hallsworth, J.E. (2013) The biology of habitat dominance; can microbes behave as weeds? *Microb Biotechnol* 6: 453–492

Dequin, S. and Casaregola, S. (2011) The genome of fermentative *Saccharomyces*. *C R Biol* 334, 687–693.

Di Maio, S., Polizzotto, G., Di Gangi, E., Foresta, G., Genna, G., Verzera, A., Oliva, D. (2012). Biodiversity of indigenous *Saccharomyces* populations from old wineries of South-Eastern Sicily (Italy): Preservation and economic potential. *PLoS ONE*, 7(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030428>

Díez de Betencourt, C. A. y Burdiel Frontelo, J. L. (1972): *Rev. Agroquím. Tecnol., Aliment.*, 12 (4), 527-532

Duarte Alonso A., O'Neill M.A., (2011) "Climate change from the perspective of Spanish wine growers: a three-region study", *British Food Journal*, Vol. 113 Issue: 2, pp.205-221, <https://doi.org/10.1108/00070701111105303>

E-VitiClimate (2012). Lifelong Learning Project, E-VitiClimate. EuroProject Lifelong Learning Programme. Available at: (<http://www.eviticlimate.eu>) (accessed 22.02.18.).

García Barceló, J. (1990). Técnicas analíticas para vinos. TABLA XVI páginas 34 - 35.

García, M., Greetham, D., Wimalasena, T., Phister, T., Cabellos, J. and Arroyo, T. (2016), The phenotypic characterization of yeast strains to stresses inherent to wine fermentation in warm climates. *J Appl Microbiol*, 121: 215-233. doi:10.1111/jam.13139

Goold, H. D., Kroukamp, H., Williams, T. C., Paulsen, I. T., Varela, C., & Pretorius, I. S. (2017). Yeast's balancing act between ethanol and glycerol production in low-alcohol wines. *Microbial Biotechnology*, 10(2), 264–278. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12488>

Gray, W. D. (1941). Studies on the alcohol tolerance of yeasts. *Journal of Bacteriology*, 42(5), 561–574.

Hannah, L., Roehrdanz, P., Ikegami, M., Shepard, A., Shaw, M., Tabo, G., Zhi, L., Marquet, P., Hijmans, R., (2013). Climate change, wine, and conservation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110 (17), 6907–6912.

Jiménez-Martí, E., Zuzuarregui, A., Gomar-Alba, M., Gutiérrez, D., Gil, C., & del Olmo, M. (2011). Molecular response of *Saccharomyces cerevisiae* wine and laboratory strains to high sugar stress conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 211–220. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2010.12.023>

Jiménez, J., & Benítez, T. (1986). Characterization of wine yeasts for ethanol production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 25 (2), 150–154. <https://doi.org/10.1007/BF00938939>

Jolly, N.P., Varela, C., and Pretorius, I.S. (2014) Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Res* 14: 215–237.

Lorenz Miller, G. (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *ANALYTICAL CHEMISTRY*, VOL. 31, NO. 3, p.426-428, 1959.

Mira de Orduña, R. (2010) Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Res Int* 43, 1844–1855.

Mozell, M. R., & Thach, L. (2014). The impact of climate change on the global wine industry: Challenges & solutions, 3, 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.wep.2014.08.001>

RESOLUCIÓN OIV-OENO 370-2012. Directrices para la caracterización de levaduras de vino del género *Saccharomyces* aisladas de ambientes vitivinícolas

RESOLUCIÓN OIV-OENO 466-2012. Modificación Del Método De Evaluación Del Contenido En Azúcares De Los Mostos , De Los Mostos Concentrados Y Del Azúcar De Uva Mediante Refractometría, 1–20.

Pfeiffer, T., and Morley, A. (2014) An evolutionary perspective on the Crabtree effect. *Front Mol Biosci* 1: 1–6.

Pretorius, I.S. (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16: 675–729.

Pretorius, I.S. (2016) Synthetic genome engineering forging new frontiers for wine yeast. *Crit Rev Biotechnol*. 2016: 1–25

Radler, F., & Schtitz, H. (1982). Glycerol production of various strains of *Saccharomyces*. *Annual Meeting of the American Society of Enologists*, 5–9.

Rankine, B. C. (1899). Quantitative Differences in Products of Fermentation by Different Strains of Wine Yeasts. *Australian Journal Of Applied Science*, (1953).

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdiou, D. (2006). *Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications*. *Handbook of Enology (Vol. 2)* (1982). <https://doi.org/10.1002/0470010398>

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdiou, D. (2006). *Handbook of Enology, The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatments: Second Edition*. *Handbook of Enology, The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatments: Second Edition (Vol. 2)* (1982). <https://doi.org/10.1002/0470010398>

Salvadó, Z., Chiva, R., Rodríguez-Vargas, S., Rández-Gil, F., Mas, A. and Guillamon, J.M. (2008) Proteomic evolution of wine yeast during the first hours of fermentation. *FEMS Yeast Res* 8, 1137–1146

Salmón JM; Vincent O; Mauricio IC; Bely M; Barre P (1993). Sugar transport inhibition and apparent loss of activity in *Saccharomyces cerevisiae* as a major limiting factor of enological fermentations. *Am J Enol Vit*, 44: 127-133.

Suárez Lepe, J.A. (1997). *Levaduras Vínicas. Funcionalidad y uso en bodegas*. Editorial MundiPrensa. Madrid.

Suárez Lepe, J.A, Iñigo Leal, B. *Microbiología enológica: fundamentos de vinificación*. 3rd ed. Madrid: Mundi - Prensa; 2004.

Tofalo, R., Chaves-Lopez, C., Di Fabio, F., Schirone, M., Felis, G.E., Torriani, S., Paparella, A. and Suzzi, G. (2009) Molecular identification and osmotolerant profile of wine yeasts that ferment a high sugar grape must. *Int J Food Microbiol*

Varela, C., Dry, P.R., Kutyna, D.R., Francis, I.L., Henschke, P.A., Curtin, C.D., and Chambers, P.J. (2015) Strategies for reducing alcohol concentration in wine. *Aust J Grape Wine Res* 21: 670–679.

ANEXO I. Datos parámetros bioquímicos levaduras 2010/2012

Tabla 1. Resumen de datos de parámetros bioquímicos de las cepas utilizadas en el trabajo.

Levaduras	pH	% Etanol (v/v)	Azúcares Residuales Rebelein (g/L)	Glicerol (g/L)
WAM	3,44 ± 0,01	13,6 ± 0,7	2,0 ± 0,1	6,4 ± 0,0
WAM*	3,45 ± 0,02	14,6 ± 0,6	2,4 ± 0,5	6,7 ± 0,0
1101 -10	3,44 ± 0,01	13,6 ± 0,7	1,9 ± 0,1	6,8 ± 0,2
1101*-10	3,48 ± 0,03	14,6 ± 0,6	1,6 ± 0,1	9,1 ± 0,1
1102 -10	3,57 ± 0,27	13,5 ± 0,6	1,8 ± 0,0	4,3 ± 0,3
1102*-10	3,44 ± 0,04	14,5 ± 0,3	1,7 ± 0,1	7,4 ± 0,1
1401-10	3,41 ± 0,01	13,3 ± 0,1	2,0 ± 0,2	7,0 ± 0,3
1401*-10	3,43 ± 0,02	13,8 ± 0,1	2,6 ± 0,1	7,3 ± 0,1
1402-10	3,45 ± 0,05	13,5 ± 0,2	3,4 ± 0,4	3,3 ± 0,9
1402*-10	3,34 ± 0,07	13,5 ± 0,7	3,5 ± 1,1	6,7 ± 0,2
1413-10	3,44 ± 0,02	13,8 ± 0,7	1,9 ± 0,1	3,2 ± 0,2
1413*-10	3,44 ± 0,02	14,8 ± 0,7	2,2 ± 0,1	10,9 ± 0,2
1414-10	3,41 ± 0,01	14,1 ± 0,3	2,0 ± 0,0	6,0 ± 0,1
1414*-10	3,44 ± 0,02	14,3 ± 0,2	2,0 ± 0,1	6,3 ± 0,1
1602-10	3,41 ± 0,02	13,8 ± 0,2	1,9 ± 0,2	5,6 ± 0,2
1602*-10	3,46 ± 0,02	14,5 ± 0,9	1,8 ± 0,1	5,2 ± 0,1
1302 -12	3,36 ± 0,03	13,9 ± 0,6	2,1 ± 0,2	6,5 ± 0,1
1302*-12	3,38 ± 0,03	14,3 ± 0,5	4,5 ± 1,0	5,1 ± 0,1
1303 -12	3,41 ± 0,05	13,8 ± 0,2	2,2 ± 0,3	5,7 ± 0,5
1303*-12	3,41 ± 0,01	14,7 ± 1,0	2,4 ± 0,2	4,7 ± 0,2
1310 -12	3,37 ± 0,00	13,6 ± 0,5	1,7 ± 0,0	2,3 ± 0,2
1310* -12	3,43 ± 0,03	15,0 ± 1,0	2,3 ± 0,1	7,6 ± 0,2
1313-12	3,35 ± 0,05	13,0 ± 0,5	3,0 ± 1,1	1,4 ± 0,1
1313*-12	3,36 ± 0,06	13,4 ± 1,6	6,6 ± 0,4	9,8 ± 0,1
1404-12	3,38 ± 0,02	14,0 ± 0,6	2,0 ± 0,1	4,7 ± 0,2
1404*-12	3,42 ± 0,02	14,4 ± 0,6	2,4 ± 0,2	4,7 ± 0,2
1405-12	3,36 ± 0,01	13,8 ± 0,2	2,1 ± 0,4	4,4 ± 0,2
1405*-12	3,42 ± 0,03	14,4 ± 0,6	2,2 ± 0,2	9,7 ± 0,1
1413-12	3,41 ± 0,03	14,2 ± 0,4	1,9 ± 0,1	7,6 ± 0,2
1413*-12	3,43 ± 0,02	14,1 ± 0,2	2,2 ± 0,1	6,0 ± 0,2
1502-12	3,37 ± 0,02	14,0 ± 0,6	1,9 ± 0,1	5,8 ± 0,3
1502*-12	3,40 ± 0,03	14,3 ± 0,1	2,2 ± 0,2	13,3 ± 0,1
1503-12	3,39 ± 0,03	13,2 ± 0,6	2,2 ± 0,3	10,0 ± 0,1
1503*-12	3,38 ± 0,03	14,4 ± 0,4	2,2, ± 0,1	6,6 ± 0,3
1504-12	3,36 ± 0,01	14,0 ± 0,2	2,0 ± 0,1	6,1 ± 0,1
1504*-12	3,41 ± 0,01	14,2 ± 0,3	2,5 ± 0,3	7,7 ± 0,1
1505-12	3,41 ± 0,01	13,7 ± 0,3	1,9 ± 0,2	4,1 ± 0,2

1505*-12	3,41 ±0,02	14,7 ± 0,7	2,3 ± 0,1	3,8 ± 0,1
1517-12	3,30 ± 0,10	13,3 ± 1,0	3,8 ± 1,0	3,8 ± 0,3
1517*-12	3,32 ±0,04	14,2 ± 0,3	4,6 ± 0,8	8,1 ± 0,4
1604-12	3,39 ±0,04	13,6 ± 0,3	1,5 ± 0,1	7,2 ± 0,1
1604* -12	3,42 ± 0,02	14,7 ± 0,4	2,1 ± 0,2	10,7 ± 0,5
1606-12	3,42 ±0,03	13,6 ± 0,4	1,7 ± 0,1	5,5 ± 0,2
1606*-12	3,44 ±0,01	14,1 ± 0,5	1,9 ± 0,1	6,9 ± 0,1
1614-12	3,37 ±0,04	13,6 ± 0,6	3,3 ± 0,2	6,9 ± 0,4
1614*-12	3,36 ±0,02	13,6 ± 0,2	5,5 ± 0,6	9,9 ± 0,1

* Indica las levaduras inoculadas en el mosto concentrado (25,2 °Brix).

ANEXO II. Conversión método DNS a Rebelein

Tabla 2. Conversión de los azúcares residuales obtenidos por DNS al método oficial Rebelein.

Levaduras	A. Residuales (g/L) REBELEIN	A. Residuales (g/L) DNS	Levaduras	A. Residuales (g/L) REBELEIN	A. Residuales (g/L) DNS
WAM	2,0 ± 0,1	4,8 ± 0,4	1404-12	2,0 ± 0,1	4,9 ± 0,2
WAM*	2,4 ± 0,5	5,7 ± 1,1	1404*-12	2,4 ± 0,2	5,7 ± 0,5
1101 -10	1,9 ± 0,1	4,6 ± 0,2	1405-12	2,1 ± 0,4	5,2 ± 0,9
1101*-10	1,6 ± 0,1	4,0 ± 0,2	1405*-12	2,2 ± 0,2	5,3 ± 0,2
1102 -10	1,8 ± 0,0	4,4 ± 0,1	1413-12	1,9 ± 0,1	4,7 ± 0,2
1102*-10	1,7 ± 0,1	4,0 ± 0,2	1413*-12	2,2 ± 0,1	5,3 ± 0,2
1401-10	2,0 ± 0,2	4,9 ± 0,4	1502-12	1,9 ± 0,1	4,7 ± 0,3
1401*-10	2,6 ± 0,1	6,2 ± 0,3	1502*-12	2,2 ± 0,2	5,3 ± 0,4
1402-10	3,4 ± 0,4	8,2 ± 0,9	1503-12	2,2 ± 0,3	5,2 ± 0,6
1402*-10	3,5 ± 1,1	7,0 ± 1,5	1503*-12	2,2 ± 0,1	5,2 ± 0,3
1413-10	1,9 ± 0,1	4,7 ± 0,2	1504-12	2,0 ± 0,1	4,8 ± 0,2
1413*-10	2,2 ± 0,1	5,2 ± 0,3	1504*-12	2,5 ± 0,3	5,9 ± 0,7
1414-10	2,0 ± 0,0	4,8 ± 0,1	1505-12	1,9 ± 0,2	4,5 ± 0,5
1414*-10	2,0 ± 0,1	4,9 ± 0,3	1505*-12	2,3 ± 0,1	5,6 ± 0,4
1602-10	1,9 ± 0,2	4,5 ± 0,4	1517-12	3,8 ± 1,0	9,1 ± 0,7
1602*-10	1,8 ± 0,1	4,4 ± 0,2	1517*-12	4,6 ± 0,8	11,0 ± 0,1
1302 -12	2,1 ± 0,2	5,1 ± 0,5	1604-12	1,5 ± 0,1	3,5 ± 0,3
1302*-12	4,5 ± 1,0	10,8 ± 1,3	1604* -12	2,1 ± 0,2	5,0 ± 0,1
1303 -12	2,2 ± 0,3	5,3 ± 0,6	1606-12	1,7 ± 0,1	4,1 ± 0,3
1303*-12	2,4 ± 0,2	5,8 ± 0,4	1606*-12	1,9 ± 0,1	4,7 ± 0,1
1310 -12	1,7 ± 0,0	4,1 ± 0,1	1614-12	3,3 ± 0,2	7,8 ± 0,5
1310* -12	2,3 ± 0,1	5,6 ± 0,1	1614*-12	5,5 ± 0,6	13,1 ± 0,9
1313-12	3,0 ± 1,1	7,1 ± 0,7			
1313*-12	6,6 ± 0,4	13,6 ± 1,0			

* Indica las levaduras inoculadas en el mosto concentrado (25,2 °Brix).

ANEXO III. Gráficos del tratamiento estadístico de datos

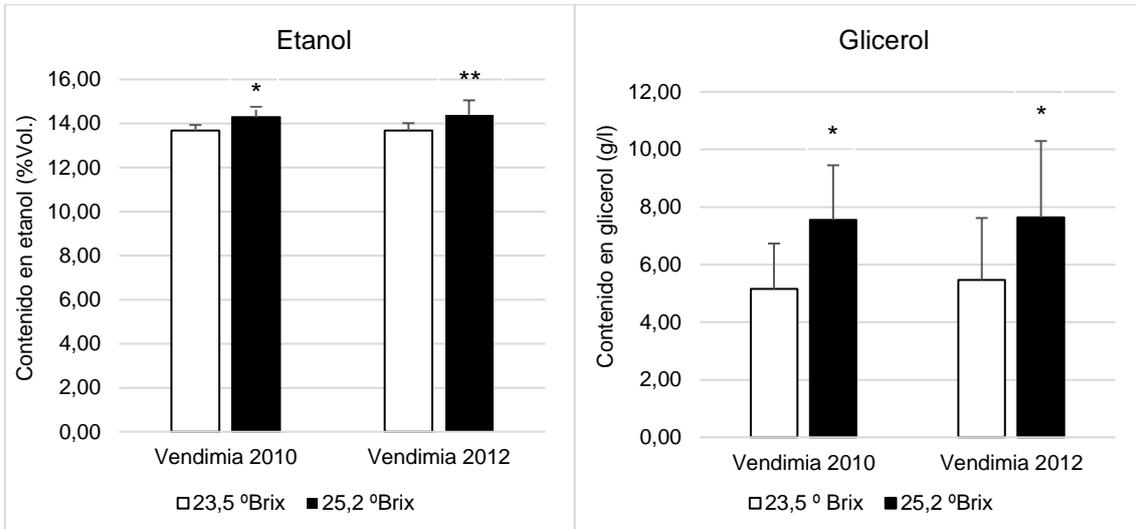


Figura a. Parámetros etanol y glicerol que tienen diferencias significativas estadísticamente con la prueba T-test . * Indica $p < 0,05$, **Indica $p < 0,005$.

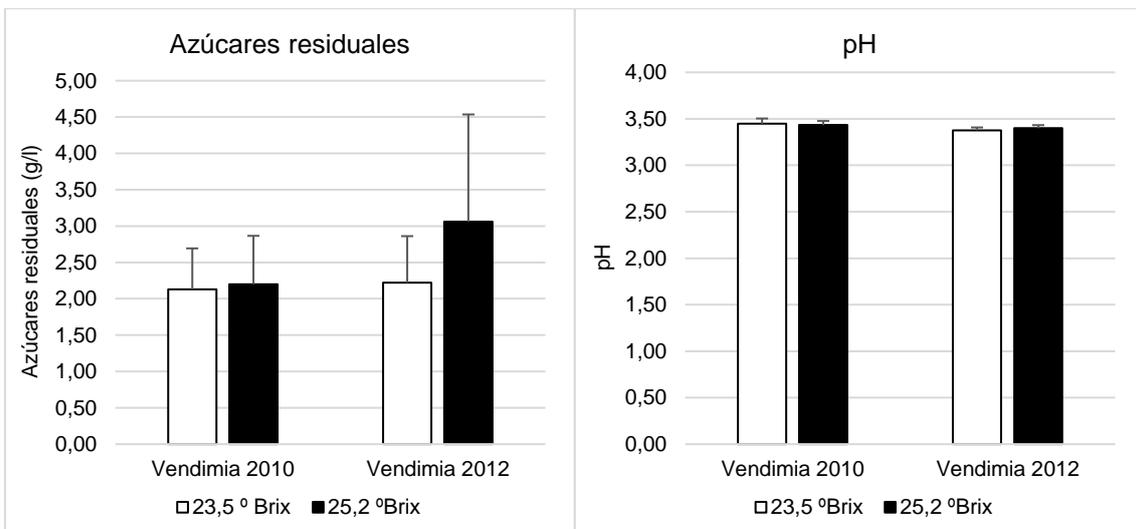


Figura b. Parámetros azúcares residuales y pH sin diferencias significativas.

ANEXO IV. Clasificación levaduras. Parámetros significativos.

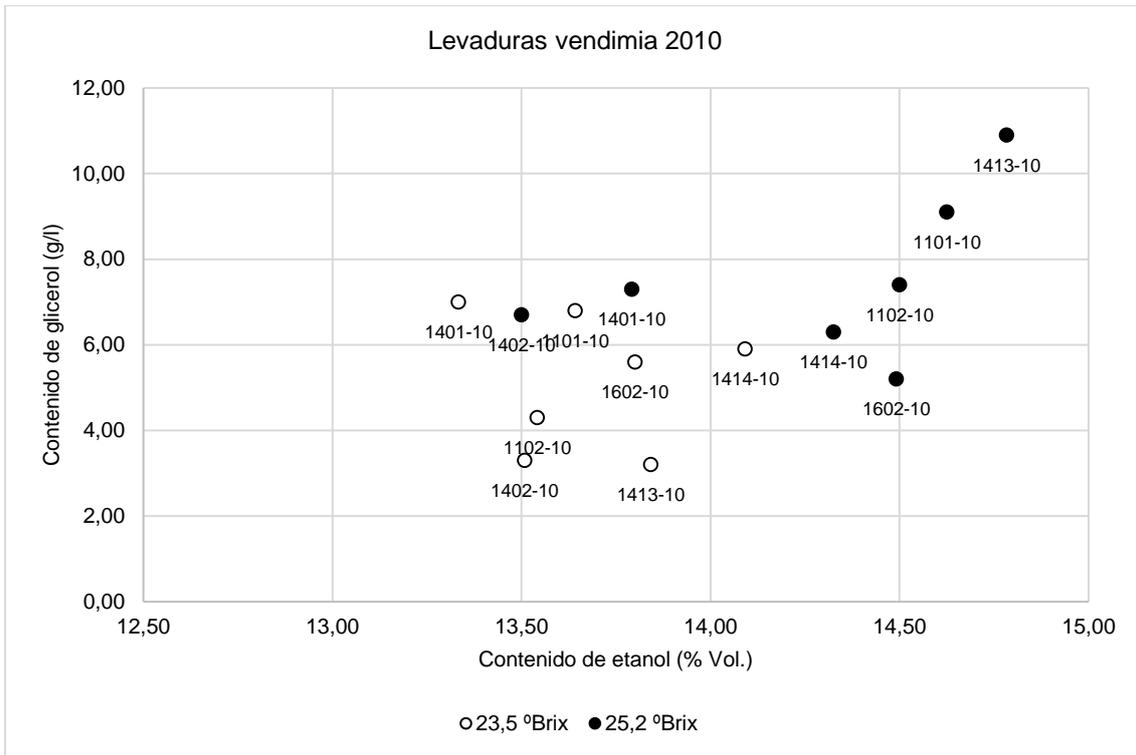


Figura c. Clasificación de las levaduras de la vendimia 2010 por los parámetros glicerol/etanol.

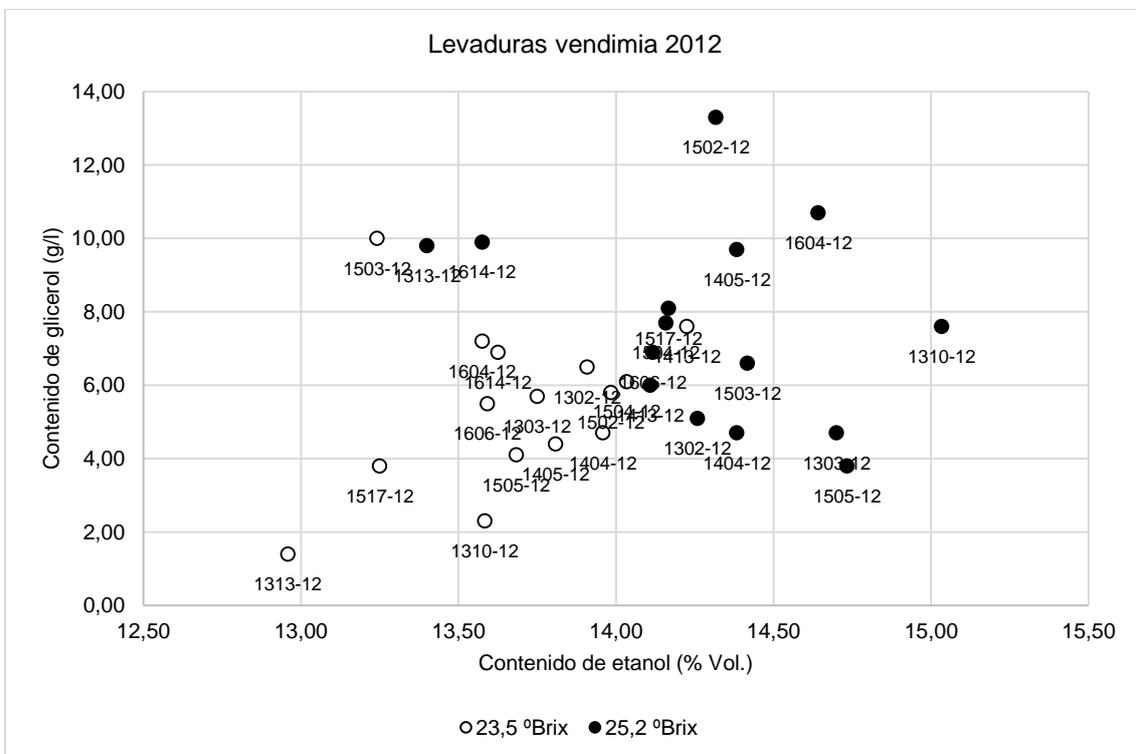


Figura d. Clasificación de las levaduras de la vendimia 2012 por los parámetros glicerol/etanol.