



Universidad de Valladolid

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍAS
AGRARIAS

Grado en Enología

**Selección y caracterización de levaduras no –
Saccharomyces en la D.O. Rueda para
vinificación de uva Verdejo.**

Alumna:

Pelayo Martínez, Ángela

Tutoras:

Vila Crespo, Josefina

Ruipérez Prádanos, Violeta

Junio de 2021

ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Levaduras no- <i>Saccharomyces</i>	4
1.2. Selección de levaduras	5
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	6
3. MATERIALES Y MÉTODOS	7
3.1. Aislamiento y selección	7
3.2. Interacción entre levaduras	8
3.2.1. Carácter <i>killer</i>	8
3.2.2. Interacción no – <i>Saccharomyces / Saccharomyces</i>	8
3.3. Caracterización enzimática	9
3.3.1. Ensayo de actividad β – glucosidasa	9
3.3.2. Ensayo de actividad proteasa.....	9
3.3.3. Ensayo de actividad β – glucanasa	10
3.3.4. Ensayo de actividad β – liasa	10
3.4. Caracterización enológica.....	11
3.4.1. Mosto base.....	11
3.4.2. Microvinificaciones	11
3.4.3. Análisis básico	12
4. RESULTADOS	13
4.1. Aislamiento e identificación.....	13
4.2. Interacción entre levaduras	17
4.2.1. Carácter <i>killer</i>	17
4.2.2. Interacción no – <i>Saccharomyces / Saccharomyces</i>	17
4.3. Actividad enzimática	18
4.3.1. Ensayo de actividad β – glucosidasa	18
4.3.2. Ensayo de actividad proteasa.....	18
4.3.3. Ensayo de actividad β – glucanasa	19
4.3.4. Ensayo de actividad β – liasa	20
4.4. Microvinificaciones.....	20
5. CONCLUSIONES	23
REFERENCIAS	24

RESUMEN

En los últimos años existe cierta uniformidad en las características organolépticas de los vinos elaborados con la variedad Verdejo en la D.O. Rueda. Es por eso por lo que cada bodega busca diferenciarse cada vez más, ya sea innovando en sus métodos de elaboración o en el campo microbiológico. En este último entrarían en juego las levaduras no – *Saccharomyces* que, si bien hasta hace poco no se tenían en consideración, actualmente se ha demostrado que hay una gran variedad de ellas que son capaces de aportar características diferentes. Además, también se busca que la utilización de este tipo de levaduras contribuya a la disminución del grado alcohólico, pues otra de las problemáticas actuales, ocasionada por el cambio climático, es la elevada concentración de azúcar en las uvas y, por consiguiente, un grado alcohólico muy alto para vinos elaborados con la variedad Verdejo.

En el presente trabajo se ha realizado un aislamiento e identificación de levaduras no – *Saccharomyces* procedentes de un viñedo de la variedad Verdejo ubicado en La Seca y perteneciente a la D.O. Rueda. Tras dicho aislamiento, se determinará la aptitud enológica y se llevará a cabo una caracterización de las levaduras aisladas con posible interés enológico.

ABSTRACT

In the last few years there has been a certain uniformity of organoleptic characteristics in the Verdejo wines elaborated in Rueda D.O. This is the reason why each winery is looking for differentiation by innovating in its winemaking methods or in the microbiological field. In the latter is when non – *Saccharomyces* yeasts can be used. Although until recently they had not been taken into account, it has now been demonstrated that there is a great variety of them that are capable of providing different characteristics. In addition, it is also sought that the use of this type of yeast contributes to the reduction of the ethanol content, because another of the current problems, caused by climate change, is the high concentration of sugar in the grapes and, consequently, a very high ethanol content of wines made with the Verdejo variety.

In the present work, several non – *Saccharomyces* yeasts from a Verdejo vineyard located in La Seca and belonging to the D.O. Rueda have been isolated and identified. After this isolation, the oenological aptitude was determined and a characterization of the isolated yeasts with possible oenological interest was carried out.

1. INTRODUCCIÓN

El cambio climático es uno de los mayores retos a los que la humanidad tendrá que enfrentarse en las próximas décadas, de acuerdo con los informes del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC). La liberación a la atmósfera de CO₂ y otros gases de efecto invernadero es considerada la principal causa del cambio climático y, en particular, del calentamiento global [1, 2]. Esto ha ocasionado que durante el siglo XX la temperatura promedio haya aumentado entre 0,5 y 1°C. Para finales del siglo XXI, sin embargo, se espera que los niveles de CO₂ en la atmósfera se incrementen, lo que puede ocasionar un aumento de entre 0,2 y 0,3°C por década [3]. Atendiendo a los registros de las zonas vitivinícolas europeas, se puede ver cómo entre los años 1950 y 2000 la temperatura media ha aumentado entre 1,6 y 1,8°C [4].

El crecimiento de las plantas y muchos procesos de desarrollo están fuertemente influenciados por las fluctuaciones de la temperatura ambiente. Las temperaturas extremas se encuentran entre los factores limitantes más importantes para la distribución de la vid [5] y es que, aunque la vid tiene una buena capacidad para adaptarse a los cambios ambientales, las temperaturas excesivamente altas u olas de calor muy prolongadas pueden afectar de forma permanente tanto a su rendimiento como a su fisiología [6]. Es por esto por lo que el principal impacto del calentamiento global afecta a la fenología de las plantas, y de hecho el desarrollo de los estados fenológicos se utiliza como indicador natural del estrés por calor, pudiéndose medir los cambios ambientales en las etapas de desarrollo más críticas, como serían la floración, el envero y, por supuesto, la maduración de las bayas. [7, 8, 9]. Por tanto, en los próximos años se puede esperar un avance importante en la mayoría de las etapas fenológicas, aunque la duración de cada etapa depende también, evidentemente, del tipo de suelo y de la variedad de uva [3, 9]. Un envero demasiado temprano conllevaría una maduración precoz de las uvas, lo que puede tener un impacto negativo en la calidad de las bayas. La maduración temprana da como resultado la pérdida de la tipicidad del vino, cambios en el carácter aromático y pérdida del equilibrio entre el azúcar y la acidez del mosto [8].

El cambio de temperatura ocasionado por el calentamiento global provocará cambios también en la composición de las bayas. Dicha composición es bastante compleja, ya que comprende multitud de compuestos diferentes: agua, azúcares fermentables, ácidos orgánicos, compuestos nitrogenados, minerales, pectinas, compuestos fenólicos y compuestos aromáticos. El metabolismo de las plantas – y, por tanto, la composición posterior de las uvas – depende sobre todo de la temperatura ambiente. Las temperaturas muy altas alteran varias vías metabólicas, dando lugar a cambios en la biosíntesis de compuestos básicos que afectan a la calidad del mosto [10]. En concreto, se espera que el aumento de temperatura reduzca la acidez y aumente el contenido de azúcar de las bayas; esto dará lugar a vinos descompensados, ya que tendrán un contenido en alcohol más elevado y, además, se destacarán por su escasa acidez y compuestos aromáticos. [9, 11]. De hecho, hablando solamente del grado alcohólico, muchos de los vinos que solían tener un 11% -12% vol. de etanol en la década de 1980, actualmente tienen entre 13% y 14% vol. [12].

Para las variedades más comunes, la temperatura ideal durante la etapa de maduración de la uva para la formación óptima de compuestos aromáticos está dentro del rango de 20 y 22 ° C [10]. En este grupo, por tanto, entraría la variedad empleada en este estudio: la Verdejo. Sin embargo, cabe añadir que la combinación de estrés por calor y sequía causa un efecto menor sobre la degradación de antocianinas y azúcares que el estrés causado exclusivamente por las temperaturas elevadas, ya que la deficiencia de agua puede mitigar los efectos nocivos del calor excesivo en la degradación de estos compuestos [13]. Es por todo esto por lo que la exploración y evaluación agronómica de la diversidad autóctona de variedades o clones tolerantes al estrés por calor serían de

particular importancia para la sostenibilidad de la viticultura y la industria del vino [14, 15, 16], así como la aplicación de técnicas que a la hora de vinificar puedan, por ejemplo, contribuir a la reducción del grado alcohólico. Para conseguir esto, se puede recurrir a prácticas como la nanofiltración para la concentración y posterior eliminación de azúcares, o la ósmosis inversa, tanto para concentrar azúcares en el mosto como para la eliminación del alcohol en el vino final [17, 18, 19]. También se puede tratar el mosto con enzimas glucosa oxidasas (β -D-glucosa:oxígeno 1-oxidoreductasa), ya que catalizan la oxidación de la β -D-glucosa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, utilizando como aceptor de electrones el oxígeno molecular y reduciendo así el nivel de etanol en el vino [20, 21]. Sin embargo, la práctica ideal (y uno de los principales motivos para la realización de este estudio) para respetar al máximo la integridad del mosto/vino, sería la utilización de levaduras no-*Saccharomyces*, no sólo por el potencial de estas levaduras para disminuir el grado alcohólico, sino también por su papel sobre las propiedades organolépticas del vino [22].

Por otro lado, la cantidad de variedades de uva autorizadas y levaduras comerciales tanto en Europa como en España y, dentro de lo que nos ocupa en este estudio, en la Denominación de Origen Rueda, es limitada. Es por esto y por todo lo explicado en los párrafos anteriores, por lo que el estudio de la diversidad microbiológica con aplicaciones enológicas representa un campo de investigación bastante amplio. El uso de diferentes levaduras para mejorar enológica y sensorialmente las propiedades de los vinos es, pues, una estrategia prometedora para su diferenciación, haciéndolos así, de paso, más competitivos en el mercado [23, 24].

1.1. Levaduras no-*Saccharomyces*

Las fermentaciones espontáneas son un proceso complejo durante el cual actúan de forma secuencial diferentes tipos de levaduras, tanto *Saccharomyces* como no-*Saccharomyces* [25]. Estas últimas están siempre presentes durante las primeras etapas de la fermentación alcohólica, pero debido a las condiciones del mosto (bajo pH, alta concentración de azúcares que se convierten gradualmente en etanol, adición de anhídrido sulfuroso, condiciones anaerobias...) sólo sobreviven las especies que están mejor adaptadas a éstas; es por eso por lo que *Saccharomyces* suele terminar desplazando a las demás levaduras [26, 27] y toma el control de la fermentación alcohólica, debido a que es la especie con más tolerancia al etanol [28, 29].

Las levaduras no-*Saccharomyces* suelen predominar en las primeras etapas de la fermentación alcohólica, hasta que se alcanza un 5-6% de contenido de etanol [30]. Así mismo, estas levaduras también suelen tener efecto Crabtree negativo, esto es, que en las primeras etapas de la fermentación son capaces de metabolizar azúcares por respiración siempre que haya una cantidad suficiente de oxígeno. Es por eso por lo que la inoculación de levaduras no – *Saccharomyces* en estas primeras etapas podría conducir a menores producciones de etanol [31]. Además, ciertas cepas de algunas levaduras no – *Saccharomyces* también tienen la capacidad de modificar la acidez, incrementar la estabilidad colorante y modificar algunos compuestos aromáticos presentes en los vinos [25]. Comúnmente se asocia, de hecho, un perfil floral, frutal y con ciertos toques de nuez con las fermentaciones realizadas por las levaduras no-*Saccharomyces* [32].

Esta modificación del perfil aromático es gracias a la capacidad de este tipo de levaduras para producir enzimas que, interactuando con ciertos componentes del mosto – vino pueden mejorar algunas fases del proceso de vinificación como la maceración, la filtración o la clarificación, además de liberar ciertos aromas que hacen que cambien las características organolépticas finales. [33]. Es por eso por lo que el empleo de las

levaduras no – *Saccharomyces* también es interesante en este aspecto, si bien es verdad que no todas esas enzimas van a ser completamente efectivas bajo las condiciones de la vinificación. Por todo esto, hay que tener en cuenta las ventajas que aportan las levaduras no – *Saccharomyces* y que no se consiguen empleando levaduras del género *Saccharomyces* y viceversa [34 – 36]. Llevar a cabo una fermentación exclusivamente con levaduras no – *Saccharomyces* es arriesgado, ya que pueden producir problemas en cuanto a su implantación y/o a la hora de finalizar la fermentación, ya que la mayoría poseen una baja resistencia a ciertas concentraciones de etanol y no tienen un poder fermentativo muy elevado [32, 41]. Además, también existe el riesgo de que produzcan compuestos indeseados que a la larga perjudiquen en la elaboración del vino [26, 37 – 40]. Por eso, en los últimos años se vienen realizando fermentaciones con cultivos mixtos, involucrando los dos tipos de levaduras y solventando así las carencias de cada una. De esta forma, con el cultivo mixto, se puede llevar a cabo una fermentación controlada sin renunciar a la diferenciación de los vinos. Esto se puede llevar a cabo inoculando ambos cultivos de forma simultánea o haciéndolo de forma secuencial. En el primer caso se inocularían las dos levaduras al mismo tiempo, mientras que en el segundo las levaduras no-*Saccharomyces* se inoculan primero y, tras un periodo determinado, se inoculan las levaduras *S. cerevisiae* [42].

1.2. Selección de levaduras

Para la realización de cultivos mixtos es importante primero saber con qué levaduras se va a realizar, ya que no todas las levaduras no – *Saccharomyces* tienen las mismas características y por eso es necesario realizar una selección. Para realizar dicha selección es interesante conocer el carácter de las levaduras de cara al proceso de vinificación, pues hay factores como la resistencia al etanol, su poder fermentativo o el factor *killer* que son determinantes en el proceso de vinificación. La mayoría de estas levaduras, de hecho, no tienen una elevada tolerancia a niveles altos de etanol y tienen una capacidad fermentativa lenta, por lo que no suelen permanecer activas más allá de las primeras etapas de la fermentación. Además, el fenotipo *killer* también es importante conocerlo porque puede causar problemas de incompatibilidad con las levaduras presentes en el cultivo mixto [43]. Algunas levaduras secretan toxinas que son letales para las levaduras que no son resistentes a ellas. Dichas toxinas están categorizadas de K1 a K10, aunque la más importante es la K2, y es la que se evalúa cuando se habla de fenotipo *killer* como tal. El resto de ellas se testan haciendo ensayos de interacción entre las levaduras que van a componer el cultivo mixto y, de esta manera se ve si son compatibles entre sí y se realiza una selección dependiendo de esa consonancia.

Como ya se ha comentado, las levaduras no – *Saccharomyces* tienen la capacidad de producir una serie de enzimas que intervienen en el proceso de vinificación de una forma u otra, ya sea facilitando algún tipo de operación o liberando aromas [33]. Es por eso por lo que también es importante conocer la actividad enzimática de las levaduras que se van a emplear y por lo que éste es otro de los criterios que se emplean a la hora de seleccionar las levaduras. Algunas de las enzimas más importantes a la hora de caracterizar levaduras son: β – glicosidasas, proteasas, β – glucanasas y β – liasas. La importancia de cada una de ellas se detalla más adelante en el punto 3.3., referente a la caracterización enzimática.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Por un lado, la problemática planteada es la de la diferenciación de los vinos y, como se ha dicho previamente, una de las maneras de poder lograrlo es el empleo de levaduras autóctonas, es decir, las levaduras que se encuentran en la uva de manera natural. Esto hay dos maneras de hacerlo: realizando fermentaciones espontáneas o realizando una selección de dichas levaduras. Lo primero conlleva una serie de riesgos, ya que no se sabe qué levaduras están fermentando exactamente y se pueden producir paradas de fermentación o la producción de compuestos indeseables como, por ejemplo, ácido acético en exceso. Por tanto, para poder fermentar con levaduras autóctonas sin exponer al mosto – vino a sufrir nada de eso, se puede realizar una selección de las mismas. De esta forma no se pierde la tipicidad propia de cada viñedo, se potencian más los caracteres varietales que utilizando levaduras comerciales y se realizan fermentaciones de forma controlada y sin poner en peligro la integridad del mosto – vino.

Por otro lado, ciertas cepas de levaduras pueden disminuir el grado alcohólico de los vinos, ya que pueden seguir rutas metabólicas diferentes a la fermentación que hacen que la producción de etanol no sea tan alta. Lo mismo ocurre con la acidez, que se puede modificar dependiendo de si la cepa de levadura que se utiliza produce unos metabolitos u otros. Esto se constata principalmente realizando vinificaciones con las levaduras que se quieren seleccionar, primero a escala más pequeña y, posteriormente, en volúmenes más grandes.

El objetivo principal de este estudio es aislar y caracterizar diferentes levaduras no – *Saccharomyces* de las primeras etapas de fermentación de mosto de la variedad Verdejo, para así poder evaluar su potencial interés enológico.

Para ello se plantean los siguientes objetivos secundarios:

- Caracterización enzimática de las diferentes levaduras aisladas.
- Caracterización *killer* de las levaduras aisladas para evitar problemas de incompatibilidad.
- Estudio de la cinética fermentativa de las levaduras aisladas, tanto en solitario como en cultivo mixto con levaduras del género *Saccharomyces*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Aislamiento y selección

Para el aislamiento de levaduras en el estudio se llevó a cabo un muestreo en campo, en una parcela ubicada en el municipio de La Seca (Valladolid). Las uvas seleccionadas estaban en su punto idóneo de maduración, ya que se vendimió la parcela el mismo día que se realizó la recogida de muestras. Esta recogida se realizó de la siguiente manera: la forma de la parcela no era regular, por lo que se dividió en secciones para que el muestreo fuera lo más representativo posible. Dentro de estas secciones, se cogieron uvas cada 2 líneas, tanto de la parte sombreada como de la parte soleada y procurando que las cepas de las que se cogían las uvas estuvieran distribuidas uniformemente a lo largo de la calle. Por último, dentro de cada racimo, se cogieron uvas de la parte de arriba, de la central y de la de abajo. Dicho muestreo se realizó en condiciones asépticas, utilizando bolsas estériles y siendo trasladadas inmediatamente al laboratorio, donde se mantuvieron a 4°C hasta su estrujado. Éste se llevó a cabo en un digestor, también en condiciones asépticas. Acto seguido, parte de esta pasta se filtró. En este momento, se realizaron cuatro experiencias distintas. Por un lado, se dejó fermentar durante 7 días parte del mosto filtrado (M7) y el mosto con la pasta (P7), ambos a 21°C. Por otro lado, se tomó una muestra de mosto recién estrujado y filtrado (MRE) y se dejó fermentar 48 horas, también a 21°C (M48h).

El aislamiento de las levaduras, se realizó en medio sólido YPD (extracto de levadura-peptona-dextrosa) en placas de Petri. Para la elaboración de este medio de cultivo se utilizó: 2% (p/v) de glucosa (Labkem), 2% (p/v) de peptona (Panreac), 1% (p/v) de extracto de levadura (Labkem) y 1,5% (p/v) de agar (Bacto™, BD). Previamente a su utilización, el medio se esterilizó durante 20 minutos y a una temperatura de 121°C en el autoclave.

Dicho aislamiento se realizó en una cabina de flujo laminar (INDELAB) mediante siembra en profundidad del mosto y diluciones del mismo: hasta 10⁻³ para el mosto recién estrujado y para el mosto que fermentó durante 7 días y hasta 10⁻⁷ para el mosto que se dejó fermentar 48 horas y para el mosto que fermentó con la pasta durante 7 días. Las placas se mantuvieron en una estufa a 21°C durante una semana y, pasado este tiempo, se aislaron todas las colonias posibles en placas de Petri independientes con YPD sólido. Posteriormente se realizaron nuevos pases a agar inclinado para su conservación y empleo en este estudio, también con medio YPD sólido.

Para descartar las levaduras del género *Saccharomyces*, se realizó una siembra en un medio de cultivo de lisina modificado. Para la elaboración de este medio se utilizó base carbonatada de levaduras (Difco™) al 1,8% (p/v), lisina – HCl (EMD Millipore corporation) al 0,25% (p/v) y un 2% (p/v) de agar (Bacto™, BD). Previamente a su utilización, el medio se esterilizó durante 20 minutos a vapor fluyente en el autoclave.

Las placas de Petri permanecieron 10 días en la estufa y, pasados éstos, se realizó una estimación visual de su crecimiento.

Las placas de Petri con medio YPD sólido que contenían las colonias aisladas de las levaduras se enviaron al Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León para su identificación mediante métodos moleculares, donde se aisló el ADN de cada cultivo y, mediante PCR se realizó la amplificación de la región ribosomal D1/D2 del gen ARN 26S para su posterior secuenciación (RESOLUCIÓN OIV-OENO 408-2011). Posteriormente se comparó la secuencia genética con las existentes en la base de datos GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para identificar las levaduras a nivel de especie.

3.2. Interacción entre levaduras

3.2.1. Carácter *killer*

El test *killer* se realizó con el objetivo de comprobar la capacidad de producción de toxina K2 por parte de la levadura aislada, además de su sensibilidad a esta. Para ello se prepararon placas de Petri con un medio de cultivo compuesto por: 0,1% (p/v) de extracto de levadura (Labkem), 0,2% (p/v) de bactopectona (Panreac), 0,2% (p/v) de glucosa (Labkem) y 0,35% (p/v) de agar (Bacto™, BD). Se acidificó con ácido cítrico hasta alcanzar un pH comprendido entre 4,2-4,7 posteriormente se añadieron: 2% (v/v) de azul de metileno al 1% (v/v) (Panreac) y 1% (v/v) de tampón citrofosfato 2M (Panreac) [44]. Antes de utilizarlo, el medio de cultivo se esterilizó durante 20 minutos a 121°C a vapor fluyente en el autoclave.

Este ensayo consta de 2 partes:

- Test *killer*: se preparó una suspensión de la cepa sensible *Saccharomyces cerevisiae* en agua estéril, se agitó y se realizó una siembra en profundidad con el medio descrito en el párrafo anterior. En el caso de este estudio, como cepa sensible se utilizó la CECT 1443 (*Saccharomyces cerevisiae*). Posteriormente se realizó una siembra en estría con la levadura aislada a estudiar y se incubaron las placas de Petri en la estufa a 25°C durante 7 días.
- Test sensible: el procedimiento es igual que el anterior, pero en este caso, la suspensión se realizó con la levadura aislada que se quiere estudiar y fue ésta la que se sembró en profundidad para, posteriormente, sembrar en estría con una levadura *Saccharomyces cerevisiae* con factor *killer*. En el caso de este estudio, la levadura K+ fue la CECT 1414 (*Saccharomyces cerevisiae*).

Cada experimento se realizó por triplicado y, además, también se preparó un control (duplicado) con las levaduras CECT 1443 y CECT 1414 para poder observar adecuadamente la aparición de algún tipo de halo en torno a las colonias de las levaduras sembradas en estría que confirmase que el test era positivo [44].

3.2.2. Interacción no – *Saccharomyces* / *Saccharomyces*

El objetivo de este ensayo es comprobar la compatibilidad entre las levaduras no – *Saccharomyces* aisladas en este estudio y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* con la que se pretende realizar las inoculaciones, tanto simultánea como secuencial. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* que se va a emplear se comercializa con el nombre de WAM (Lallemand) y fue aislada en 1998 en la ETSIIAA de Palencia. Dicha levadura fue aislada también de viñedos pertenecientes a la Denominación de Origen Rueda y es por lo que se emplea en la realización de este estudio, ya que es especialmente interesante utilizar cultivos mixtos con levaduras que provengan de la misma zona, puesto que así se potencia mucho más la diferenciación de los vinos finales tras su empleo en el proceso de vinificación, pero sin perder la tipicidad de esa región.

Para realizar la prueba de interacción se prepararon placas de Petri con el medio explicado en el punto 3.2.1 y se llevó a cabo un procedimiento bastante similar al utilizado para determinar el carácter *killer*. Cada experimento se realizó por triplicado.

Por un lado, se preparó una suspensión de WAM en agua estéril, se agitó y se sembró en profundidad con el medio de cultivo. Sobre el medio solidificado se realizó una siembra en estría con la levadura no – *Saccharomyces* aislada.

Por otro, se preparó una suspensión de la levadura aislada que se quiere caracterizar, se agitó y se realizó la siembra en profundidad con ella para, posteriormente, realizar la siembra en estría con la levadura WAM.

3.3. Caracterización enzimática

3.3.1. Ensayo de actividad β – glucosidasa

Las enzimas β -glucosidasas hidrolizan los precursores aromáticos que están ligados a azúcares presentes en el vino. Dichos precursores pueden ser terpenos, norisoprenoides y fenoles volátiles y, cuando se hidrolizan, se liberan aromas propios de cada variedad. La variedad de estudio, que es la Verdejo, es bastante pobre en este tipo de compuestos ya que corresponden a aromas más típicos de variedades como la Moscatel, la Riesling, la Gewürztraminer o la Albariño, que presentan perfiles más florales, minerales, cítricos o balsámicos [45].

Para valorar tanto la presencia de la enzima β -glucosidasa como su actividad se utilizó el método descrito por Diddens y Lodder, utilizando placas de Petri. El medio de cultivo para esta prueba se compone de: 0,5 % (p/v) de arbutina (Sigma), 0,1% (p/v) de extracto de levadura (Labkem), 2% (p/v) de agar (Bacto™, BD) y 1% (p/v) de una solución de cloruro férrico (Panreac). El medio se esterilizó durante 15 minutos a una temperatura de 121°C en el autoclave y posteriormente esas placas de Petri se mantuvieron en la estufa a 25°C durante 15 días para, pasado ese tiempo, realizar una observación visual de las mismas. Si la prueba es positiva, aparece una coloración negruzca en el medio de cultivo debido a la capacidad de la β -glucosidasa para hidrolizar la arbutina, ya que es un glucósido.

Se realizaron también controles tanto negativos como positivos. El control positivo se llevó a cabo con *Wickerhamomyces anomalus*, una levadura que fue aislada en el laboratorio de microbiología de la ETSIIAA y que sí presenta actividad β – glucosidasa; por otro lado, control negativo con *Schizosaccharomyces pombe* (CECT 11197), que no posee esta actividad.

3.3.2. Ensayo de actividad proteasa

La importancia de las enzimas proteasas radica en su potencial para degradar las proteínas que pueden causar enturbiamientos en los mostos y producir fuentes de nitrógeno para las levaduras (liberando péptidos, aminoácidos...), ya que una escasez de este elemento puede producir paradas de fermentación. La demanda de nitrógeno aumenta cuanto más alta es la concentración de azúcares en la uva y, como se ha explicado en la introducción, de este estudio, la elevada cantidad de éstos es una problemática que está a la orden del día. Al haber más cantidad de azúcares, por tanto, hacen falta más generaciones de levaduras para poder consumirlos en su totalidad, así que su requerimiento de nitrógeno es mayor, ya que las últimas etapas de la fermentación el medio es muy alcohólico y las levaduras tienen más dificultad para sobrevivir si no tienen los recursos adecuados y finalizar la fermentación por completo. Es por eso por lo que su utilización es interesante, sobre todo en el campo de los vinos blancos [46].

La actividad proteasa se determinó en placas de Petri empleando un medio de cultivo que constaba de: 1% (p/v) de extracto de levadura (Labkem), 2% (p/v) de bactopectona (Panreac), 2% (p/v) de glucosa (Labkem), 2% (p/v) de agar (Bacto™, BD) y 2% (p/v) de leche desnatada en polvo [47]. Antes de utilizarlo, el medio se esterilizó durante 20 minutos a 121°C en el autoclave, a excepción de la leche en polvo, que se esterilizó por separado para mezclar ambos componentes posteriormente. Las placas se dejaron incubar en la estufa a 25°C durante 5 días y, transcurrido ese tiempo se realizó una observación visual. La prueba se considera positiva si aparece un halo alrededor de las diferentes colonias de levadura, y esto es porque las enzimas proteasas hidrolizan la caseína.

En este caso los controles empleados fueron, de nuevo, *Wickerhamomyces anomalus* para el control positivo ya que cuenta con actividad proteasa y *Schizosaccharomyces pombe* (CECT 11197) para el control negativo, que tampoco posee este tipo de actividad enzimática.

3.3.3. Ensayo de actividad β – glucanasa

Las enzimas β – glucanasas rompen los glucanos y β – glucanos, liberando así una serie de aromas y reduciendo el amargor y la astringencia de los vinos. Además, estas enzimas también contribuyen a la estabilidad de los vinos, haciendo que sean menos propensos a la oxidación o a sufrir precipitaciones [48]. Esto puede ser de utilidad si la uva está afectada por el hongo *Botrytis cinerea*, ya que sus paredes celulares se componen, en parte, de β – glucanos y éstos hacen que aumente la viscosidad del mosto – vino, dificultando procesos como el desfangado, la clarificación y la filtración. Además, este tipo de enzimas también puede ser de interés a la hora de llevar a cabo una crianza sobre lías. Las paredes celulares de las levaduras también contienen β – glucanos. Cuando estos se desprenden por la acción de las β – glucanasas, las cuales favorecen la autólisis de las levaduras, la pared celular se desintegra. De esta forma, se liberan manoproteínas al medio, las cuales benefician a la estabilidad del vino y mejoran sus propiedades organolépticas.

Para comprobar la actividad β -glucanasa se preparó un medio de cultivo en placas de Petri, utilizando: 1% (p/v) de extracto de levadura (Labkem), 2% (p/v) de bactopectona (Panreac), 2% (p/v) de glucosa (Labkem), 2% (p/v) de agar (Bacto™, BD) y 0,2% (p/v) de betaglucanos de levadura (Megazyme) [46]. El medio se esterilizó durante 20 minutos a una temperatura de 121°C en el autoclave y posteriormente se incubaron las placas en la estufa a 25°C. Pasados los 5 días de incubación, las placas se lavaron con agua destilada y se realizó una tinción con una disolución 0,03% (p/v) de Rojo Congo (Sigma-Aldrich). Esta prueba se considera positiva cuando, después de la tinción, se puede apreciar la formación de halos translúcidos en el lugar donde se encontraban las colonias de levaduras antes de ser eliminadas con el agua estéril. Esto sucede porque las β – glucanasas hidrolizan los glucanos de levadura presentes en el medio.

Los controles empleados en este ensayo también fueron *Wickerhamomyces anomalus* para el control positivo, puesto que es una levadura con actividad β – glucanasa, y *Schizosaccharomyces pombe* (CECT 11197) para el control negativo, ya que no cuenta con esta clase de actividad.

3.3.4. Ensayo de actividad β – liasa

Las enzimas β – liasas también liberan aromas, aunque éstas lo hacen liberando precursores como tioles y mercaptanos, dando así lugar a descriptores como, por ejemplo, frutas tropicales como el mango o cítricos como el pomelo [60]. Sin embargo, este tipo de moléculas son muy sensibles a la oxidación, por lo que es necesario extremar al máximo las precauciones a la hora de realizar operaciones en bodega para minimizarla lo máximo posible. La variedad de estudio, que es la Verdejo, es rica en este tipo de compuestos.

La actividad β -liasa se comprobó con un medio de cultivo selectivo YCB-SMC [49] en placas de petri, aunque con algunas modificaciones. Dicho medio estaba compuesto por: 0,1% (p/v) de Smetil-L-cisteína (Sigma), 1,2% (p/v) de base carbonatada de levadura (Difco™), 0,01% (p/v) de piridoxal-5'-fosfato (Sigma) y 2% (p/v) de agar (Bacto™, BD). El pH del medio se ajustó con ácido clorhídrico hasta alcanzar un valor de 3,5 y todos los componentes del medio, a excepción del agar, se esterilizaron

mediante filtración por una membrana de 0,2µm. El agar, por su parte, se esterilizó durante 20 minutos a una temperatura de 121°C en el autoclave [49] y, posteriormente, se mezcló con el resto del medio.

Las placas se mantuvieron en incubación en la estufa a 25°C y se realizaron otros dos pases a un medio de la misma composición cada 72 horas. El tercer pase es el que se tiene en cuenta a la hora del examen visual para determinar si la prueba es o no positiva, y esto se comprueba observando si el crecimiento es o no significativo.

En este caso, se utilizó la levadura *Schizosaccharomyces pombe* (CECT 11197) para el control negativo, puesto que no cuenta con actividad β – liasa y, para el control positivo, se utilizó *Torulaspora delbrueckii* (CECT 1880), que sí que presenta este tipo de actividad.

3.4. Caracterización enológica

La aptitud enológica de las levaduras aisladas, se determinó mediante microvinificaciones en el laboratorio.

3.4.1. Mosto base

Se empleó mosto de uva de la variedad Verdejo, de una bodega perteneciente a la D.O. Rueda de la vendimia del año 2019. Dicho mosto se trasladó después de su desfogado a la ETSIIAA de Palencia y se conservó congelado a -20°C hasta el momento de su utilización. Una vez se descongeló para su uso, se homogenizó y se esterilizó en el autoclave a vapor fluyente durante 20 minutos. La analítica del mosto base se muestra a continuación, y se llevó a cabo conforme a lo explicado en el apartado 3.4.3.

pH	3,22
AT (g/l TH ₂)	6,11
°Brix	21,2
GAP	12,1%

Tabla 1: Datos del mosto base antes de su inoculación. AT hace referencia a la acidez total y GAP al grado alcohólico probable.

3.4.2. Microvinificaciones

Antes de inocular las levaduras en el mosto, se realizaron pies de cuba de cada levadura que se iba a emplear en el ensayo. Dichos pies de cuba se prepararon en matraces de 50 ml con medio YPD líquido (2% (p/v) de glucosa (Labkem), 2% (p/v) de peptona (Panreac) y 1% (p/v) de extracto de levadura (Labkem)) y se incubaron en la estufa a 21°C. Tras 48 horas de incubación se realizó la estimación de la densidad de población empleando la escala de McFarland, gracias a la cual se puede calcular la población de cada levadura que se va a emplear a la hora de realizar las microvinificaciones.

Se sembró 10⁶ UFC/ml de cada levadura de forma individual mediante inoculación simultánea e inoculación secuencial no – *Saccharomyces* / *Saccharomyces*. Esta inoculación se realizó en una cabina de flujo laminar (INDELAB), para mantener las condiciones asépticas. La inoculación secuencial se llevó a cabo dejando fermentar a la levadura no – *Saccharomyces* en solitario durante 48 horas e inoculando WAM pasado

ese tiempo. Todo el proceso de fermentación tuvo lugar en una estufa a 21°C, las microvinificaciones se realizaron en 50 ml del mosto estéril en matraces Erlenmeyer de 100 ml sellados con una válvula Müller (Figura 1).

Para controlar la fermentación se realizaron pesadas diarias en una balanza de cada matraz desde el día 0 de fermentación hasta que se pudo apreciar una estabilización del peso, que indica que se ha dejado de desprender CO₂ y, por tanto, el final de la fermentación alcohólica. De esta manera es posible evaluar la cinética fermentativa, ya que la variación de peso que sucede durante toda la fermentación corresponde con los gramos de dióxido de carbono que se desprenden y se puede relacionar con la cantidad de etanol generada.

Cada determinación se realizó por triplicado y los resultados se van a expresar como la media aritmética de las tres medidas obtenidas, y el error se va a indicar como la desviación estándar de la muestra.



Figura 1: Microvinificaciones en matraces Erlenmeyer de 100 ml, sellados con válvula Müller.

3.4.3. Análisis básico

Al finalizar las microvinificaciones se realizó el análisis de los parámetros básicos de los vinos resultantes. Los procedimientos empleados para ello fueron los siguientes:

- **pH.** Se determinó con un pHmetro (HACH Sension + pH3), el cual basa su medición en la diferencia de potencial entre dos electrodos sumergidos en la muestra de estudio. OIV-MA-AS313-15.
- **Grado Brix.** Se determinó mediante un refractómetro (ATAGO), el cual indica la concentración de azúcar de un mosto mediante el índice de refracción. OIV-MA-AS2-02.
- **Grado alcohólico probable.** La relación entre el grado Brix y el grado alcohólico probable, es: G.A.P. (% vol) = $(0,6757 \times \text{°Brix}) - 2,0839$.
- **Acidez total.** Se empleó el método potenciométrico, llevando el pH a 7 con una solución de NaOH 0,1 N. OIV-MA-AS313-01.
- **Grado alcohólico (% vol.).** Se determinó por ebulloimetría, utilizando un ebulómetro (GAB). Este método se fundamenta en la notable diferencia entre los puntos de ebullición del agua (100°C) y el alcohol (78°C).
- **Azúcares reductores.** Se utilizó el método Rebelein, el cual se basa en la oxidación de los azúcares residuales del vino mediante una disolución divalente de cobre, en medio alcalino y en ebullición. OIV-MA-AS313-01A.
- **Acidez volátil.** Se determinó por el método de García Tena, el cual se basa en la separación directa o parcial del vino de una fracción del ácido acético contenido en él y posterior valoración con NaOH 0,01 N. OIV-MA-AS313-02.

De nuevo, como cada microvinificación se realizó por triplicado, los resultados se van a expresar como la media aritmética de las 3 medidas obtenidas, y el error se va a indicar como la desviación estándar de la muestra.

4. RESULTADOS

4.1. Aislamiento e identificación

Se aislaron un total de 55 levaduras y, con el fin de descartar las que pudieran pertenecer al género *Saccharomyces* se realizó un pase de todas ellas a placas de Petri con un medio de cultivo de lisina modificado. Las levaduras *Saccharomyces* no crecen en este medio, pero sí lo hacen las levaduras de otros géneros, ya que utilizan la lisina como fuente de nitrógeno para poder desarrollarse.

Tras la incubación de las colonias seleccionadas en el medio de lisina se realizó una estimación visual de su crecimiento (Tabla 2).

NOMENCLATURA	CRECIMIENTO
M7 1	+
M7 2	+
M7 3	+
M7 4	+
M7 5	+
M7 6	+
M7 7	++
M7 8	-
M7 9	+
M7 10	+
M7 11	+
M7 12	++
M7 13	+
M7 14	+
M7 15	+
M7 16	+
M7 17	+
M7 18	-
P7 1	++
P7 2	+
P7 3	++
P7 4	-
P7 5	++
P7 6	-
P7 7	++
P7 8	+
P7 9	-
P7 10	+
MRE 1	+++
MRE 2	+++
MRE 3	-
MRE 4	-
MRE 5	-
MRE 6	-
MRE 7	-
MRE 8	-
M48h 1	+
M48h 2	+
M48h 3	+

Tabla 2 (1/2): Resultados del crecimiento de las levaduras aisladas en un medio de cultivo lisina modificado. Leyenda: - no crecimiento, + crecimiento bajo, ++ crecimiento medio, +++ crecimiento alto.

NOMENCLATURA	CRECIMIENTO
M48h 4	++
M48h 5	-
M48h 6	+
M48h 7	+
M48h 8	+ / ++
M48h 9	+
M48h 10	+
M48h 11	+
M48h 12	+
M48h 13	+
M48h 14	++
M48h 15	++
M48h 16	+
M48h 17	+
M48h 18	-
M48h 19	++

Tabla 2 (2/2): Resultados del crecimiento de las levaduras aisladas en un medio de cultivo lisina modificado. Leyenda: - no crecimiento, + crecimiento bajo, ++ crecimiento medio, +++ crecimiento alto.

A la vez que se realizó el pase al medio de lisina modificado, también se realizó otro pase a placas de Petri con medio YPD sólido para enviarlas al Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León. Sin embargo, hubo algunos problemas de crecimiento por parte de las levaduras en algunas de estas placas, además de las colonias que, como se puede ver en la Tabla 2, no crecieron en el medio de lisina. Es por eso por lo que se envió una primera remesa de placas de Petri para su secuenciación mientras que, por otro lado, fue preciso recuperar placas de pases anteriores de las levaduras con poco crecimiento o crecimiento nulo. Por tanto, se realizó, de nuevo, otro aislamiento y otra secuenciación. Sin embargo, para este segundo aislamiento no se realizó estimación visual de su crecimiento, sino que se enviaron directamente al Laboratorio de Técnicas Industriales de la Universidad de León.

Los resultados de la secuenciación se muestran a continuación:

NOMENCLATURA	ESPECIE
M7 1	<i>Metschnikowia pimensis</i>
M7 2	<i>Metschnikowia pimensis</i>
M7 3	<i>Metschnikowia pimensis</i>
M7 4	-
M7 5	<i>Metschnikowia pimensis</i>
M7 6	<i>Metschnikowia pimensis</i>
M7 7	<i>Clavispora lusitaniae</i>
M7 8	<i>Clavispora lusitaniae</i>
M7 9	<i>Metschnikowia pimensis</i>
M7 10	-
M7 11	<i>Metschnikowia pimensis</i>
M7 12	<i>Clavispora lusitaniae</i>
M7 13	<i>Metschnikowia pimensis</i>
M7 14	-
M7 15	<i>Metschnikowia pimensis</i>

Tabla 3 (1/2): Resultado de la secuenciación e identificación de las levaduras aisladas. Las levaduras marcadas con – no se pudieron secuenciar debido a problemas de crecimiento en las placas con medio YPD.

NOMENCLATURA	ESPECIE
M7 16	<i>Metschnikowia pimensis</i>
M7 17	<i>Metschnikowia pimensis</i>
M7 18	<i>Metschnikowia pimensis</i>
P7 1	-
P7 2	<i>Metschnikowia pimensis</i>
P7 3	<i>Metschnikowia pimensis</i>
P7 4	<i>Metschnikowia pimensis</i>
P7 5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
P7 6	-
P7 7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Cultivo mixto)
P7 8	-
P7 9	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
P7 10	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
MRE 1	<i>Aureobasidium pullulans</i>
MRE 2	<i>Aureobasidium pullulans</i>
MRE 3	<i>Rhodotorula nothofagi</i>
MRE 4	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
MRE 5	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
MRE 6	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (Cultivo mixto)
MRE 7	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (Cultivo mixto)
MRE 8	<i>Metschnikowia pimensis</i>
M48h 1	<i>Metschnikowia pimensis</i>
M48h 2	<i>Aureobasidium pullulans</i>
M48h 3	-
M48h 4	<i>Metschnikowia pimensis</i>
M48h 5	<i>Metschnikowia pimensis</i> (Cultivo mixto)
M48h 6	<i>Metschnikowia pimensis</i>
M48h 7	<i>Metschnikowia pimensis</i>
M48h 8	-
M48h 9	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
M48h 10	<i>Metschnikowia pimensis</i>
M48h 11	<i>Metschnikowia pimensis</i>
M48h 12	<i>Metschnikowia pimensis</i>
M48h 13	<i>Metschnikowia pimensis</i>
M48h 14	<i>Metschnikowia pimensis</i>
M48h 15	<i>Metschnikowia pimensis</i>
M48h 16	<i>Metschnikowia pimensis</i>
M48h 17	<i>Metschnikowia pimensis</i>
M48h 18	<i>Metschnikowia pimensis</i>
M48h 19	<i>Metschnikowia pimensis</i>

Tabla 3 (2/2): Resultado de la secuenciación e identificación de las levaduras aisladas. Las levaduras marcadas con – no se pudieron secuenciar debido a problemas de crecimiento en las placas con medio YPD.

Se han aislado un total de cincuenta y cinco levaduras, de las cuales cuarenta y siete se han podido identificar a nivel de especie. De éstas, el 91,5% resultaron ser levaduras no – *Saccharomyces*, aunque la mayoría no tuviesen apenas potencial enológico.

De los resultados obtenidos, se decidió continuar el estudio con *Hanseniaspora uvarum* (*H. uvarum*) ya que es la que más potencial enológico presentaba según la bibliografía.

Clavispora lusitanae se utiliza en la producción de cachaza y de chucrut [50, 51]. *Aureobasidium pullulans* es uno de los hongos que más abundan en los mostos de uva. Sin embargo, tiene muy poca resistencia al etanol y secreta Aureobasidina A (AbA), que es un compuesto que tiene una potente acción fungicida frente a levaduras del género *Candida* o *Saccharomyces* [52, 53], por lo que se descartó el continuar con esta especie. Las levaduras del género *Rhodotorula* no son levaduras fermentadoras y pueden dar lugar a la transformación de clorofenoles en cloroanisoles, ocasionando problemas organolépticos [54]. De hecho, es muy difícil encontrar algún estudio referente a *Rhodotorula nothofagi* y, por eso, esta levadura también se descartó. Por último, no se ha encontrado ningún estudio que relacione a *Metschnikowia pimensis* con la elaboración de vino, así que también se descartó el continuar con esta especie [55].

Sin embargo, sí se encontraron estudios referentes al empleo de *H. uvarum* en la elaboración de vino como los realizados por Hong y Park (2013) [56], Hu et al. (2018) [57] o Capozzi et al. (2019) [58]. Es una levadura con una alta resistencia al metabisulfito potásico (hasta 500 ppm) y a las concentraciones de azúcar elevadas (hasta 50%) [56]. Además, tiene una baja producción de etanol (4% v/v) [59], lo cual hace que esta levadura sea apta, *a priori*, para solucionar uno de los problemas planteados en este estudio, referente al aumento del grado alcohólico de los vinos en las últimas décadas, aunque se necesitaría emplear un cultivo mixto ya que por ella misma no podría acabar la fermentación.

A la hora de escoger entre las tres levaduras posibles para continuar el estudio, se decidió continuar con M48h 9, ya que tanto MRE 4 como MRE 5 dieron problemas de crecimiento en pases posteriores, por lo que se descartó su uso.

La morfología de *H. uvarum*, se determinó tomando una muestra de las colonias directamente del medio de cultivo con un asa de siembra y se llevaron a una gota de agua estéril depositada en un portaobjetos, extendiendo la colonia sobre el agua y cubriendo toda la preparación con un cubreobjetos. Posteriormente, se realizó la observación en un microscopio (Leica DM750) utilizando los objetivos 40X y 100X.

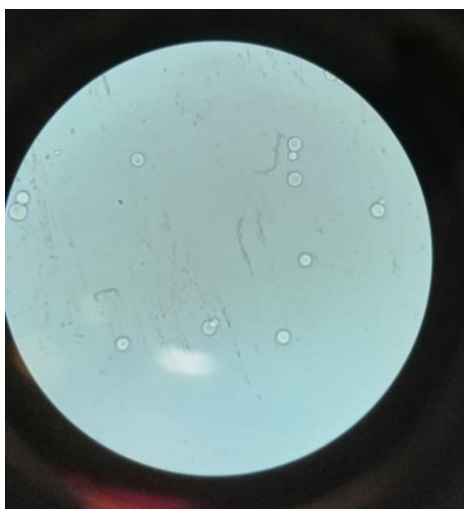


Figura 2: *Hanseniaspora uvarum*. Objetivo de 100X con aceite de inmersión.

Como se puede observar en la Figura 2, la levadura aislada, *H. uvarum*, tiene una morfología esférica.

4.2. Interacción entre levaduras

4.2.1. Carácter *killer*

De acuerdo con la ficha técnica (Uvaferm®) de WAM, ésta tiene fenotipo *killer*. Esto quiere decir que segrega la toxina K2 y que además es resistente a ella. La toxina K2 es letal para todas las levaduras que no son resistentes a ella, lo cual es interesante para eliminar las levaduras indígenas indeseadas. Por eso, para que no haya problemas de antagonismo, es importante conocer el carácter de *H. uvarum*, ya que lo interesante es que sea resistente a dicha toxina para poder utilizar ambas levaduras en un cultivo mixto sin ningún tipo de inconveniente. Existen referencias que hablan de cepas de esta levadura con carácter *killer* y cepas que no cuentan con esta característica [60]. Sin embargo, como la levadura solamente fue identificada a nivel de especie, era necesario realizar este ensayo para conocer exactamente las características de la levadura que ha sido aislada.

Las pruebas se realizaron dos veces, pero ninguna aportó resultados concluyentes, ya que en ambas se dieron dificultades para el crecimiento de las levaduras en el medio de cultivo. Por lo tanto, no se puede extraer ninguna conclusión de este ensayo.

4.2.2. Interacción no – *Saccharomyces / Saccharomyces*

Aunque las levaduras con fenotipo *killer* sean resistentes a la toxina que secretan ellas mismas, no quiere decir que no sean vulnerables ante otro tipo de toxinas. La toxina K2 es la que más producen las levaduras del tipo *Saccharomyces cerevisiae*, pero hay categorizados 10 grupos de actividad *killer* diferentes, tanto para levaduras del género *Saccharomyces* como para las no – *Saccharomyces*: de K1 a K10 [61]. Cuando se realizan cultivos mixtos, ya sea en inoculaciones simultáneas o en inoculaciones secuenciales, es importante comprobar la compatibilidad de las levaduras ya que, si alguna de las dos secreta toxina y la otra no es resistente a ella, repercute negativamente en la implantación de alguna de las dos cepas [62]. Es por eso por lo que es interesante también ver cómo interaccionan las levaduras que se van a emplear en el estudio entre ellas y ver si se inhiben mutuamente de alguna manera.

Esta prueba también se realizó dos veces. Los resultados obtenidos del ensayo para comprobar la interacción entre WAM y *H. uvarum* se pueden apreciar en la Figura 3.

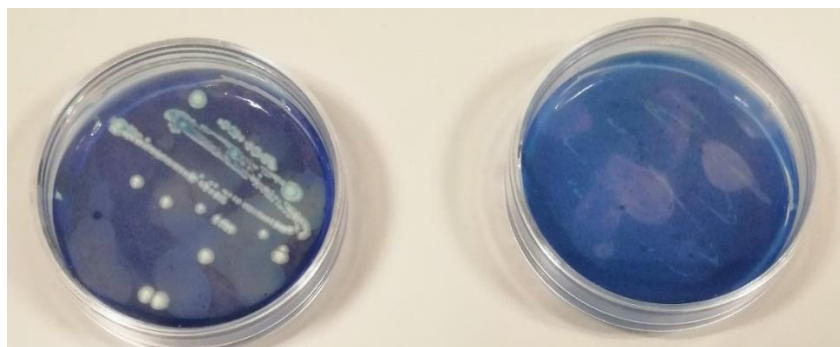


Figura 3: Test de interacción entre *Hanseniaspora uvarum* y WAM. A la izda.: WAM sobre *H. uvarum*; a la dcha.: *H. uvarum* sobre WAM.

Como se puede observar en la imagen, en este caso también sucedieron problemas de crecimiento de la levadura no - *Saccharomyces*, al igual que en el ensayo anterior, y es la causa de la repetición de la prueba. *H. uvarum* no se desarrolla bien en este medio de cultivo, por lo que tampoco se pueden extraer resultados concluyentes de esta prueba.

4.3. Actividad enzimática

Los ensayos para comprobar la actividad enzimática de *H. uvarum* se realizaron conforme a lo explicado en materiales y métodos (apartado 3.3.).

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

ENZIMA	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA
β – glucosidasa	-
Proteasa	+
β - glucanasa	+
β - liasa	+

Tabla 4: Resultados de los ensayos de actividad enzimática para *Hanseniaspora uvarum*.

4.3.1. Ensayo de actividad β – glucosidasa

Como se refleja en la Tabla 4, el resultado para la actividad β – glucosidasa de *H. uvarum* es negativo. Esto se puede observar también en la Figura 4.



Figura 4: Resultado del ensayo para la actividad β - glucosidasa en *Hanseniaspora uvarum*.

Si el ensayo resulta positivo, se forma una coloración negra en el medio de cultivo, señal de que la β – glucosidasa ha hidrolizado la arbutina que éste contiene. Sin embargo, en la prueba para *H. uvarum* no se apreció esa coloración (Figura 3), por lo que se concluyó que el resultado para este tipo de actividad enzimática es negativo [48]. Sin embargo, esto también depende de la cepa de levadura de la que se disponga, ya que hay referencias de actividad β – glucosidasa en *H. uvarum* [60] y, por tanto, tampoco se puede generalizar al hablar de este tipo de actividad enzimática en esta levadura.

4.3.2. Ensayo de actividad proteasa

En la Tabla 4 podemos ver que el resultado del ensayo para la actividad proteasa de *H. uvarum* es positivo. Como se ve en la Figura 5, si el ensayo resulta positivo, aparece un halo en torno a las colonias de las levaduras [48].



Figura 5: Resultado del ensayo para la actividad proteasa en *Hanseniaspora uvarum*.

Como se ve en la Figura 5, el ensayo es positivo, ya que se observa claramente la formación del halo alrededor de las colonias de *H. uvarum*, causada por la hidrólisis de la caseína que contiene el medio de cultivo, lo cual es coherente con los datos previos de los que se disponía, ya que la mayoría de las levaduras del género *Hanseniaspora* presentan actividad proteasa [60].

Como la variedad de estudio es la Verdejo, el que la levadura que se ha aislado (*H. uvarum*) tenga este tipo de actividad resulta muy interesante, ya que los vinos blancos son más sensibles a sufrir enturbiamientos. Además, volviendo a la problemática del elevado contenido en azúcar en las uvas de los últimos años, también es beneficioso que *H. uvarum* pueda producir este tipo de enzimas, ya que solventa la posible alta exigencia en nitrógeno de las levaduras a la hora de fermentar.

4.3.3. Ensayo de actividad β – glucanasa

De nuevo atendiendo a la Tabla 4, se puede ver que el resultado del ensayo para la actividad proteasa de *H. uvarum* es positivo. Esto se puede apreciar detalladamente en la Figura 6.

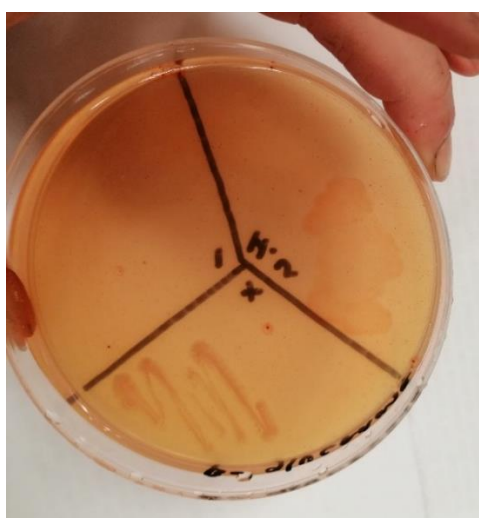


Figura 6: Resultado del ensayo para la actividad β - glucanasa en *Hanseniaspora uvarum* (marcada como *H.u.* en la placa). El control negativo pertenece a la zona marcada con un – y el control positivo a la zona marcada con un +.

Como se puede observar, si el test resulta positivo, la tinción con Rojo Congo deja ver un halo translúcido en torno al lugar donde se encontraban las colonias de levaduras [48], y se puede apreciar claramente en la Figura 6 el halo en el lugar donde se había sembrado *H. uvarum*, lo cual quiere decir que la levadura que se ha aislado también tiene actividad β – glucanasa.

De nuevo, al ser la variedad de estudio una variedad blanca, esto es bastante útil ya que los mostos y los vinos blancos son más susceptibles de tener problemas de oxidación. Así mismo, también hace que la levadura aislada se pueda utilizar si se pretende realizar una crianza sobre lías, ya que este tipo de actividad enzimática favorece este tipo de prácticas, mejorando las características organolépticas del vino.

4.3.4. Ensayo de actividad β – liasa

Por último, en cuanto a la actividad β – liasa y según la Tabla 4, también es positiva.



Figura 7: Resultado del ensayo para la actividad β - liasa en *Hanseniaspora uvarum* (marcada como H.u. en la placa). El control negativo pertenece a la zona marcada con un – y el control positivo a la zona marcada con un +.

Como se puede ver en la Figura 7, las colonias de *H. uvarum* crecieron en el medio de cultivo, por lo que se deduce que la actividad β – liasa en esta levadura es positiva.

La variedad Verdejo es rica en tioles y compuestos azufrados con impacto aromático positivo, por lo que este tipo de actividad resulta beneficiosa, ya que hace que se liberen sus aromas característicos varietales.

4.4. Microvinificaciones

Es importante de cara a la elaboración comercial de vinos que las levaduras que se utilizan tengan un inicio rápido de la fermentación. Además, la producción de CO_2 es recomendable que se establezca lo antes posible.

En la Figura 8 se muestra la cinética de fermentación de los diferentes ensayos realizados:

- WAM
- *H. uvarum*
- Inoculación simultánea (SiF)
- Inoculación secuencial 48h (SeF)

El gráfico está expresado en gramos de CO₂ producidos por litro frente al tiempo de fermentación, en días.

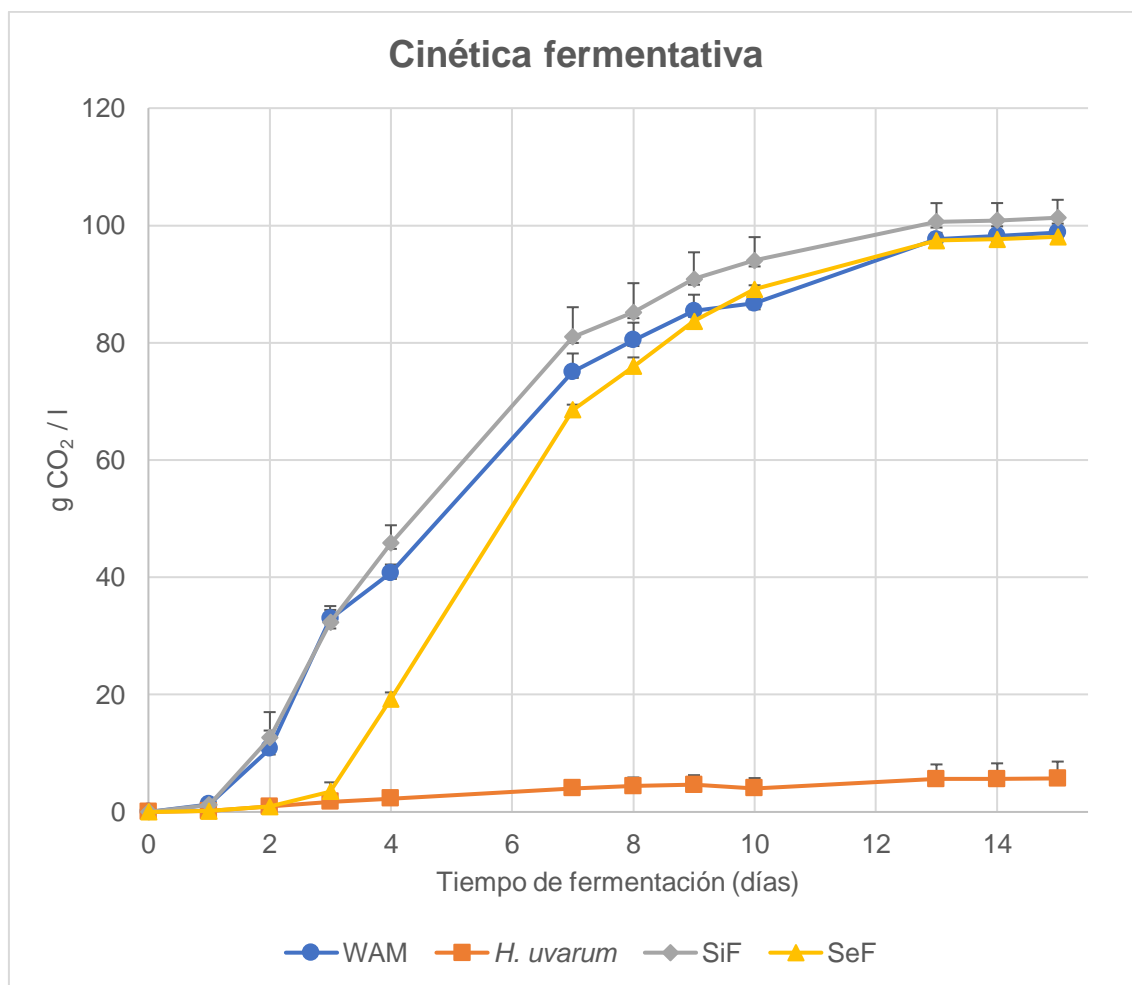


Figura 8: Cinética fermentativa a 21°C frente al tiempo de fermentación, siendo SiF la inoculación simultánea y SeF la inoculación secuencial.

Como se puede observar en el gráfico, *H. uvarum* apenas tiene poder fermentativo por sí misma y tanto la inoculación simultánea como la secuencial salieron adelante gracias a la presencia de WAM, que es *Saccharomyces cerevisiae*. Ésta, al poseer un elevado poder fermentativo se impuso a la levadura no – *Saccharomyces*, llevando a cabo la fermentación alcohólica [26, 27]. De hecho, eso se puede apreciar en la curva correspondiente a la inoculación secuencial, ya que aumentó considerablemente el poder fermentativo a partir del día 3, discurrendo de forma muy similar a como lo hace WAM en solitario el resto de la fermentación. En cuanto a la inoculación simultánea, se desprendió algo más de CO₂ que en el ensayo con WAM en solitario, gracias probablemente a *H. uvarum*, ya que esta levadura también puede metabolizar los azúcares por fermentación, produciéndose así más cantidad de dióxido de carbono [31].

Los parámetros básicos de los vinos finales fueron analizados de acuerdo con los procedimientos explicados en el punto 3.4.3.

	pH	AT (g/l TH ₂)	%vol	AR (g/l)	AV (g/l ác. acético)
WAM	3,39 ^a ± 0,04	7,6 ^b ± 0,1	12,3 ^a ± 0,1	1,0 ^a ± 0,3	0,69 ^a ± 0,06
SiF	3,41 ^a ± 0,01	6,9 ^a ± 0,4	12,7 ^a ± 0,3	0,9 ^a ± 0,1	0,8 ^a ± 0,05
SeF	3,45 ^a ± 0,03	7,0 ^a ± 0,1	12,3 ^a ± 0,2	0,6 ^a ± 0,1	-

Tabla 5: Resultados de los análisis de los parámetros básicos de los vinos finales. AT hace referencia a la acidez total, AR a los azúcares reductores y AV a la acidez volátil.

Como se puede observar en la Tabla 5, no hay datos referentes a la acidez volátil del ensayo de la inoculación secuencial. Esto es debido al cierre de la Universidad y, por tanto, de los laboratorios, a causa de la pandemia ocasionada por el SARS-CoV-2 (CoVid-19). Por tanto, no fue posible llevar a cabo esos análisis.

Ya se ha comentado en los párrafos anteriores referentes a los resultados de las microvinificaciones que *H. uvarum* tiene muy poco poder fermentativo por sí sola. Esto quedó demostrado en este ensayo, puesto que solamente alcanzó a producir un 0,7% vol. (± 0,3) de etanol. De hecho, los análisis de azúcares reductores no se pudieron llevar a cabo en el ensayo en que dicha levadura fermentaba en solitario, ya que, con ese contenido alcohólico, seguía siendo mosto.

No hay diferencias significativas entre los resultados referentes al ensayo de WAM en solitario y los de los cultivos mixtos, a excepción del descenso de la acidez total en estos últimos. A causa de esto se puede deducir que *H. uvarum* afecta de alguna manera al metabolismo de WAM y, por tanto, a su producción de ácidos como metabolitos secundarios. Esto es porque al tener otra levadura que también consume azúcares, WAM no puede metabolizarlos todos y, por tanto, la cantidad de metabolitos disminuye y, por ende, la cantidad de ácidos orgánicos. Sin embargo, hay que destacar que esto no se corresponde con el aumento de la acidez volátil, ya que la diferencia entre la producida en la inoculación simultánea y el ensayo con WAM en solitario no es significativa.

Por otro lado, a la hora de comparar la inoculación secuencial frente a la inoculación simultánea no se aprecia ninguna ventaja en los parámetros analíticos del vino final, ya que los resultados analíticos no presentan diferencias significativas entre ellos y, además, la inoculación secuencial hace que la fermentación comience más lentamente, con el riesgo enológico que eso conlleva.

5. CONCLUSIONES

Tras el estudio de los resultados obtenidos, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- *Hanseniaspora uvarum* posee un poder fermentativo muy bajo, por lo que no se puede realizar una fermentación con un cultivo puro de esta levadura, sino que es necesario inocularla con otra especie (*Saccharomyces*) que pueda acabar la fermentación.
- Posee actividad enzimática interesante y que puede solucionar parte de la problemática planteada en este estudio, referente a la diferenciación de los vinos dentro de la Denominación de Origen Rueda. *Hanseniaspora uvarum* cuenta con actividad proteasa, β – glucanasa y β – liasa, lo cual ofrece muchas oportunidades a la hora de resaltar el carácter y aromas varietales de la variedad Verdejo y permite realizar elaboraciones diferentes como puede ser una crianza sobre lías.
- Se aprecia un descenso significativo de la acidez total cuando se emplean cultivos mixtos *Hanseniaspora uvarum* / WAM frente a la inoculación de WAM sola. Esto puede ser beneficioso o no en dependencia del tipo de vino que se quiera elaborar.
- Es preferible, pues, realizar una inoculación simultánea a una inoculación secuencial, ya que esta última no presenta ningún tipo de ventaja en la fermentación y, de hecho, hace que empiece más tarde, poniendo en riesgo la elaboración.

El siguiente paso en la caracterización de la cepa M48h 9 de *Hanseniaspora uvarum* y su utilización en cultivos mixtos sería realizar ensayos a mayor escala con elaboraciones de mayor volumen. De esta manera se podrían poner en práctica las conclusiones extraídas en este estudio y se podrían analizar, además, aspectos como los aromas.

Por último, sería preciso volver a realizar también los ensayos para conocer el carácter *killer* y la interacción entre WAM y *Hanseniaspora uvarum*, ya que en este estudio no se ha podido sacar nada en claro en este aspecto debido a los múltiples problemas de crecimiento de las levaduras en los medios de cultivo.

REFERENCIAS

- [1] QuénoI, H., Garcia de Cortazar Atauri, I., Bois, B., Sturman, A., Bonnardot, V., & Le Roux, R. (2017). Which climatic modeling to assess climate change impacts on vineyards? *OENO One*, 51(2), 91–97.
- [2] Raza, A.; Razzaq, A.; Mehmood, S.S.; Zou, X.; Zhang, X.; Lv, Y.; Xu, J. (2019). Impact of Climate Change on Crops Adaptation and Strategies to Tackle Its Outcome: A Review. *Plants*, 8, 34.
- [3] Fraga, H.; Malheiro, A.C.; Moutinho-Pereira, J.; Santos, J.A. (2013). An overview of climate change impacts on European viticulture. *Food Energy Secur*, 1, 94–110.
- [4] Jones, G.V., White, M.A., Cooper, O.R. et al. (2005). Climate Change and Global Wine Quality. *Climatic Change* 73, 319–343.
- [5] Cramer, G. (2010), Abiotic stress and plant responses from the whole vine to the genes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16, 86–93.
- [6] Jones, G.V.; Alves, F. (2012). Impact of climate change on wine production: A global overview and regional assessment in the Douro Valley of Portugal. *International Journal of Global Warming*, 4, 383–406.
- [7] Greer Dennis H., Weston Chris (2010). Heat stress affects flowering, berry growth, sugar accumulation and photosynthesis of *Vitis vinifera* cv. Semillon grapevines grown in a controlled environment. *Functional Plant Biology* 37, 206–214.
- [8] Duchêne E, Huard F, Dumas V, Schneider C, Merdinoglu D (2010) The challenge of adapting grapevine varieties to climate change. *Climate Research*, 41, 193–204.
- [9] Bernardo, S., Dinis, LT., Machado, N. et al. (2018). Grapevine abiotic stress assessment and search for sustainable adaptation strategies in Mediterranean-like climates. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 38, 66.
- [10] Blancquaert, E.H.; Oberholster, A.; Da-Silva, J.M.R.; Deloire, A.J. (2018). Effects of abiotic factors on phenolic compounds in the grape berry—A review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 40, 1–14.
- [11] van Leeuwen, C., & Destrac-Irvine, A. (2017). Modified grape composition under climate change conditions requires adaptations in the vineyard. *OENO One*, 51(2), 147–154.
- [12] Neethling E, Barbeau G, Bonnefoy C, QuénoI H (2012) Change in climate and berry composition for grapevine varieties cultivated in the Loire Valley. *Climate Research*, 53, 89–101.
- [13] Scholasch, T., & Rienth, M. (2019). Review of water deficit mediated changes in vine and berry physiology; Consequences for the optimization of irrigation strategies. *OENO One*, 53(3).
- [14] Banilas, G.; Korkas, E.; Kaldis, P. Hatzopoulos, P. (2009). Olive and grapevine biodiversity in Greece and Cyprus – A review. *Climate Change, Intercropping, Pest Control and Beneficial Microorganisms. Sustainable Agriculture Reviews*, vol 2, 401–428
- [15] Wolkovich, E.M., García de Cortázar-Atauri, I., Morales-Castilla, I. et al. (2018) From Pinot to Xinomavro in the world's future wine-growing regions. *Nature Climate Change* 8, 29–37.
- [16] Venios, X., Korkas, E., Nisiotou, A. and Banilas, G. (2020). Grapevine responses to heat stress and global warming. *Plants*, 9 (12), 1–15.
- [17] Rektor, A., Kozak, A., Vatai, G., & Bekassy-Molnar, E. (2007). Pilot plant RO-filtration of grape juice. *Separation and Purification Technology*, 57(3), 473–475.
- [18] Labanda, J., Vichi, S., Llorens, J., & López-Tamames, E. (2009). Membrane separation technology for the reduction of alcoholic degree of a white model wine. *LWT. Food Science and Technology*, 42(8), 1390–1395.

- [19] Ozturk, B., & Anli, E. (2014). Different techniques for reducing alcohol levels in wine: A review. *BIO Web of Conferences*, 3, 02012.
- [20] Bankar, S. B., Bule, M. V., Singhal, R. S., & Ananthanarayan, L. (2009). Glucose oxidase - An overview. *Biotechnology Advances*, 27(4), 489–501.
- [21] Pickering, G. J., Heatherbell, D. A., & Barnes, M. F. (1998). Optimising glucose conversion in the production of reduced alcohol wine using glucose oxidase. *Food Research International*, 31(10), 685–692.
- [22] Varela, C., Dry, P. R., Kutyna, D. R., Francis, I. L., Henschke, P. A., Curtin, C. D. & Chambers, P. J. (2015). Strategies for reducing alcohol concentration in wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21(1), 670–679.
- [23] Puertas, B., Jimenez-Hierro, M. J., Cantos-Villar, E., Marrufo-Curtido, A., Carbú, M., Cuevas, F. J., Moreno-Rojas, J. M., González-Rodríguez, V. E., Cantoral, J. M., & Ruiz-Moreno, M. J. (2018). The influence of yeast on chemical composition and sensory properties of dry white wines. *Food Chemistry*, 253(June 2017), 227–235.
- [24] Medina, K., Boido, E., Fariña, L., Gioia, O., Gomez, M. E., Barquet, M., Gaggero, C., Dellacassa, E., & Carrau, F. (2013). Increased flavour diversity of Chardonnay wines by spontaneous fermentation and co-fermentation with *Hanseniaspora vineae*. *Food Chemistry*, 141(3), 2513–2521.
- [25] Álvarez-Pérez, J. M., Campo, E., San-Juan, F., Coque, J. J. R., Ferreira, V., & Hernández-Orte, P. (2012). Sensory and chemical characterisation of the aroma of Prieto Picudo rosé wines: The differential role of autochthonous yeast strains on aroma profiles. *Food Chemistry*, 133(2), 284–292.
- [26] Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., & Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: A new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Research*, 10(2), 123–133.
- [27] Villena, M. A., Iranzo, J. F. Ú., & Pérez, A. I. B. (2007). β -Glucosidase activity in wine yeasts: Application in enology. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(3), 420–425.
- [28] Fleet, G. H., (2008) Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 979–95.
- [29] Vigentini, I., Maghradze, D., Petrozziello, M., Bonello, F., Mezzapelle, V., Valdetara, F., Failla, O., & Foschino, R. (2016). Indigenous georgian wine-associated yeasts and grape cultivars to edit the wine quality in a precision oenology perspective. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAR), 1–13.
- [30] Fugelsang, K., & Edwards, C. (2007). *Wine Microbiology - Practical Applications and Procedures*.
- [31] Gonzalez, R., Quirós, M., & Morales, P. (2013). Yeast respiration of sugars by non-*Saccharomyces* yeast species: A promising and barely explored approach to lowering alcohol content of wines. *Trends in Food Science and Technology*, 29(1), 55–61.
- [32] Renault, P., Miot-Sertier, C., Marullo, P., Hernández-Orte, P., Lagarrigue, L., Lonvaud-Funel, A., & Bely, M. (2009). Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspora delbrueckii* species: Potential applications in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*, 134(3), 201–210.
- [33] Manzanares, P., Vallés, S., & Viana, F. (2011). Non-*Saccharomyces* Yeasts in the Winemaking Process. *Molecular Wine Microbiology*, 85–110.
- [34] Heard, G. M., & Fleet, G. H. (1985). Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(3), 727–728.
- [35] Mercado, L., Dalcero, A., Masuelli, R., & Combina, M. (2007). Diversity of *Saccharomyces* strains on grapes and winery surfaces: Analysis of their contribution to fermentative flora of Malbec wine from Mendoza (Argentina) during two consecutive years. *Food Microbiology*, 24(4), 403–412.

- [36] Querol, A., Barrio, E., Huerta, T., & Ramon, D. (1992). Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(9), 2948–2953.
- [37] Hong, Y. A., & Park, H. D. (2013). Role of non-*Saccharomyces* yeasts in Korean wines produced from Campbell Early grapes: Potential use of *Hanseniaspora uvarum* as a starter culture. *Food Microbiology*, 34(1), 207–214.
- [38] Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I., & Dubourdieu, D. (2008). Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 122(3), 312–320.
- [39] Ciani, M., Beco, L., & Comitini, F. (2006). Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 108(2), 239–2
- [40] Mendoza, L. M., De Nadra, M. C. M., & Farías, M. E. (2007). Kinetics and metabolic behavior of a composite culture of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* wine related strains. *Biotechnology Letters*, 29(7), 1057–1063.
- [41] Escribano-Viana, R., González-Arenzana, L., Portu, J., Garijo, P., López-Alfaro, I., López, R., Santamaría, P., & Gutiérrez, A. R. (2018). Wine aroma evolution throughout alcoholic fermentation sequentially inoculated with non-*Saccharomyces/Saccharomyces* yeasts. *Food Research International*, 112(June), 17–24.
- [42] Sadoudi, M., Tourdot-Maréchal, R., Rousseaux, S., Steyer, D., Gallardo-Chacón, J. J., Ballester, J., Vichi, S., Guérin-Schneider, R., Caixach, J., & Alexandre, H. (2012). Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts. *Food Microbiology*, 32(2), 243–253.
- [43] Nikolaou, E., Soufleros, E. H., Bouloumpasi, E., & Tzanetakis, N. (2006). Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains according to their oenological characteristics and vinification results. *Food Microbiology*, 23(2), 205–211.
- [44] Izgü, F., Altınbay, D., & Yüceliş, A. (1997). Identification and killer activity of a yeast contaminating starter cultures of *Saccharomyces cerevisiae* strains used in the Turkish baking industry. *Food Microbiology*, 14(2), 125–131.
- [45] Sánchez-Palomo, E., Alonso-Villegas, R., & González Viñas, M. A. (2015). Characterisation of free and glycosidically bound aroma compounds of la Mancha Verdejo white wines. *Food Chemistry*, 173, 1195–1202.
- [46] Tolosa, J. J. M., & Prieto, S. M. (2018). Non-saccharomyces yeasts: An enzymatic unexplored world to be exploited. In *Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications, and Future Prospects*. Elsevier Inc.
- [47] Belda, I., Ruiz, J., Alastruey-Izquierdo, A., Navascués, E., Marquina, D., & Santos, A. (2016). Unraveling the enzymatic basis of wine “Flavorome”: A phylo-functional study of wine related yeast species. *Frontiers in Microbiology*, 7(JAN).
- [48] Escribano, R., González-Arenzana, L., Garijo, P., Berlanas, C., López-Alfaro, I., López, R., Gutiérrez, A. R., & Santamaría, P. (2017). Screening of enzymatic activities within different enological non-*Saccharomyces* yeasts. *Journal of Food Science and Technology*, 54(6), 1555–1564.
- [49] Belda, I., Ruiz, J., Beisert, B., Navascués, E., Marquina, D., Calderón, F., Rauhut, D., Benito, S., & Santos, A. (2017). Influence of *Torulaspora delbrueckii* in varietal thiol (3-SH and 4-MSP) release in wine sequential fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 257(April), 183–191.
- [50] Satora, P., Skotniczny, M., Strnad, S., & Ženišová, K. (2020). Yeast microbiota during sauerkraut fermentation and its characteristics. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 1–15.

- [51]Brexó, R. P., Brandão, L. R., Chaves, R. D., Castro, R. J. S., Câmara, A. A., Rosa, C. A., & Sant'Ana, A. S. (2020). Yeasts from indigenous culture for cachaça production and brewer's spent grain: Biodiversity and phenotypic characterization for biotechnological purposes. *Food and Bioprocess Technology*, 124, 107–120.
- [52]Onetto, C. A., Borneman, A. R., & Schmidt, S. A. (2020). Investigating the effects of *Aureobasidium pullulans* on grape juice composition and fermentation. *Food Microbiology*, 90(November 2019), 103451.
- [53]Feng, C. T., Du, X., & Wee, J. (2021). Microbial and Chemical Analysis of Non-*Saccharomyces* Yeasts from Chambourcin Hybrid Grapes for Potential Use in Winemaking. *Fermentation*, 7(1), 15.
- [54]Hidalgo, J. (2011). *Tratado de enología*. 2ª ed.
- [55]Kurtzman, C., Fell, J.W., Boekhout, T. (2011). *The yeasts, a taxonomic study*. (5th ed.). Elsevier Science.
- [56]Hong, Y. A., & Park, H. D. (2013). Role of non-*Saccharomyces* yeasts in Korean wines produced from Campbell Early grapes: Potential use of *Hanseniaspora uvarum* as a starter culture. *Food Microbiology*, 34(1), 207–214.
- [57]Hu, K., Jin, G. J., Xu, Y. H., & Tao, Y. S. (2018). Wine aroma response to different participation of selected *Hanseniaspora uvarum* in mixed fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International*, 108(December 2017), 119–127.
- [58]Capozzi, V., Berbegal, C., Tufariello, M., Grieco, F., & Spano, G. (2019). Impact of co-inoculation of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum* and *Oenococcus oeni* autochthonous strains in controlled multi starter grape must fermentations. *Lwt*, 109(April), 241–249.
- [59]Escalante, W. E., Rychtera, M., Melzoch, K., Hatta Sakoda, B., Quillama Polo, E., Ludeña Cervantes, Z., Sarmiento Casavilca, V., & Chaquilla Quilca, G. (2011). Actividad fermentativa de *Hanseniaspora uvarum* y su importancia en la producción de bebidas fermentadas. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 31(1), 57–63.
- [60]Capozzi, V., Berbegal, C., Tufariello, M., Grieco, F., & Spano, G. (2019). Impact of co-inoculation of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum* and *Oenococcus oeni* autochthonous strains in controlled multi starter grape must fermentations. *Lwt*, 109(April), 241–249.
- [61]Young, T. W., & Yagiu, M. (1978). A comparison of the killer character in different yeasts and its classification. *Antonie van Leeuwenhoek*, 44(1), 59–77.
- [62]Ciani, M., & Comitini, F. (2018). Use of Non-*Saccharomyces* Yeasts in Red Winemaking. *Red Wine Technology*, 1998, 51–68.