



---

**Universidad de Valladolid**  
**Campus de Palencia**

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR  
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

**Grado en Enología**

Caracterización bioquímica de cepas  
de *Saccharomyces cerevisiae* vínicas

Alumna: Candela Ruiz de Villa Sardón

Tutoras: Josefina Vila Crespo  
Violeta Ruipérez Prádanos

Junio de 2018

## ÍNDICE

1.	Introducción.	Pág.4
2.	Antecedentes.	Pág.7
	2.1. Aislamiento.	Pág.7
	2.2. Caracterización molecular.	Pág.7
3.	Justificación y objetivos.	Pág.8
4.	Materiales y métodos.	Pág.9
	4.1. Microorganismos.	Pág.9
	4.1.1. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	Pág.9
	4.1.2. Cultivo y mantenimiento de microorganismos.	Pág.10
	4.2. Mosto	Pág.10
	4.3. Caracterización bioquímica de las cepas.	Pág.11
	4.3.1. Cinética fermentativa, vigor y poder fermentativo.	Pág.11
	4.3.2. Crecimiento en medio líquido.	Pág.12
	4.3.3. Producción de SH <sub>2</sub> .	Pág.12
	4.3.4. pH.	Pág.12
	4.3.5. Acidez volátil.	Pág.13
	4.3.6. Carácter <i>killer</i> .	Pág.13
	4.3.7. Tolerancia al SO <sub>2</sub> .	Pág.13
	4.4. Expresión de resultados.	Pág.14
5	Resultados y discusión.	Pág.14
	5.1. Comportamiento fermentativo.	Pág.14
	5.2. Crecimiento en medio líquido.	Pág.20
	5.3. Producción de SH <sub>2</sub> .	Pág.21
	5.4. pH.	Pág.22
	5.5. Acidez volátil	Pág.22
	5.6. Carácter <i>killer</i> .	Pág.23
	5.7. Tolerancia al SO <sub>2</sub> .	Pág.24
6	Conclusiones.	Pág.27
7	Bibliografía.	Pág.29

## Resumen

Durante las últimas décadas la utilización de levaduras comerciales se ha extendido notablemente, sin embargo, cada vez se está teniendo más en cuenta la importancia de conocer la amplia diversidad de levaduras presentes en la uva ya que puede aportar particularidades muy interesantes al vino. En el presente estudio se va a realizar la caracterización enológica de varias cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, las cuales han sido aisladas durante el proceso de vinificación de uvas de la variedad Verdejo provenientes de una parcela de la DO Rueda durante la vendimia de 2012. Dicha caracterización se realizará mediante diversos ensayos bioquímicos (cinética fermentativa, vigor y poder fermentativo, crecimiento en medio líquido, producción de SH<sub>2</sub>, pH, carácter *killer* y tolerancia al SO<sub>2</sub>) con el fin de analizar la aptitud enológica de estas cepas de fuerte implantación en la zona.

## Abstract

Over the last decades the use of commercial yeasts has expanded considerably, however, the importance of knowing the wide yeast diversity of the grapes is increasing since it can provide very interesting characteristics to the wine. The present study focusses on the oenological characterization of several *Saccharomyces cerevisiae* strains, which have been isolated during the winemaking process of Verdejo grapes harvested in vineyards of the Rueda D.O in 2012. This characterization will be carried out through several biochemical assays (fermentation kinetics, vigor and fermentative power, grow in liquid medium, SH<sub>2</sub> production, *killer* character and SO<sub>2</sub> tolerance) in order to analyze the oenological value of these strains with strong presence in the area.

## 1. Introducción

Las levaduras desarrollan un papel principal en la elaboración del vino, siendo la especie *Saccharomyces cerevisiae* la preferida universalmente para iniciar la fermentación alcohólica, gracias a su efectivo catabolismo fermentativo (Pretorius, 2000). Sin embargo, además de *Saccharomyces cerevisiae* hay muchas otras especies presentes durante la vinificación, las cuales pueden tener un impacto, tanto positivo como negativo en la calidad del vino (Fugelsang *et al.*, 2007).

Originalmente, todo el vino se hacía mediante fermentación espontánea con la microbiota natural de la uva, no se utilizaba ningún tipo de inoculación deliberada para iniciar el proceso (Pretorius, 2000). Sin embargo, actualmente existen diversas opciones en cuanto a la forma de llevar a cabo la fermentación alcohólica, muchas bodegas apuestan por la inoculación de levaduras comerciales y muchas otras optan por la tradicional fermentación espontánea. Esta última opción permite dotar a los vinos de unas características organolépticas únicas, propias de la zona, contrariamente a la uniformidad que aportan a los vinos las levaduras comerciales (Álvarez-Pérez *et al.*, 2012). No obstante, en ocasiones optar por fermentación espontánea supone un riesgo de cara a posibles paradas fermentativas, además de la dificultad de conseguir reproducibilidad en el producto año tras año.

En los últimos años se está incrementando el interés hacia la utilización de cepas autóctonas con el objetivo de seleccionar aquellas potencialmente mejor adaptadas al crecimiento en mosto y que reflejen la biodiversidad de una región determinada (Capece *et al.*, 2010), por lo tanto, la selección de levaduras de la microbiota de la uva se presenta actualmente como una opción muy interesante de cara a vinificaciones de calidad.

Por otra parte, la inoculación de las cepas adecuadas a cada tipo de vinificación presenta ciertas ventajas sobre la fermentación espontánea, consiguiendo controlar, en parte, la fermentación debido a la imposición de la cepa inoculada, asegurando además fermentaciones vigorosas con un rápido comienzo del proceso que se traduce en una fase de latencia corta, la no proliferación de levaduras no-*Saccharomyces* y la realización completa de la fermentación alcohólica con baja concentración de azúcares residuales (Rodríguez, 2007).

En el presente estudio nos centraremos en caracterizar bioquímicamente diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas durante la vendimia 2012. Los resultados obtenidos permitirán conocer su aptitud enológica e identificar aquellas que presentan unas características tecnológicas más adecuadas para llevar a cabo el proceso de vinificación.

La caracterización molecular de estas levaduras se realizó en estudios previos en el laboratorio mediante técnicas de biología molecular. La caracterización mediante PCR-RFLP de la región ITS-5.8S del ADN ribosomal y RFLP del ADN mitocondrial indican que las cepas utilizadas en este estudio presentan variaciones en los patrones moleculares analizados, siendo cepas genéticamente diferentes.

Para llevar a cabo la caracterización enológica realizaremos una serie de ensayos bioquímicos, por una parte, se estudiarán los parámetros relacionados con el comportamiento fermentativo de las diferentes cepas, tales como poder fermentativo, vigor fermentativo y cinética de la fermentación, por otra parte, estudiaremos otras características tales como el crecimiento en medio líquido, la producción de SH<sub>2</sub>, el pH, la acidez volátil, el carácter *killer* y la resistencia al SO<sub>2</sub>.

La justificación de los parámetros elegidos para su caracterización se describe a continuación:

- **Características que influyen en el proceso de vinificación:** comportamiento fermentativo, modo de crecimiento en medio líquido, pH, factor *killer* y resistencia al SO<sub>2</sub>.

En primer lugar, el comportamiento fermentativo es uno de los parámetros fundamentales a la hora de seleccionar una cepa, ya que para la vinificación interesan cepas que muestren un rápido inicio de la fermentación, sin picos debidos a las variaciones de la temperatura y buen rendimiento al término de la fermentación (Resolución OIV-OENO 370-2012).

En cuanto al crecimiento de las levaduras en un medio de cultivo líquido es un parámetro a considerar ya que en las vinificaciones las cepas se desarrollarán en mosto, pudiendo mostrar distintos modos de crecimiento (por ejemplo, células individuales o agregadas) en función de la hidrofobicidad de la pared celular. En general, se precisa un crecimiento disperso y una rápida sedimentación en las cepas de levadura de vino seleccionadas para el proceso de vinificación estándar (Resolución OIV-OENO 370-2012). Es importante su floculación para asegurar su desaparición de la fase líquida y así facilitar la clarificación y la filtración (Pretorius, 2002). De manera que serán más interesantes las levaduras floculentas.

El pH es otro factor importante, ya que algunas levaduras son capaces de sintetizar o consumir ácidos, por lo que hay que controlar que se mantenga en los valores correctos, evitando así proliferación de microorganismos no deseados en el vino, y la modificación del rendimiento del SO<sub>2</sub> molecular.

Algunas cepas de levaduras, conocidas como cepas *killer* (K), secretan unas toxinas proteicas al medio las cuales son capaces de matar a otras cepas, denominadas cepas sensibles (S). Las cepas *killer* no son sensibles a su toxina, pero pueden verse afectadas por toxinas producidas por otras cepas; las cepas neutras (N) no producen toxinas, pero son resistentes a estas (Ribéreau-Gayon *et al*, 2006). El fenotipo *killer* ha constituido un criterio prioritario en la selección de levaduras vínicas ya que favorecen la implantación frente a las levaduras autóctonas. Si poseen en este sentido, un fuerte poder de implantación no es tan necesario el carácter *killer* para ejercer el predominio frente a las levaduras indígenas o salvajes (Suarez Lepe *et al.*, 2004), es decir, una levadura neutra con un correcto comportamiento fermentativo también podría ser de interés

Por último, la resistencia al dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>) es clave, ya que es un antioxidante y un agente bacteriostático necesario en vinificación para evitar la oxidación y obtener estabilidad microbiológica. Las cepas que garantizan una fermentación completa cuando las concentraciones de dióxido de azufre libre y dióxido de azufre total son superiores a 30 mg/L y 50 mg/L, respectivamente, son adecuadas para la caracterización de levaduras para vinificación (Resolución OIV-OENO 370-2012).

- **Características que influyen en la calidad organoléptica del vino:** acidez volátil y compuestos azufrados.

Otro parámetro decisivo es el ácido acético, el principal ácido volátil del vino, se produce particularmente durante una contaminación bacteriana (picado acético y picado láctico) pero también lo forman las levaduras durante la fermentación alcohólica. Por

encima de cierto límite, el ácido acético supone un efecto en detrimento de la calidad organoléptica del vino, dado que la producción depende de la cepa de levadura fermentativa (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Por otra parte, dado que el ácido sulfhídrico y derivados se consideran defectos olfativos en los vinos es conveniente conocer si la cepa seleccionada es capaz de producir este compuesto, ya que puede estar presente en el vino a causa del metabolismo microbiano. Las levaduras son capaces de formarlo por reducción del ion sulfato, y en ciertas condiciones, iones sulfito, que en el vino están en forma de bisulfito y ácido sulfuroso, y cuya formación va ligada a la necesidad de la especie de levadura de sintetizar aminoácidos azufrados (Suarez Lepe *et al.*, 2004).

En resumen, vamos a estudiar los parámetros fundamentales para una correcta selección (Figura 1), buscando, por tanto, una cepa que realice una correcta cinética fermentativa, que tenga un elevado poder fermentativo y un adecuado crecimiento en medio líquido, que no produzca ni acidez volátil en exceso ni ácido sulfhídrico, que no modifique el pH del vino de manera importante y que tenga un fenotipo *killer*, de manera que se consiga un nivel de implantación adecuado frente a las demás cepas y unas características organolépticas óptimas.

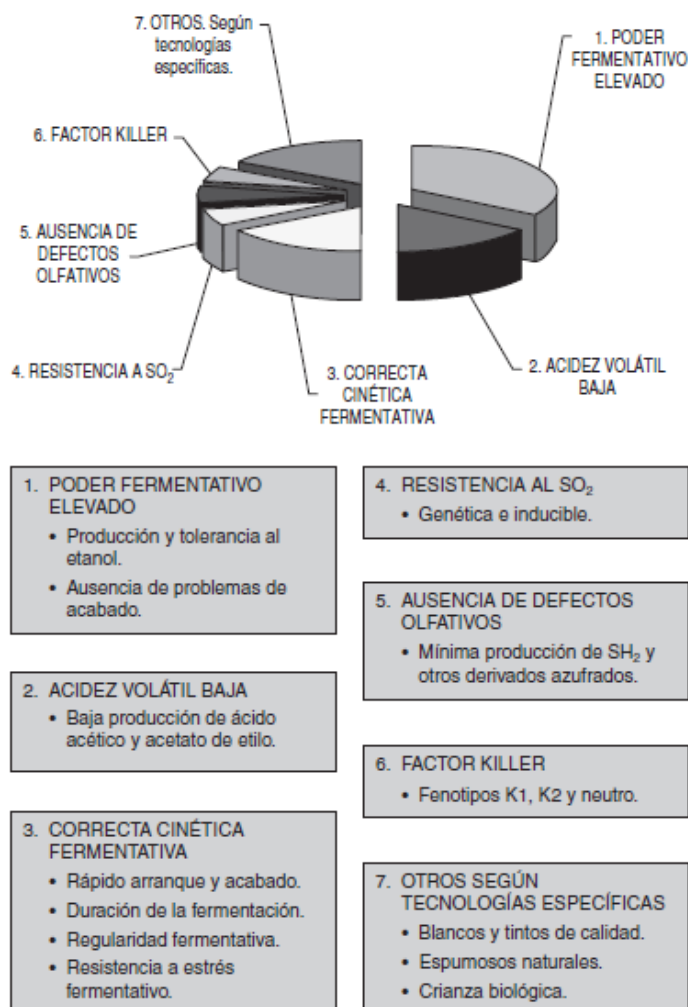


Figura 1. Criterios de selección clonal clásica de levaduras vínicas (Suarez Lepe *et al.*, 2004).

## 2. Antecedentes

### 2.1 Aislamiento

Para recopilar la colección de levaduras se aislaron y cultivaron las levaduras presentes en diferentes momentos del proceso fermentativo en bodega durante la vendimia 2012, concretamente del mosto desfogado (MDB), mosto de uva recién estrujada (MURE), inicio de la fermentación (IFB), fermentación tumultuosa (FTB) y final de fermentación (FFB).

Para ello se realizó una siembra en masa de las muestras tomadas en las diferentes etapas del proceso, se incubaron 48-72 horas a 28°C y posteriormente se aislaron colonias independientes mediante siembra en estría en placas de Petri. Este procedimiento se repitió de nuevo, asegurando conseguir colonias procedentes de una sola célula. Tanto por motivos de espacio como de mejor esterilidad, las levaduras al final se recopilaron en tubos cerrados en lugar de en placas de Petri (Simó, 2013).

Por otra parte, se escogió la liofilización para conservar las cepas a largo plazo. Este proceso consiste en la deshidratación del material a tratar mediante la sublimación del agua, congelada a bajas temperaturas en condiciones de vacío. Después de la liofilización el microorganismo deshidratado, con su actividad metabólica reducida, se transfiere a tubos sellados y almacenables a temperatura ambiente, lo cual facilita su transporte (Arruda *et al.*, 2016).

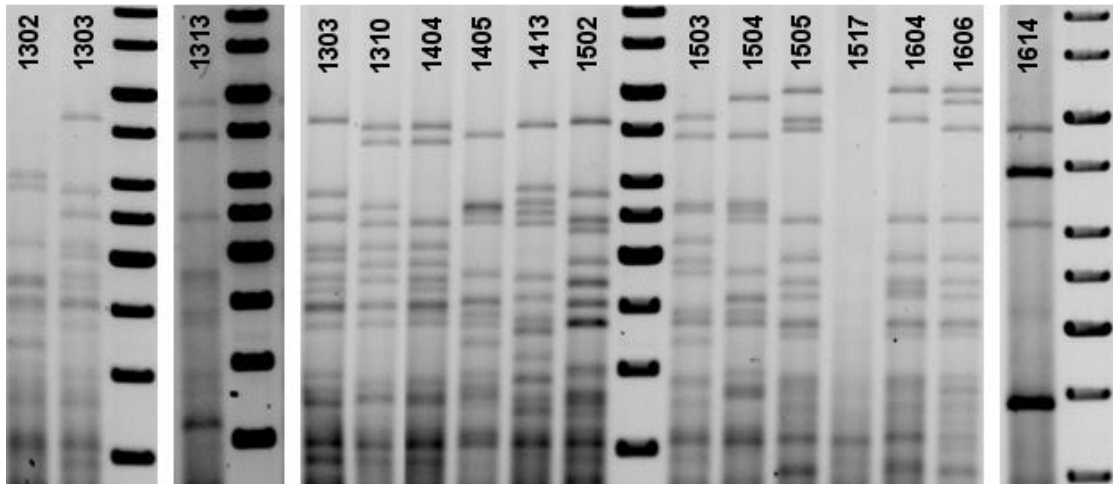
### 2.2 Caracterización molecular

Previamente a la caracterización enológica descrita en este trabajo se realizó una caracterización molecular de las levaduras de la parcela a estudiar con el objetivo de seleccionar cepas de *Saccharomyces cerevisiae* genéticamente diferentes.

Por una parte, se realizó una identificación a nivel de especie mediante PCR-RFLP de la región ITS-5.8S del ADN ribosomal, previa extracción del ADN de las levaduras mediante el protocolo descrito por Querol *et al.* (1992). Para ello, se realizó una PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) de la región ITS-5.8S del ADN ribosomal, utilizando los primers ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (Fernández-Espinar *et al.*, 2005). A continuación, se realizó una digestión enzimática empleando las enzimas de restricción Hinf I, Hae III y Cfo (Resolución OIV-OENO 408-2011) con posterior electroforesis en gel de agarosa (Fernández-Espinar *et al.*, 2005). Una vez concluido el proceso se interpretaron los geles analizando los patrones de restricción obtenidos, es decir, observando cuales coincidían con los patrones correspondientes a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Por otra parte, se llevó a cabo una diferenciación a nivel de cepa mediante RFLP del ADN mitocondrial, el cual es uno de los métodos más eficaces para establecer diferencias entre cepas (López *et al.*, 2001). Dicha técnica, previa extracción del ADN de las levaduras, consiste en una digestión enzimática, utilizando en este caso la enzima de restricción Hinf I y realizando posteriormente una electroforesis en gel de agarosa (López *et al.*, 2001). Por último, se analizaron los patrones de restricción de las levaduras para agrupar los aislados con patrones moleculares iguales.

Finalmente, de las cepas que se caracterizaron molecularmente y se identificaron como *Saccharomyces cerevisiae* en la parcela estudiada, se obtuvieron 15 patrones de restricción diferentes (Figura 2), seleccionando una cepa de cada patrón para la caracterización enológica.



**Figura 2.** Patrones de restricción de ADNmt identificados (datos del grupo de investigación sin publicar).

### 3. Justificación y objetivos.

El presente estudio forma parte de un proyecto de selección de levaduras autóctonas de ciertas parcelas de la D.O Rueda. El objetivo principal de este trabajo es determinar la aptitud enológica de diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y así conocer su potencial uso en vinificaciones ecológicas, asegurando un producto único con características propias de la zona.

Para ello se proponen una serie de ensayos bioquímicos con el objetivo de caracterizar cepas que posean las siguientes características:

- Correcta cinética fermentativa, elevado poder y vigor fermentativo.
- Buen crecimiento en medio líquido.
- Incidencia en el pH.
- Alta resistencia al SO<sub>2</sub>.
- Fenotipo *killer* o neutro.
- Baja producción de acidez volátil.
- Nula producción de ácido sulfhídrico.



## 4. Materiales y métodos

### 4.1 Microorganismos

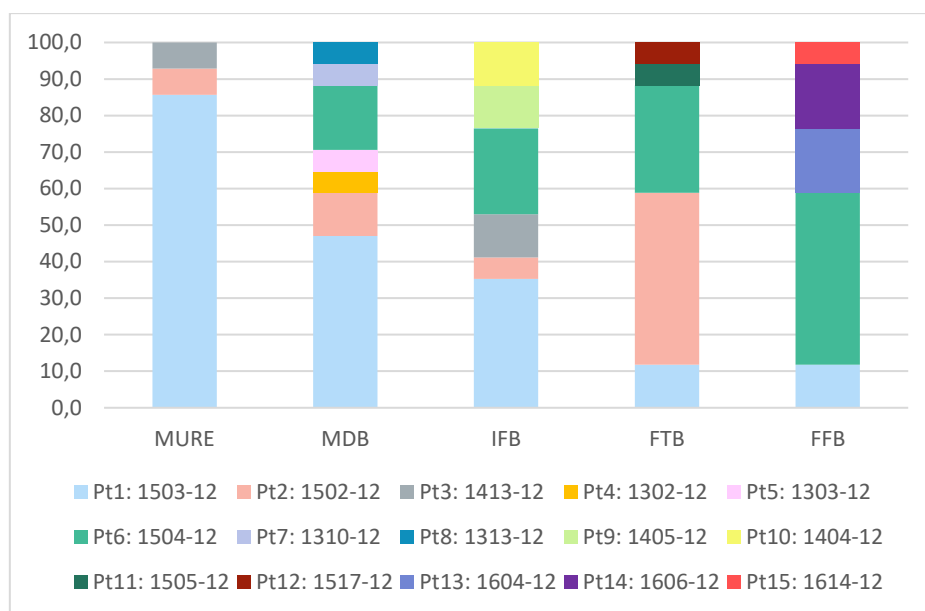
#### 4.1.1 Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Se ha empleado como cepa control la levadura Uvaferm Wam, aislada y seleccionada en la E.T.S. de Ingenierías Agrarias de Palencia, Universidad de Valladolid, y comercializada por Lallemand. Es una cepa de levadura seleccionada entre numerosas cepas tomadas de la naturaleza y proviene de un viñedo de la variedad Verdejo de la D.O. Rueda. En cuanto a sus características organolépticas produce una concentración moderada de aromas fermentativos del tipo de fruta fresca y exótica, respetando los aromas propios de la variedad, tecnológicamente asegura una fermentación rápida.

En cuanto a las cepas objeto de estudio se seleccionaron 15 cepas con patrones de restricción diferentes (Tabla 1), en la figura 3 se observa la representación de cada patrón en cada etapa de la vinificación.

**Tabla 1.** Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* del estudio

<b>Cepas</b>	<b>Etapas de aislamiento en la vinificación</b>
1302-12	Aislado en desfangado.
1303-12	Aislado en desfangado.
1310-12	Aislado en desfangado.
1313-12	Aislado en desfangado.
1404-12	Aislado en inicio de fermentación.
1405-12	Aislado en inicio de fermentación.
1413-12	Aislado en inicio de fermentación. Con patrón mitocondrial igual a la WAM.
1502-12	Aislado en fermentación tumultuosa.
1503-12	Aislado en fermentación tumultuosa.
1504-12	Aislado en fermentación tumultuosa.
1505-12	Aislado en fermentación tumultuosa.
1517-12	Aislado en fermentación tumultuosa.
1604-12	Aislado en final de fermentación.
1606-12	Aislado en final de fermentación.
1616-12	Aislado en final de fermentación.



**Figura 3.** Gráfico de porcentajes de cada patrón en cada etapa de vinificación (Resultados del equipo de investigación no publicados).

Para realizar el test *killer* se utilizaron dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* procedentes de la Colección Española de Cultivos Tipo, la cepa *killer* (CECT 1414) y la cepa sensible (CECT 1443).

#### 4.1.2 Cultivo y mantenimiento de microorganismos

Las cepas que se emplearon en este estudio se cultivaron en placas con medio de cultivo sólido YPD (extracto de levadura Labkem 1% p/v, peptona bacteriológica Panreac 2% p/v, glucosa Labkem 2% p/v, agar Biolife 1,5 p/v) a 26°C, realizando pases frecuentes en medio nuevo para mantener su actividad en condiciones óptimas.

El medio YPD se esterilizó antes de su uso en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

#### 4.2 Mosto

El mosto de uva variedad Verdejo empleado en el estudio se obtuvo tras el desfangado en la bodega durante la vendimia de 2016, se trasladó a la E.T.S. de Ingenierías Agrarias de Palencia donde se esterilizó a vapor fluyente y se conservó a -20°C hasta el momento de su utilización.

Antes de realizar los ensayos, se analizó el mosto de partida. Este mosto posee un grado alcohólico volumétrico de 0% vol., medido a través del método ebullométrico, el cual se basa en la disminución del punto de ebullición de las mezclas hidroalcohólicas (García, 1990) y un grado Brix de 23,5°, medido con refractómetro, lo cual equivale a una concentración de azúcares de 232,3 g/l y a un grado alcohólico probable de 13,8% vol. 20°C.

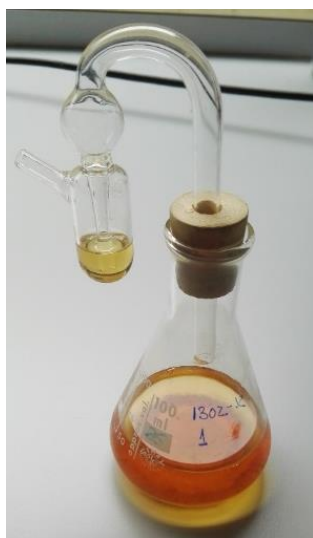
### 4.3 Caracterización bioquímica de las cepas

A continuación, se describen los protocolos de los ensayos bioquímicos realizados para la caracterización enológica, todos extraídos de la Resolución OIV-OENO 370-2012, con pequeñas variaciones adaptadas a las necesidades de nuestro estudio.

#### 4.3.1 Cinética fermentativa.

Las levaduras se inocularon en 5 ml de medio YPD líquido y se cultivaron durante 24 h a 21°C. La fermentación del mosto Verdejo con las diferentes cepas de *S. cerevisiae* se realizó en matraces Erlenmeyer de 100 ml. Como control se utilizó la levadura WAM.

Se añadieron 50 ml de mosto, previamente homogeneizado y se esterilizó a 121°C durante 15 min. En cada matraz se inoculó 1 ml de levadura procedente del cultivo líquido. Posteriormente se sellaron con válvulas Müller (Figura 4) con ácido sulfúrico concentrado, que evita la entrada de oxígeno y permite la salida de CO<sub>2</sub>, así como la reacción de otros productos volátiles de la fermentación (Suarez Lepe, 2004), y se incubaron en estufa (Scalab) a 20°C para que tuviese lugar la fermentación alcohólica. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.



**Figura 4.** Matraz con válvula Müller (Fuente propia).

Estos matraces se pesaron diariamente con una balanza de precisión con el objetivo de medir por diferencia de peso el anhídrido carbónico formado hasta que se alcanzó un peso constante (Suarez Lepe *et al.*, 2004), momento en el que se consideró finalizada la fermentación, comprobando así los parámetros descritos a continuación.

El estudio de una correcta cinética fermentativa se basa principalmente en la fase de determinación de la fase de latencia o arranque de fermentación, en la regularidad fermentativa, en la duración total del proceso y en el contenido en etanol conseguido (Suarez Lepe *et al.*, 2004), otros parámetros interesantes son la pendiente de la curva en la fase logarítmica, la longitud de la fase estacionaria, y la longitud y pendiente de la curva en la fase final (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Para controlar este

parámetro se realizaron curvas en las que se reflejaron los gramos de CO<sub>2</sub>/l producidos por días, a partir de los datos de producción de CO<sub>2</sub> se compararon las diferencias en el desarrollo de la fermentación de las diferentes cepas y se estudiaron los aspectos anteriormente descritos.

- Poder fermentativo:

Determinación de la cantidad máxima de azúcar que cada levadura es capaz de fermentar en un medio rico (Resolución OIV-OENO 370-2012). Se calculó a partir de la disminución del peso entre la primera y la última pesada y multiplicando por el factor 2,5 (Suarez Lepe *et al.*, 2004). Se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Poder fermentativo (\% v/v)} = 2,5 \cdot \Delta \text{ peso}$$

- Vigor fermentativo:

El vigor fermentativo se trata de la velocidad a la que la levadura inicia la fermentación, expresado en gramos de CO<sub>2</sub> producidos de 2 a 3 días después del comienzo de la fermentación (Resolución OIV-OENO 370-2012).

#### 4.3.2 Crecimiento en medio líquido

Para comprobar el crecimiento en medio líquido se prepararon tubos con 5 ml de medio YPD líquido (extracto de levadura Labkem 1% p/v, peptona bacteriológica Panreac 2% p/v, glucosa Labkem 2% p/v) en los que se inocularon las diferentes cepas y tras 24 horas creciendo en estufa a 20°C se midió la densidad óptica del medio en un espectrofotómetro (Spectronic 20 Genesys) a 600 nm justo después de un fuerte agitado (D0) y transcurridos 10 minutos (D1). Los valores del ratio  $R = D1 \times 100 / D0$  permitieron identificar las cepas de levadura no floculentas ( $R = 100\%$ ) o ligeramente floculentas ( $R$  entre el 70 y el 100%) (Resolución OIV-OENO 370-2012).

#### 4.3.3 Producción de SH<sub>2</sub>.

La producción de ácido sulfhídrico se evaluó utilizando el método del acetato de plomo, el sulfuro volátil se libera como sulfuro de hidrógeno e interactúa con el plomo del acetato de plomo del papel indicador formando una coloración oscura (Linderholm, 2007).

Una vez finalizada la fermentación alcohólica de los matraces utilizados para estudiar el comportamiento fermentativo se retiró la válvula Müller e inmediatamente después se introdujo un fragmento de papel indicador (Whatman). Se observó el cambio de coloración, considerando positivo la coloración oscura del indicador.

#### 4.3.4 Determinación pH.

El pH se determinó tras finalizar la fermentación en los matraces por triplicado con un pH-metro (Crison).

#### 4.3.5 Acidez volátil

Al finalizar la fermentación alcohólica de las microvinificaciones se determinó la acidez volátil por el método de García Tena. Dicho método se basa en una destilación fraccionada de 11ml de vino, primero recogiendo un volumen de 5,1 ml que se retira y después un volumen de 3,2 ml (García, 1990), el cual se valora con NaOH 0,01 N. Se utilizó un destilador de la casa comercial GAB.

La acidez volátil expresada como g/l de ácido acético se calculó usando la siguiente fórmula:

$$g/l \text{ ácido acético} = ml \text{ gastados} \cdot 0,18$$

#### 4.3.6 Carácter *killer*.

Para determinar el carácter *killer* de las cepas a estudiar se realizó el siguiente ensayo:

Se preparó un medio de cultivo específico YEPD-MB (extracto de levadura Labkem 1% p/v, peptona bacteriológica Panreac 2% p/v, glucosa Labkem 2% p/v, agar Biolife 3,5% p/v y agua destilada), acidificado con ácido cítrico 1 M hasta pH 4,65, teñido con 2% de azul de metileno al 1%, y tamponado con 1% de tampón citrofosfato 2 M (38,4g/l de ácido cítrico, 56,8 g/l de fosfato sódico dibásico, a pH 4,5) (Izgu *et al.*, 1997). Posteriormente se realizaron dos ensayos:

- **Test *killer*:** para comprobar si la levadura es *killer* se sembró en masa (1 ml de la suspensión de levadura en agua destilada) la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* sensible (CECT 1443), y posteriormente con el medio ya solidificado, se sembró en estría, haciendo zigzag, la levadura a estudiar.
- **Test sensible:** para comprobar si la levadura es sensible se sembró en masa (añadir 1 ml de la suspensión de levadura en agua) la levadura problema, y posteriormente con el medio ya solidificado, se sembró en estría, haciendo zigzag, una levadura *Saccharomyces cerevisiae killer* (CECT 1414).

Finalmente se dejó incubar a 21°C durante una semana.

#### 4.3.7 Tolerancia al SO<sub>2</sub>.

Al igual que en la prueba de la cinética fermentativa se inocularon en mosto de Verdejo las 15 cepas objeto de estudio y la cepa control WAM, según lo descrito en el apartado 4.3.1.

El ensayo se realizó en matraces Erlenmeyer de 100 ml conteniendo 50 ml de mosto estéril en presencia o ausencia de 20 mg/L de SO<sub>2</sub> libre mediante la adición de metabisulfito de potasio. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Se inocularon ambos mostos con 1 ml del cultivo de cada cepa de levadura y finalmente se sellaron con válvulas Müller con ácido sulfúrico concentrado y se incubaron a 20°C, pesando diariamente hasta peso constante.

## 4.4 Expresión de resultados

Todos los ensayos se realizaron por triplicado, mostrando en los resultados el valor promedio de las tres muestras, incluyendo su desviación estándar.

# 5 Resultados.

## 5.1. Comportamiento fermentativo.

- Cinética fermentativa

Observando la gráfica donde se representa la cinética fermentativa de todas las levaduras analizadas (Figura 5) se determina que 7 cepas muestran una pendiente en la fase logarítmica bastante inferior a la de la cepa WAM, 1302-12, 1313-12, 1404-12, 1517-12, 1606-12 y 1614-12. Se toma de referencia la cepa WAM ya que es, con seguridad, una buena fermentadora. En las gráficas donde se representan individualmente estas cepas (Figuras 6, 17 y 20) se aprecia que las cepas 1302-12, 1517-12 y 1614-12 muestran tanto una fase de latencia, como una duración del proceso fermentativo total más largos, no llegándose a estabilizar del todo la curva los últimos días, lo cual no es de interés para realizar una fermentación adecuada. En cuanto a las cepas 1313-12, 1404-12 y 1606-12 (Figuras 9, 10 y 19), aunque se comportan algo mejor que las tres cepas anteriores, también presentan una larga fase de latencia y poca pendiente en la fase logarítmica por lo que tampoco resultan interesantes.

Por otro lado, aunque el rendimiento final del conjunto no varía excesivamente, observamos que las cepas 1405-12 y 1504-12 (Figuras 11 y 15) tienen un rendimiento final algo más bajo, que contrasta con una fase latencia y una fermentación total corta, la cepa 1503-12 (Figura 14), presenta menor pendiente en la fase exponencial que la cepa WAM pero un elevado rendimiento final; dado que todas acaban la fermentación y tienen una cinética correcta, aunque no excelente, podrían ser potencialmente útiles.

Finalmente, hay 6 cepas que han destacado, por tener una corta fase de latencia, es decir, un rápido arranque fermentativo igual o superior al de la cepa control WAM y un rápido desarrollo de la fermentación. Estas cepas son, 1303-12, 1310-12, 1413-12 (con patrón molecular igual a la WAM), 1502-12, 1505-12, y 1604-12 (Figuras 7, 8, 12, 13, 16 y 18 respectivamente). Además, se observa una pendiente en la fase logarítmica superior o similar al de la cepa WAM. Partiendo de que la cepa WAM es una buena fermentadora, los resultados obtenidos nos indican que estas cepas son candidatas para obtener unos buenos resultados desde el punto de vista de la cinética fermentativa.

No obstante, como se puede ver en las figuras 7 y 8 entre estas cepas podemos subrayar las cepas 1303-12, 1310-12 (ambas presentes en el mosto desfangado) y la 1505-12 (presente en final de fermentación), dadas sus correctas cinéticas fermentativas, con una corta fase de latencia, una rápida fase exponencial, una fase estacionaria que se estabilizó pronto, entorno al día 21 y un alto rendimiento final. Por lo tanto, ambas muestran un proceso fermentativo rápido y eficaz.

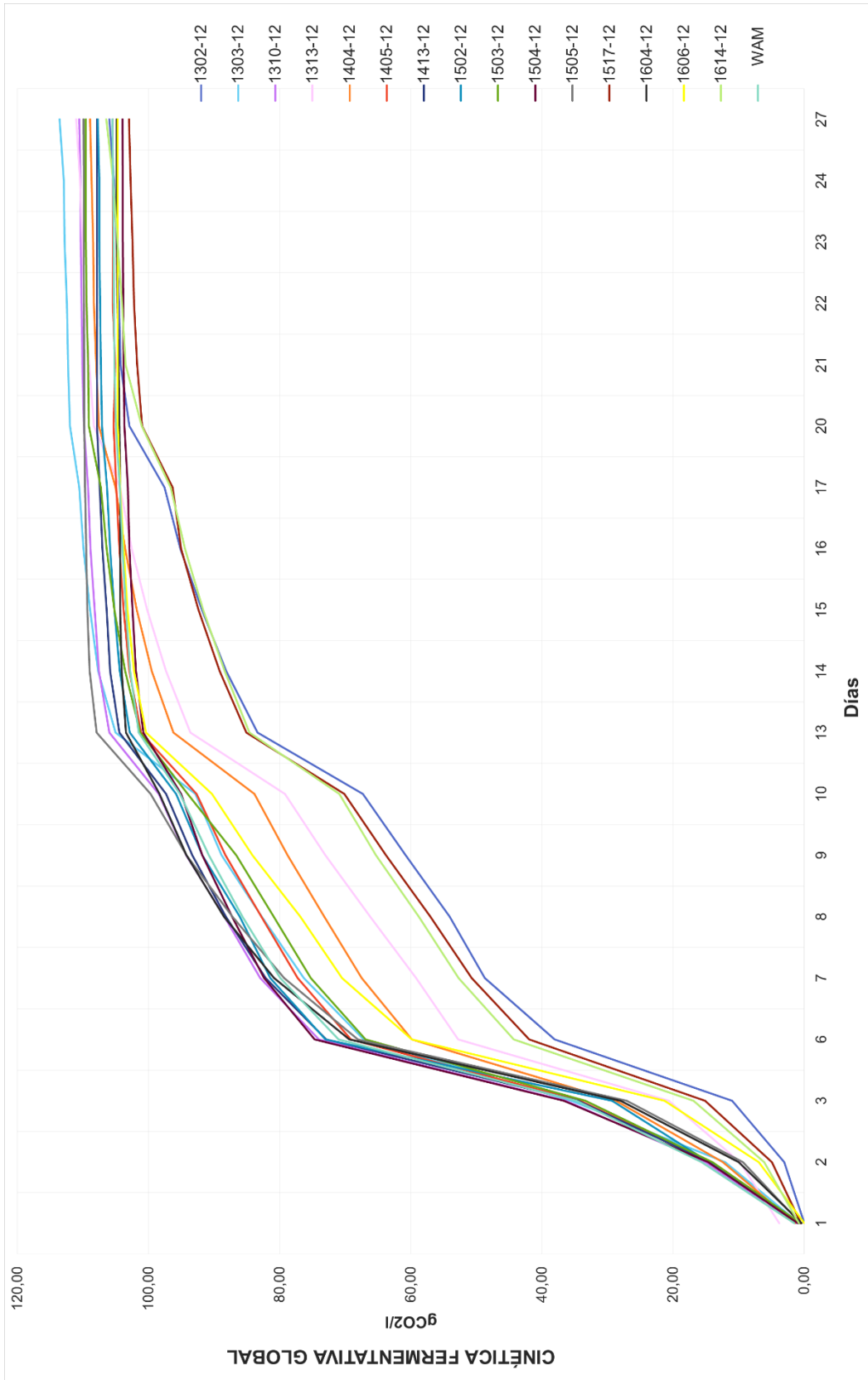


Figura 5. Curva de cinética fermentativa total.

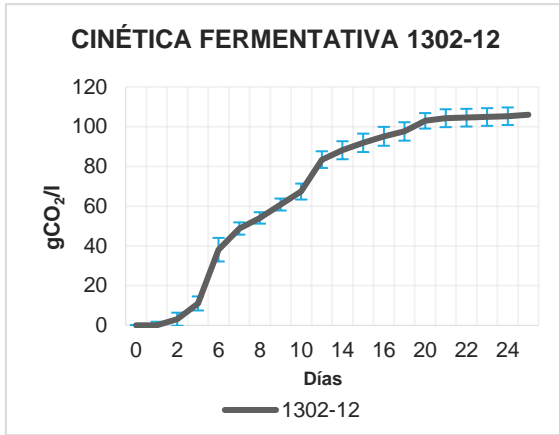


Figura 6. Cinética fermentativa de la cepa 1302-12

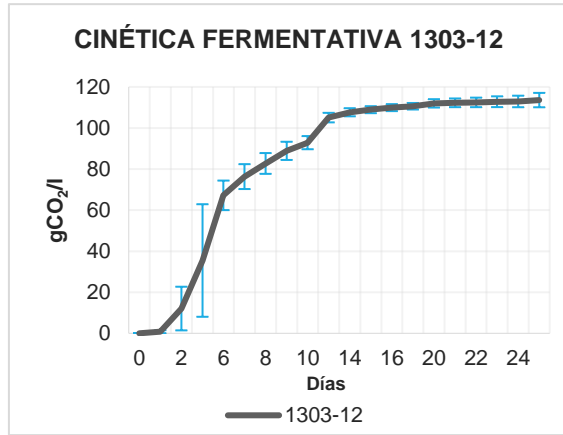


Figura 7. Cinética fermentativa de la cepa 1303-12

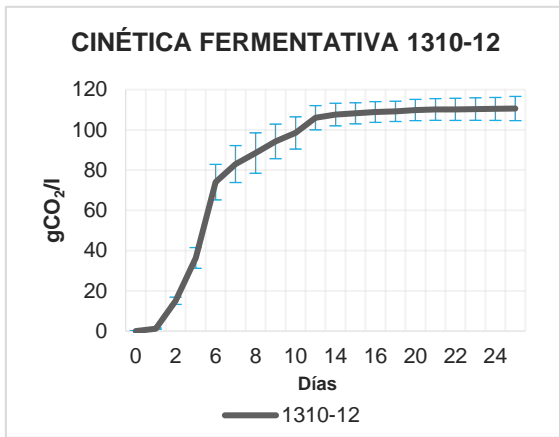


Figura 8. Cinética fermentativa de la cepa 1310-12

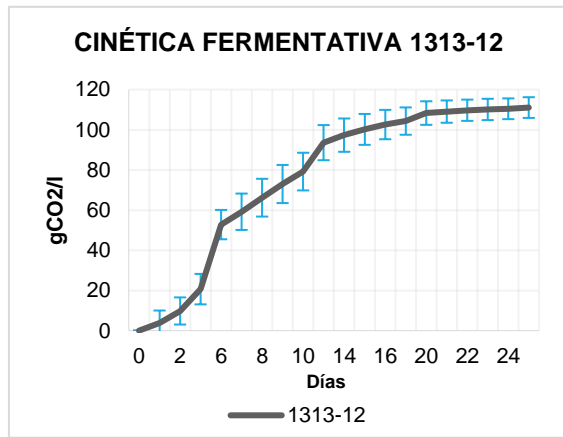


Figura 9. Cinética fermentativa de la cepa 1313-12

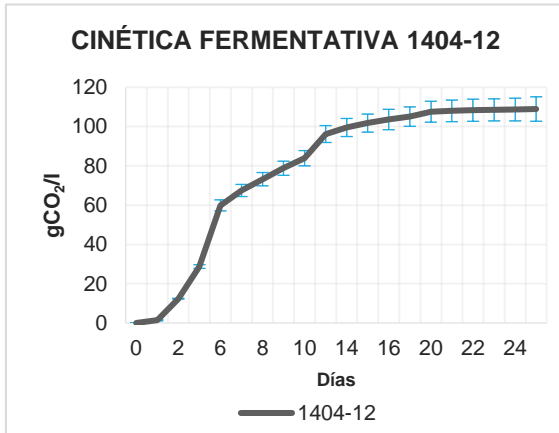


Figura 10. Cinética fermentativa de la cepa 1404-12

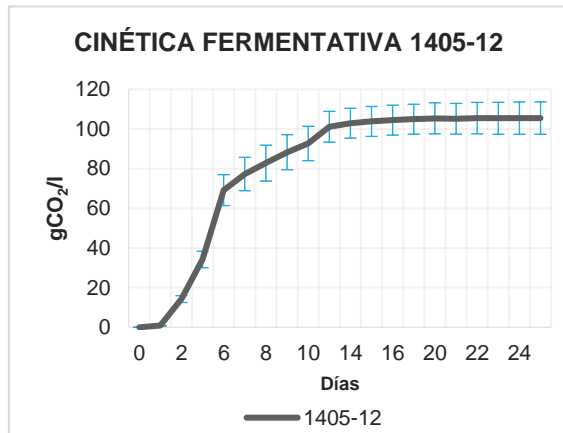


Figura 11. Cinética fermentativa de la cepa 1405-12



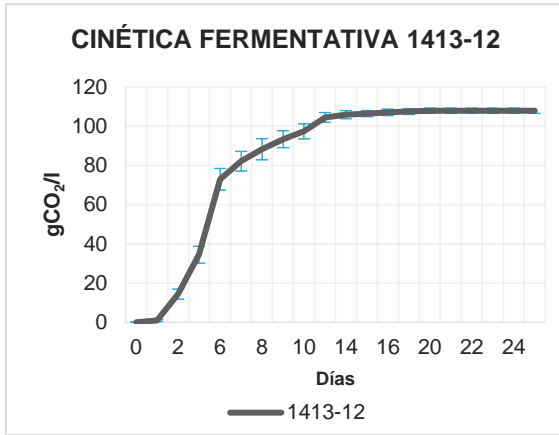


Figura 12. Cinética fermentativa de la cepa 1413-12

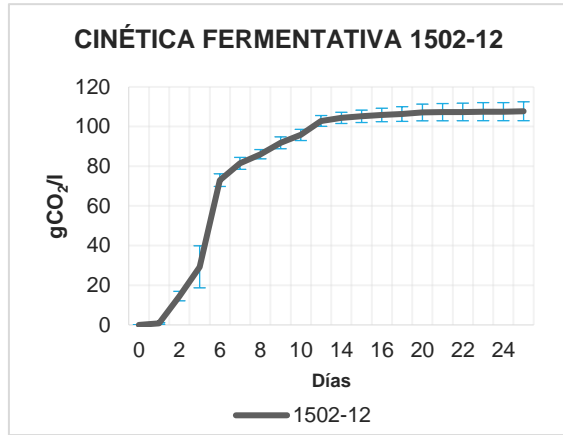


Figura 13. Cinética fermentativa de la cepa 1502-12

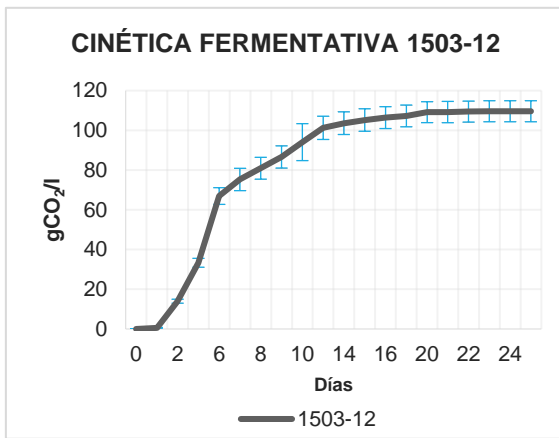


Figura 14. Cinética fermentativa de la cepa 1503-12

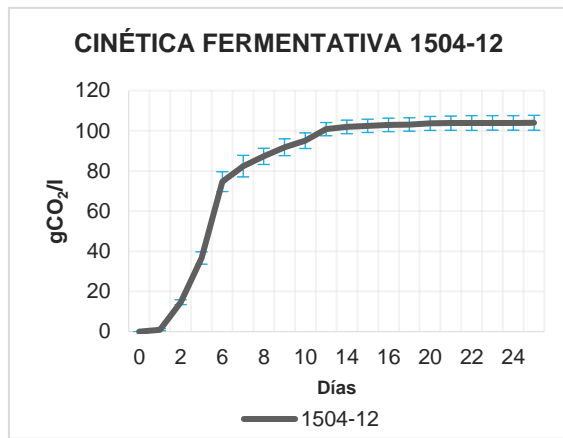


Figura 15. Cinética fermentativa de la cepa 1504-12

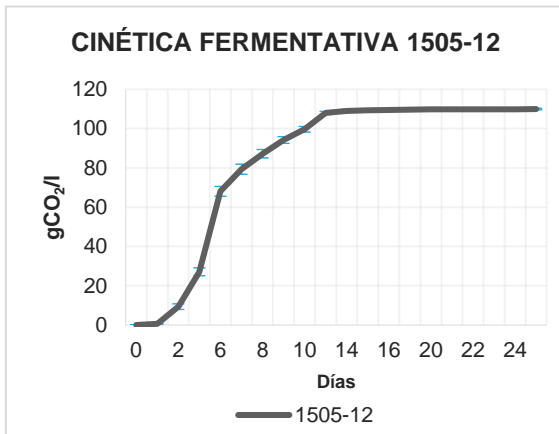


Figura 16. Cinética fermentativa de la cepa 1505-12

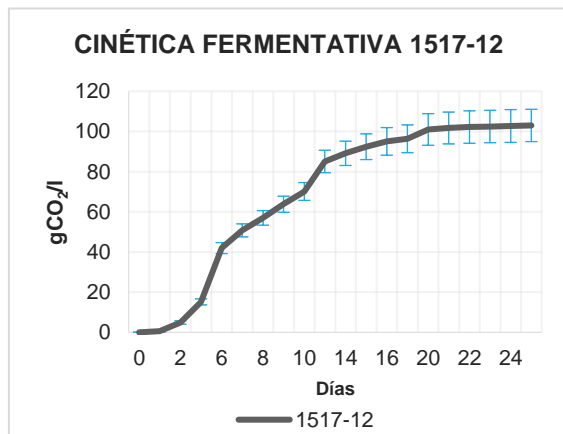
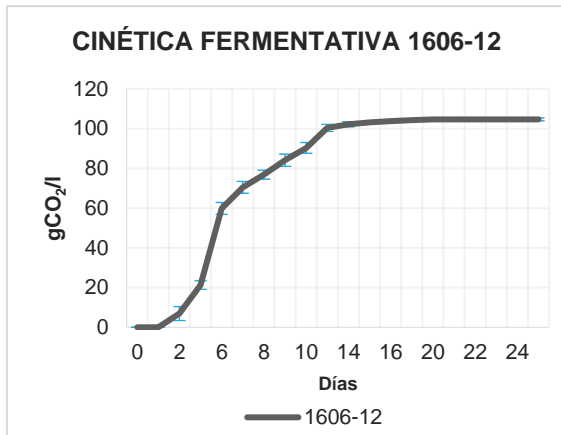
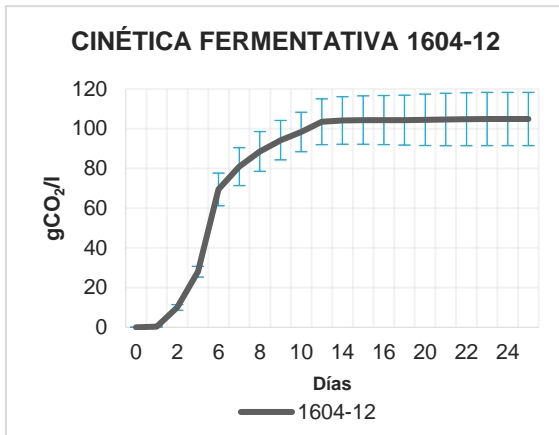
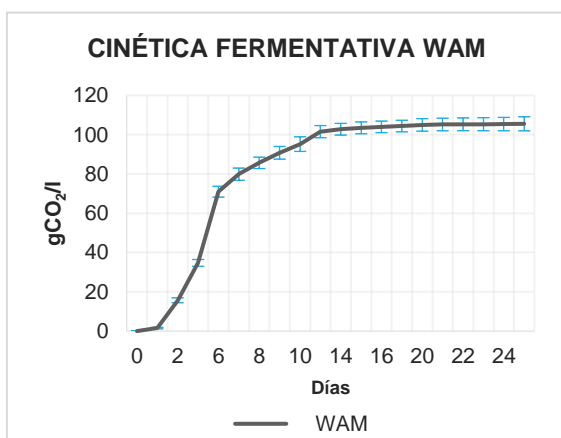
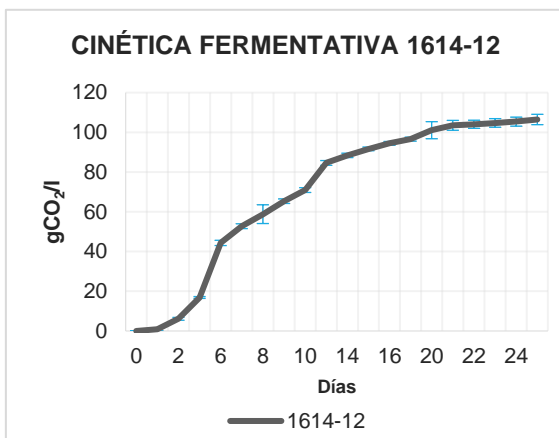


Figura 17. Cinética fermentativa de la cepa 1517-12



**Figura 18.** Cinética fermentativa de la cepa 1604-12 **Figura 19.** Cinética fermentativa de la cepa 1606-12



**Figura 20.** Cinética fermentativa de la cepa 1614-12 **Figura 21.** Cinética fermentativa de la cepa WAM

- Poder fermentativo

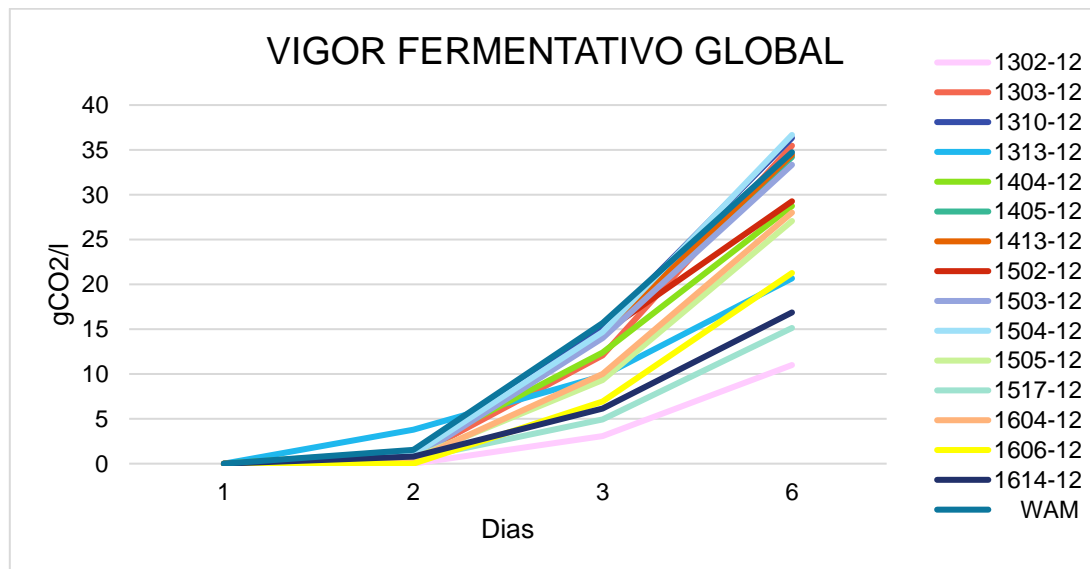
Al finalizar la fermentación alcohólica se determinó el poder fermentativo alcanzado por cada una de las cepas estudiadas. Los resultados se muestran en la tabla 2, aunque la cepa WAM tiene una buena capacidad fermentativa observamos que hay 9 cepas que han finalizado la fermentación consumiendo una mayor cantidad de azúcares que dicha cepa control, siendo la cepa 1303-12 la que ha conseguido un mayor grado alcohólico, superando los 14 %vol., lo cual lo cual sugiere que se producen menos metabolitos secundarios durante la fermentación alcohólica.

**Tabla.2** Resultados del poder fermentativo

Cepas	Poder fermentativo
1303-12	14,2 ± 0,44
1313-12	13,9 ± 0,65
1310-12	13,8 ± 0,75
1505-12	13,7 ± 0,05
1503-12	13,7 ± 0,66
1404-12	13,6 ± 0,78
1413-12	13,5 ± 0,17
1502-12	13,5 ± 0,59
1614-12	13,3 ± 0,33
1302-12	13,3 ± 0,55
WAM	13,2 ± 0,45
1405-12	13,2 ± 1,02
1604-12	13,1 ± 1,23
1606-12	13,1 ± 0,09
1504-12	13,0 ± 0,46
1517-12	12,9 ± 1,01

- Vigor fermentativo.

Si se observan los tres primeros días de la fermentación (Figura 22) vemos como hay varias cepas (1303-12,1310-12,1405-12,1413-12,1503-12 y 1504-12) que inician la fermentación rápido, a la par que la cepa WAM, lo que sugiere su utilización para asegurar un comienzo adecuado de la fermentación. Las cepas 1302-12, 1313-12, 1517-12, 1606-12 y 1614-12 tardan más en arrancar la fermentación, lo que supondría un retraso en el inicio de la fermentación. Por otra parte, encontramos cuatro cepas en una situación intermedia, 1404-12,1502-12, 1505-12 y 1604-12, que también podrían dar buenos resultados al inicio la fermentación.



**Figura 22.** Vigor fermentativo.

Con respecto a los resultados de la caracterización molecular previa (resultados del grupo de investigación no publicados), la presencia y contribución de las cepas estudiadas al proceso fermentativo llevado a cabo en la bodega de forma espontánea no es la misma.

Aquellos patrones que cuentan con más aislados y que son predominantes en la mayoría de las etapas de la fermentación, 1503-12, 1502-12 y 1504-12, o bien lideran la fermentación tumultuosa están más adaptadas al medio, pero esto no significa que deban tener unas mejores características fermentativas. Previamente, varios autores como Di Maio *et al.* (2012), Ilieva *et al.* (2017), Capece *et al.*, (2010) o Diaz *et al.* (2013), en sus estudios han aislado y seleccionado levaduras únicamente de la fase fermentativa, sin tener en cuenta que a veces puede tener mejores propiedades una cepa presente en viñedo o en etapas iniciales que no sea la que está llevando a cabo la fermentación.

En el presente estudio ha resultado que las tres cepas con mejor respuesta se corresponden a tres patrones con un único aislado encontrado y que sólo aparecen en una etapa de la vinificación, la etapa del mosto desfangado de bodega (1303-12 y 1310-12) y a la etapa de fermentación tumultuosa (1505-12), dado que existe una cierta probabilidad de pérdida de biodiversidad en la etapa de aislamiento los tres aislados pueden provenir del viñedo.

Cabe destacar que uno de los aislados estudiados, concretamente el 1413-12, tenía un patrón de restricción igual a la cepa control WAM, lo cual se ha comprobado con los resultados de los ensayos bioquímicos, ya que han mostrado respuestas similares en todas las pruebas realizadas (Figura 23), esto se debe a que ambas se aislaron en parcelas del municipio de La Seca.

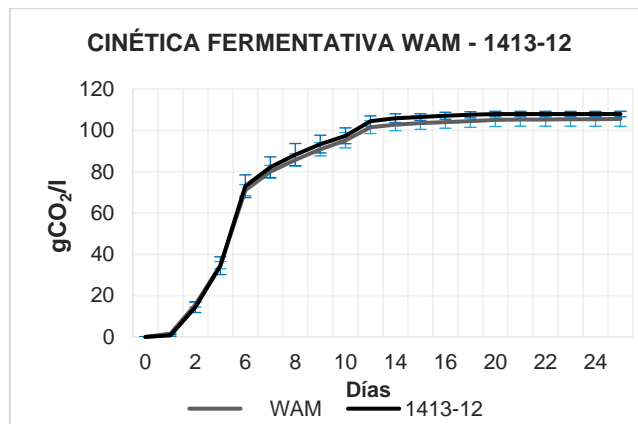


Figura 23. Curva comparativa de cinética fermentativa de las cepas WAM y 1413-12.

## 5.2. Crecimiento en medio líquido

Con respecto al crecimiento en medio líquido, una vez calculado el ratio de floculación, obtenemos los datos representados en la tabla 3, en la cual se observa que solo hay cuatro cepas no floculentas, 1606-12, 1505-12, 1517-12 y 1614-12. Esto sugiere que, a nivel tecnológico, la cepa 1505-12, presente en fermentación, no es tan interesante a pesar de presentar una correcta cinética fermentativa. En cuanto al resto, todas muestran unos resultados similares y adecuados, destacando como más floculentas las cepas 1302-12, 1310-12 y 1313-12, las tres presentes en la fase de

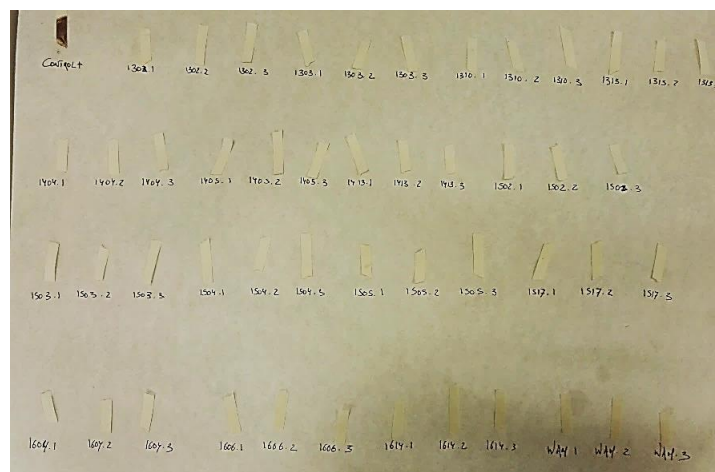
desfangado. Por último, resaltar que las dos cepas señaladas por su mejor cinética fermentativa han demostrado un nivel de floculación correcto.

**Tabla 3.** Resultados crecimiento en medio líquido

Cepas	Ratio	Comportamiento
1606-12	100,0	No floculenta
1505-12	99,4	No floculenta
1517-12	99,4	No floculenta
1614-12	98,3	Ligeramente floculenta
1604-12	84,6	Ligeramente floculenta
1404-12	77,9	Ligeramente floculenta
1502-12	75,2	Ligeramente floculenta
1503-12	74,8	Ligeramente floculenta
1405-12	74,7	Ligeramente floculenta
1413-12	73,4	Ligeramente floculenta
1303-12	73,0	Ligeramente floculenta
1504-12	72,9	Ligeramente floculenta
WAM	70,4	Ligeramente floculenta
1310-12	66,4	Floculenta
1302-12	65,01	Floculenta
1313-12	62,94	Ligeramente floculenta

### 5.3. Producción de SH<sub>2</sub>.

En cuanto a la producción de ácido sulfhídrico en la figura 23 observamos que ninguna de las tiras de papel de acetato de plomo tomó una coloración oscura como la del control, con lo cual determinamos que ninguna cepa ha producido ácido sulfhídrico durante la fermentación y por tanto no será un parámetro determinante.



**Figura 23.** Tiras de papel de acetato de plomo (fuente propia).

#### 5.4. pH.

En la tabla 4 observamos que las variaciones de pH no son significativas, todos los valores se encuentran entre los habituales en un vino blanco una vez ha terminado la fermentación alcohólica, además las diferencias entre los valores de pH producidos por las diferentes cepas son mínimos oscilando entre 3,39 y 3,50, por lo tanto, no será un parámetro que considerar.

**Tabla 4.** Valores de pH tras fermentación alcohólica

<b>Cepas</b>	<b>pH</b>
<b>1413-12</b>	3,50 ± 0,03
<b>1505-12</b>	3,49 ± 0,01
<b>1404-12</b>	3,48 ± 0,04
<b>1606-12</b>	3,48 ± 0,02
<b>WAM</b>	3,48 ± 0,02
<b>1405-12</b>	3,48± 0,02
<b>1502-12</b>	3,47 ± 0,03
<b>1504-12</b>	3,47 ± 0,05
<b>1604-12</b>	3,47 ± 0,02
<b>1503-12</b>	3,47 ± 0,03
<b>1303-12</b>	3,45 ± 0,02
<b>1310-12</b>	3,45 ± 0,02
<b>1614-12</b>	3,45 ± 0,02
<b>1517-12</b>	3,41 ± 0,03
<b>1302-12</b>	3,39 ± 0,01
<b>1313-12</b>	3,39 ±0,05

#### 5.5. Acidez volátil.

Los resultados de acidez volátil (Tabla 5) obtenidos han sido bastante elevados ya que se partía de una cantidad de acético muy elevada para un mosto. Esto puede deberse a la manipulación y la esterilización a vapor fluyente. Por otro lado, son microvinificaciones en matraz cerrado con válvula Müller, por lo que se considera que es un ensayo intracomparativo que permite relacionar unas con otras en esas condiciones. Por lo tanto, la acidez volátil real debería determinarse en las condiciones óptimas de vinificación en bodega.

Sin embargo, a pesar de la alta acidez volátil inicial podemos apreciar que con respecto al control ha subido poco en la mayoría de los casos, exceptuando la cepa 1504-12. Destacamos las cepas 1313-12,1505-12 y 1303-12 por ser aquellas con menor producción de ácido acético, siendo las dos últimas destacadas por su comportamiento fermentativo, junto a la cepa 1310-12, la cual también presenta un bajo nivel de acidez volátil con respecto al mosto inicial, control.

Tabla 5. Resultados acidez volátil

Cepas	Acidez volátil (g/l ácido acético)	Aumento con respecto al control (g/l ácido acético)
<b>Control</b>	0,97 ±0,03	-
<b>1504-12</b>	1,53 ±0,53	0,40
<b>1310-12</b>	1,37 ±0,21	0,29
<b>1405-12</b>	1,21 ±0,32	0,17
<b>1604-12</b>	1,29 ±0,20	0,22
<b>1413-12</b>	1,35 ±0,05	0,27
<b>1606-12</b>	1,26 ±0,13	0,20
<b>WAM</b>	1,23 ±0,13	0,18
<b>1502-12</b>	1,28 ±0,07	0,03
<b>1517-12</b>	1,27 ±0,04	0,21
<b>1614-12</b>	1,24 ±0,04	0,19
<b>1404-12</b>	1,08 ±0,16	0,08
<b>1302-12</b>	1,14 ±0,08	0,12
<b>1503-12</b>	1,10 ±0,11	0,09
<b>1313-12</b>	1,07 ±0,06	0,07
<b>1303-12</b>	0,99 ±0,06	0,01
<b>1505-12</b>	0,98 ±0,06	0,01

### 5.6. Carácter *killer*.

Los resultados del test *killer*/sensible se presentan en la tabla 5, observando que hay cuatro cepas con fenotipo *killer*, 1310-12, 1303-12, 1413-10 y 1517-12 las cuales interesan para facilitar la implantación de dicha cepa frente a otras posibles levaduras, considerando como positivo aquellos casos en los que aparece un halo de inhibición (Izgu *et al.*, 1997) (Figura 24).

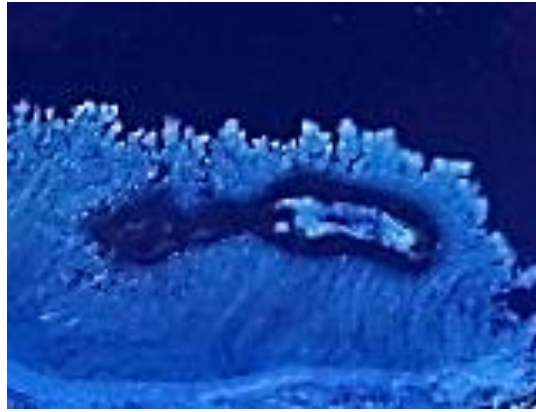
Así todo, no hay que descartar las cepas con fenotipo neutro 1302-12, 1404-12, 1606-12 y 1614-12, ya que de tener un fuerte poder de implantación por si mismas también son de interés.

En cualquier caso, las levaduras menos interesantes serían aquellas con fenotipo sensible ya que son susceptibles a verse inhibidas por otras levaduras *killer*, por lo que finalmente la cepa 1505-12 quedaría descartada, así como otras cepas con buen comportamiento fermentativo como las cepas 1502-12 o 1503-12, presentes en casi todas las etapas de vinificación.

De nuevo encontramos que las cepas 1303-12 y 1310-10 responden adecuadamente al ensayo, mostrando un fenotipo *killer*.

**Tabla 5.** Resultados test killer/sensible.

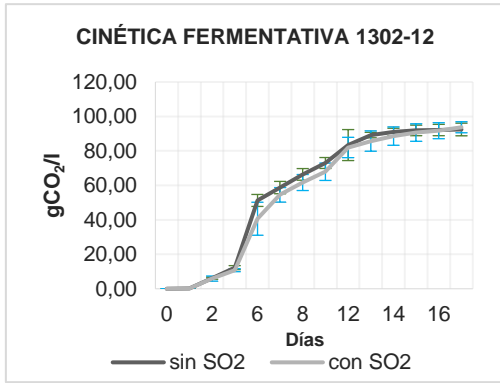
Cepa	Test Killer	Test sensible	Fenotipo
1302-12	K -	R +	Neutra
1303-12	K +	R +	Killer
1310-12	K +	R -	Killer
1313-12	K -	R -	Sensible
1404-12	K -	R +	Neutra
1405-12	K -	R -	Sensible
1413-12	K +	R +	Killer
1502-12	K -	R -	Sensible
1503-12	K -	R -	Sensible
1504-12	K -	R -	Sensible
1505-12	K -	R -	Sensible
1517-12	K +	R +	Killer
1604-12	K -	R -	Sensible
1606-12	K -	R +	Neutra
1614-12	K -	R +	Neutra

**Figura 24.** Respuesta positiva al test *killer*, halo de inhibición.

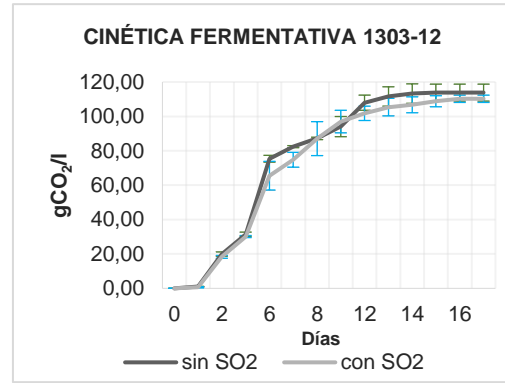
### 5.7. Tolerancia al SO<sub>2</sub>.

Los resultados del ensayo de resistencia al SO<sub>2</sub> han sido satisfactorios para todas las cepas, sin diferencias significativas (Figuras 26-41), lo cual se presenta como una situación ideal. Así todo, se ve como hay algunas cepas que incluso han respondido mejor a la prueba con sulfuroso: 1413-12 (Figura 31) y WAM (Figura 40) con patrones mitocondriales iguales, 1503-12 (Figura 33) y 1606-12 (Figura 38).

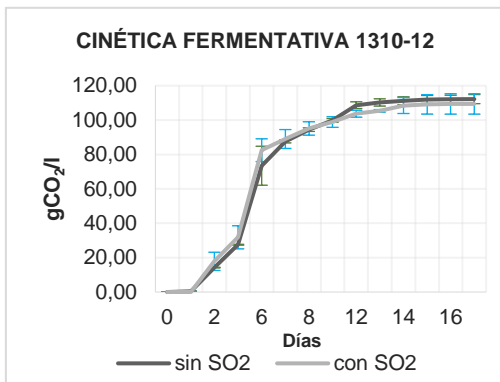




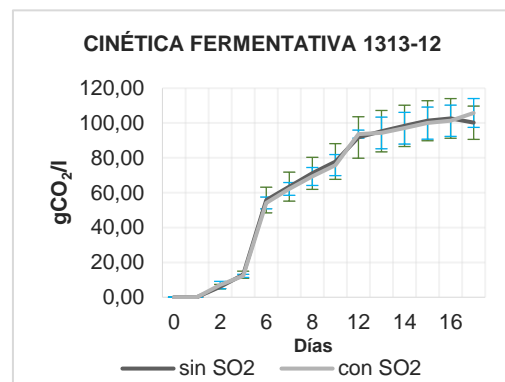
**Figura 25.** Cinética fermentativa con SO<sub>2</sub> y sin SO<sub>2</sub> de la cepa 1302-12.



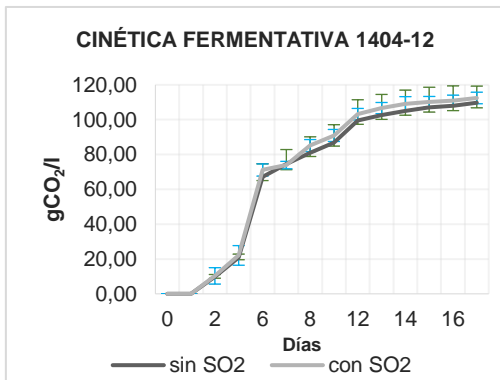
**Figura 26.** Cinética fermentativa con SO<sub>2</sub> y sin SO<sub>2</sub> de la cepa 1303-12.



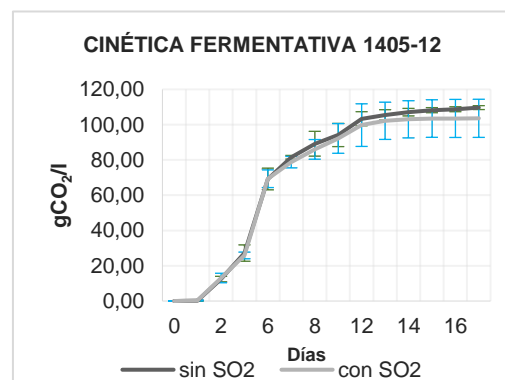
**Figura 27.** Cinética fermentativa con SO<sub>2</sub> y sin SO<sub>2</sub> de la cepa 1310-12.



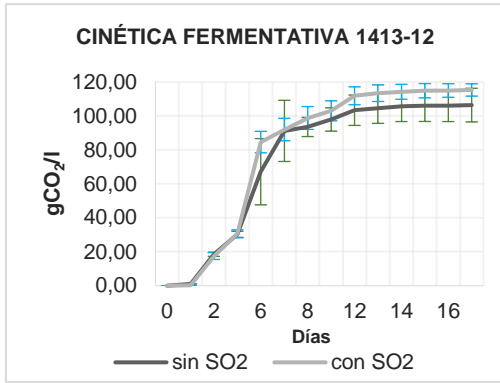
**Figura 28.** Cinética fermentativa con SO<sub>2</sub> y sin SO<sub>2</sub> de la cepa 1313-12.



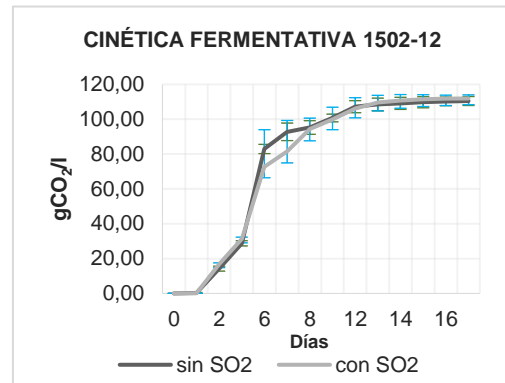
**Figura 29.** Cinética fermentativa con SO<sub>2</sub> y sin SO<sub>2</sub> de la cepa 1404-12.



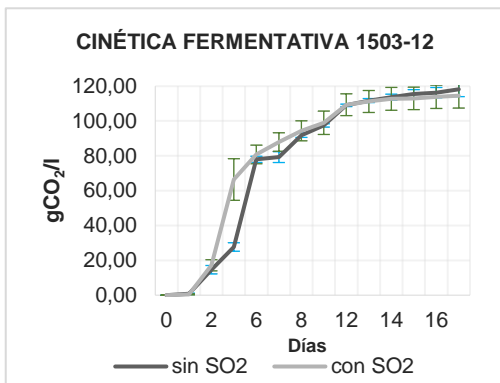
**Figura 30.** Cinética fermentativa con SO<sub>2</sub> y sin SO<sub>2</sub> de la cepa 1405-12.



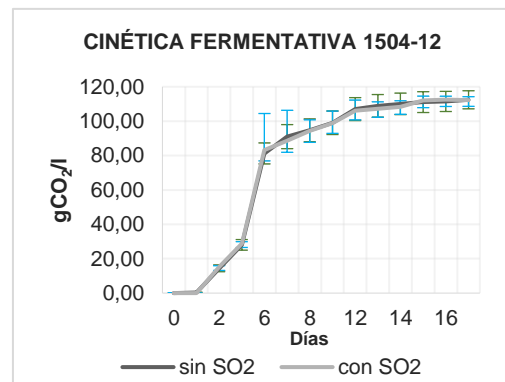
**Figura 31.** Cinética fermentativa con SO<sub>2</sub> y sin SO<sub>2</sub> de la cepa 1413-12.



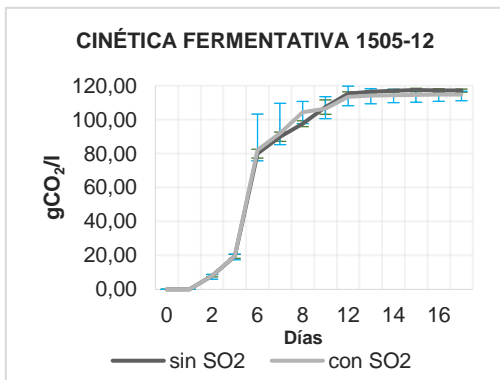
**Figura 32.** Cinética fermentativa con SO<sub>2</sub> y sin SO<sub>2</sub> de la cepa 1502-12.



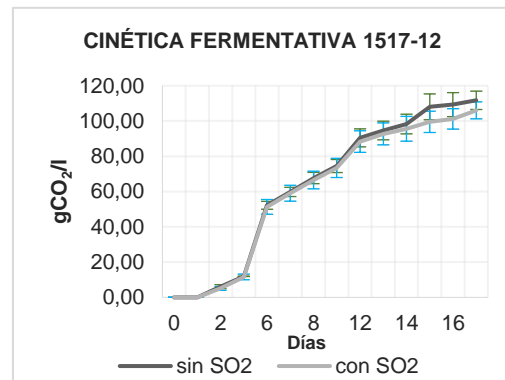
**Figura 33.** Cinética fermentativa con SO<sub>2</sub> y sin SO<sub>2</sub> de la cepa 1503-12.



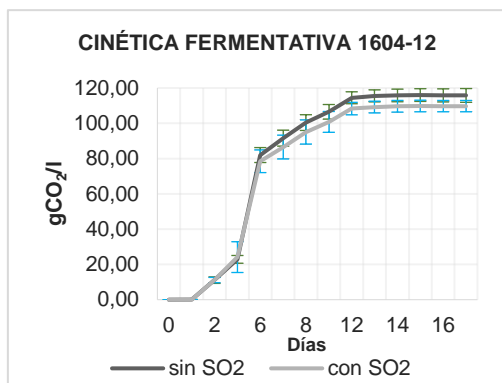
**Figura 34.** Cinética fermentativa con SO<sub>2</sub> y sin SO<sub>2</sub> de la cepa 1504-12.



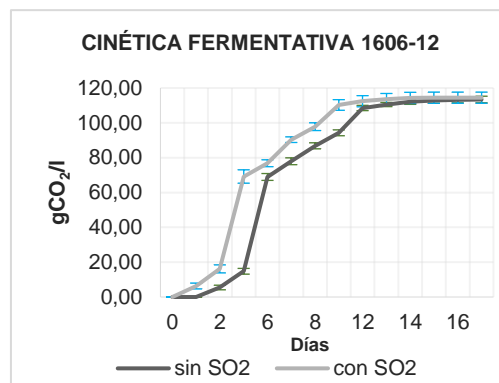
**Figura 35.** Cinética fermentativa con SO<sub>2</sub> y sin SO<sub>2</sub> de la cepa 1505-12.



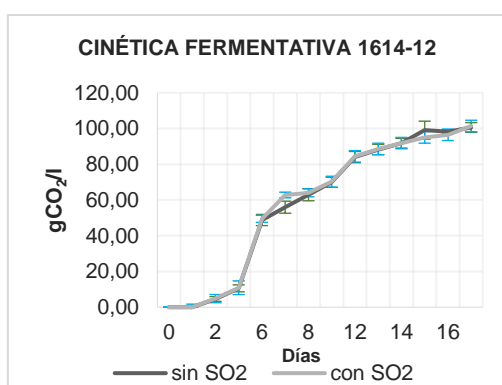
**Figura 36.** Cinética fermentativa con SO<sub>2</sub> y sin SO<sub>2</sub> de la cepa 1517-12.



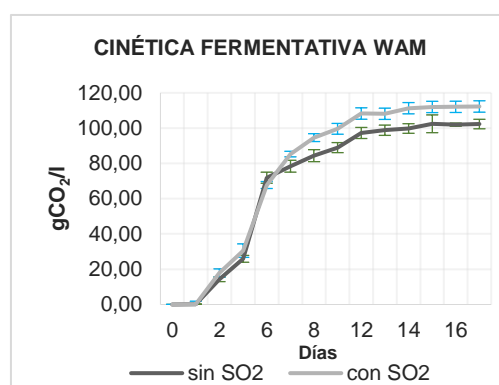
**Figura 37.** Cinética fermentativa con  $\text{SO}_2$  y sin  $\text{SO}_2$  de la cepa 1604-12.



**Figura 38.** Cinética fermentativa con  $\text{SO}_2$  y sin  $\text{SO}_2$  de la cepa 1606-12.



**Figura 39.** Cinética fermentativa con  $\text{SO}_2$  y sin  $\text{SO}_2$  de la cepa 1614.



**Figura 40.** Cinética fermentativa con  $\text{SO}_2$  y sin  $\text{SO}_2$  de la cepa WAM.

## 6. Conclusiones

En el presente estudio se ha realizado una caracterización enológica mediante diversos ensayos bioquímicos de 15 cepas genéticamente diferentes aisladas durante el proceso de vinificación de uva Verdejo, llevado a cabo de manera espontánea en una bodega de la D.O. Rueda. Esta caracterización influirá tanto en la tecnología, y correcto desarrollo del proceso de vinificación, como en las características que influyen en la calidad organoléptica del vino. El objetivo era determinar cuál de todas las cepas respondía mejor a las diferentes pruebas para así poder tenerla en consideración en una futura selección de una levadura adecuada para vinificación de vino blanco en una bodega que trabaja en ecológico.

Una vez analizados los resultados, se llegó a las siguientes conclusiones:

- Hay varias cepas que quedan descartadas por sus resultados negativos en la caracterización, y otras que han presentado resultados intermedios y que sí podrían presentar un correcto comportamiento en vinificación.
- Cabría destacar que la cepa 1413-12 se ha comportado de forma muy similar a la cepa WAM, ya que comparten patrón de restricción del ADN mitocondrial.

- Dos cepas han destacado por un comportamiento fermentativo excelente, con un alto poder y vigor fermentativo, 1303-12 y 1310-12.
- En cuanto a los parámetros que influyen en vinificación, 1303-12 y 1310-12 han mantenido el pH en los valores correctos, con una resistencia al sulfuroso adecuada, floculación y fenotipo *killer*, lo cual beneficia a la hora de implantarse como levadura fermentativa. Por otra parte, en cuanto a los factores organolépticos ninguna de las dos presentó formación de ácido sulfhídrico ni una acidez volátil elevada con respecto al mosto de partida.
- Es reseñable que ambas cepas han sido aisladas y encontradas únicamente en la fase de mosto desfogado, no son las predominantes en fermentación tumultuosa, lo que confirma la necesidad de estudiar la ecología de las levaduras durante todo el proceso fermentativo para obtener cepas adecuadas para su selección.

Esto puede presentarse como una opción muy interesante de cara a la selección de dichas cepas para futuras vinificaciones en ecológico dado el gran potencial demostrado con los extraordinarios resultados obtenidos. Teniendo en cuenta que el estudio pertenece a un proyecto de caracterización mayor se tienen buenas expectativas con vistas a la selección final de una cepa óptima, proveniente de cualquier etapa de la vinificación.

## 7. Bibliografía

- Arruda, G., Grochoski, M., Sartori, GF., Gomes, TA., Wosiacki, G., Nogueira, A. Viability of *Hanseniaspora uvarum* yeast preserved by lyophilization and cryopreservation. *Yeast*. 2015. 2015; 32: 559–565
- Álvarez-Pérez, JM. Campo, E., San-Juan, F.; Coque, JJ.; Ferreira, V., Hernández-Orte, P. Sensory and chemical characterization of the aroma of Prieto Picudo rosé wines: The differential role of autochthonous yeast strains on aroma profiles. *Food Chemistry*. 2012; 133: 284-292.
- Capece, A., Romaniello, R., Siesto, G., Pietrafesa, R., Massari, C., Poeta, C., Romano, P. Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for Nero d'Avola wine and evaluation of selected starter implantation in pilot fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 2010; 144: 187-192.
- Di Maio S, Polizzotto G, Gangi E Di, Foresta G, Genna G, Scacco A, et al. Biodiversity of Indigenous *Saccharomyces* Populations from Old Wineries of South-Eastern Sicily (Italy): Preservation and Economic Potential. *PLOS ONE*. 2012; 7(2).
- Díaz C, Molina AM, Nähring J, Fischer R. Characterization and Dynamic Behavior of Wild Yeast during Spontaneous Wine Fermentation in Steel Tanks and Amphorae. *BioMed Research International*. 2013; 2013.
- Fernández-Espinar, MT., Barrio, E., Querol, A. RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2000; 78(1):87–97.
- Fugelsang, C., Edwards CG. *Wine Microbiology (Practical Applications and Procedures)*. 2nd ed. New York: Springer; 2007.
- García BJ. *Técnicas analíticas para vinos*. Barcelona: Gab; 1990.
- Ilieva F Dimovska V, Mirhosseini H., Kostadinovic S, Spasov H. Selection of 80 newly isolated autochthonous yeast strains from the Tikveš region of Macedonia and their impact on the quality of red wines produced from Vranec and Cabernet Sauvignon grape varieties. *Food Chemistry*. 2017; 216:309–15.
- Izgu, F., Altınbay1, D., Yu, A. Identification and killer activity of a yeast contaminating starter cultures of *Saccharomyces cerevisiae* strains used in the Turkish baking industry. *Journal of Food Microbiology*. 1997; 125–31.
- Linderholm, AL., Findleton, CL., Kumar, G., Hong, Y., Bisson, LF. Identification of genes affecting hydrogen sulfide formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008; 74: 1418-1427.
- López, V., Querol, A., Ramón, D., Fernández-Espinar, MT. A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts. *International Journal of Food Microbiology*. 2001; 68, 75-81.
- Rodríguez, ME. *Análisis Genómico y Molecular de Levaduras Vínicas. Aplicación a la Mejora del Proceso de Fermentación de Vinos mediante Selección de Levaduras Autóctonas*. Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz. 2007. 308.

- Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV). Directrices para la caracterización de levaduras de vino del género *Saccharomyces* aisladas de ambientes vitivinícolas. Resolución OIV-OENO 370-2012. 2012; 1–31.
- OIV, (2011) Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV). Herramientas de biología molecular para identificar la levadura de vinificación. Resolución OIV-OENO. 2011; 408-2011;1–7.
- Pretorius, I. S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the Ancient art of winemaking. *Yeast*. 2000; 16: 675-729.
- Pretorius I.S, Bauer FF. Meeting the consumer challenge through genetically customized wine-yeast strains. *Trends Biotechnol*. 2002; 20(10):426–32.
- Querol, A., Barrio, E., & Ramón, D. A comparative study of different methods of yeast strain and characterization. *Systematic Applied Microbiology*. 1992; 15, 439-446.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. *Handbook of Enology. The Microbiology of Wine and Vinifications. Vol.1.* 2nd ed. Chichester: John Wiley & Sons; 2006.
- Simó, G. Influencia del terruño y la meteorología en la población de las levaduras de los viñedos de la variedad Verdejo de D.O. Trabajo fin de grado. Universidad de Valladolid. 2013. 197
- Suárez Lepe, JA, Iñigo Leal, B. *Microbiología enológica: fundamentos de vinificación.* 3rd ed. Madrid: Mundi-Prensa; 2004.