



---

# Universidad de Valladolid

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR  
DE INGENIERÍAS AGRARIAS

**GRADO EN ENOLOGÍA**

**Estudio sobre la compatibilidad de levaduras  
no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces* para  
coinoculación y su influencia en el grado  
alcohólico de la variedad Verdejo.**

Alumna:

González Muñoz, Sandra

Tutoras:

Ruipérez Prádanos, Violeta

Vila Crespo, Josefina

Palencia, 2021

## Índice

|   |    |
|---|----|
| Abstract .....  | 2  |
| 1. INTRODUCCIÓN .....                                 | 3  |
| 1.1. Fermentaciones mixtas.....                       | 4  |
| 1.2. <i>Wickerhamomyces anomalus</i> .....            | 5  |
| 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....                    | 7  |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS.....                          | 8  |
| 3.1. Microorganismos.....                             | 8  |
| 3.1.1. Levaduras no- <i>Saccharomyces</i> .....       | 8  |
| 3.1.2. Levaduras <i>Saccharomyces</i> .....           | 8  |
| 3.1.3. Observación al microscopio.....                | 8  |
| 3.1.4. Estimación de células para la siembra .....    | 8  |
| 3.1.5. Conservación de las levaduras .....            | 8  |
| 3.2. Medios de cultivo.....                           | 9  |
| 3.2.1. Mosto.....                                     | 9  |
| 3.2.2. Medio YPD .....                                | 9  |
| 3.2.3. Medio CECT 138 .....                           | 9  |
| 3.2.4. Medio Lisina .....                             | 10 |
| 3.2.5. Medio para la interacción entre levaduras..... | 10 |
| 3.2.6. Medio actividad $\beta$ -glucosidasa .....     | 10 |
| 3.3. Estudio de interacción entre levaduras .....     | 10 |
| 3.3.1. Resistencia y producción de toxinas.....       | 10 |
| 3.4. Microvinificaciones.....                         | 11 |
| 3.4.1. Primer ensayo .....                            | 11 |
| 3.4.2. Segundo ensayo.....                            | 12 |
| 3.4.2.1. Mosto base .....                             | 13 |
| 3.4.2.2. Seguimiento de las levaduras.....            | 13 |
| 3.4.2.3. Análisis químicos .....                      | 14 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....                        | 16 |
| 4.1. Interacción entre levaduras.....                 | 16 |
| 4.2. Microvinificaciones.....                         | 17 |
| 4.2.1. Primer ensayo .....                            | 18 |
| 4.2.2. Segundo ensayo.....                            | 21 |
| 4.3. Análisis químicos .....                          | 23 |
| 4.3.1. Azúcares reductores .....                      | 24 |
| 4.3.2. Grado alcohólico .....                         | 25 |
| 4.3.3. pH.....  | 26 |
| 5. CONCLUSIONES .....                                 | 28 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA .....                                 | 29 |
| Anexos .....  | 31 |

## Resumen

A lo largo de las últimas décadas, el contenido en azúcar de las uvas, y, por consiguiente, el grado alcohólico del vino, se ha visto incrementado debido al cambio climático. El objetivo de este estudio es encontrar una posible solución para este problema utilizando un cultivo mixto de levaduras del género *Saccharomyces* con levaduras no-*Saccharomyces* (*Wickerhamomyces anomalus*), aisladas de la Denominación de Origen Rueda.

Estudios previos describen a *W. anomalus* como una levadura capaz de liberar al medio enzimas que incrementan los aromas varietales de la uva, además de secretar enzimas que pueden mejorar la clarificación del vino, y, junto con, *Saccharomyces cerevisiae* potencian los aromas frutales y florales en el vino.

En este trabajo, se estudiará la compatibilidad de ambas levaduras para su empleo en cultivos mixtos. Durante el transcurso de las microvinificaciones se comprobará la implantación de ambas levaduras en el mosto y su evolución. Por último, se realizarán análisis para asegurar el fin de la fermentación y estudiar la influencia sobre el grado alcohólico del vino final.

## Abstract

Over the last few decades, the sugar content of grapes, and consequently the alcoholic degree of wine, has increased due to climate change. The aim of this study is to find a possible solution to this problem using a mixed culture of yeasts of the genus *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* (*Wickerhamomyces anomalus*), isolated from the Denominación de Origen Rueda.

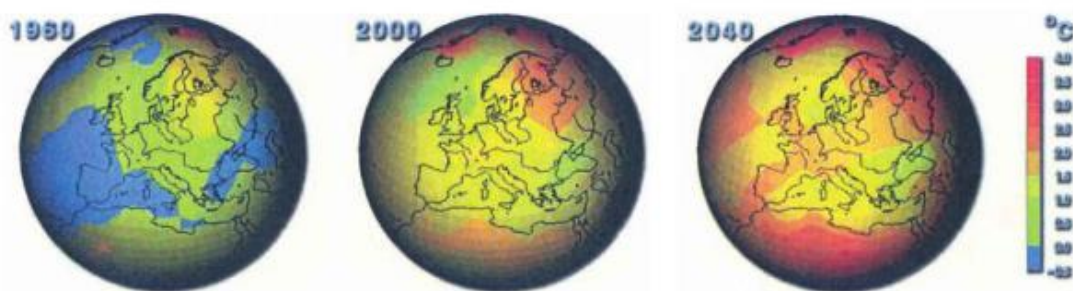
Previous studies describe *W. anomalus* as a yeast capable of releasing enzymes in the medium that increase the varietal aromas of the grape, in addition to secreting enzymes that can improve the clarification of the wine, and, in combination together with, *Saccharomyces cerevisiae*, enhance the fruity and floral aromas in the wine.

In this study, the compatibility of both yeasts for use in mixed cultures will be studied. During the course of the microvinifications, the implantation of both yeasts in the must and their evolution will be checked. Finally, analyses will be carried out to ensure the end of fermentation and to study the influence on the alcoholic degree of the final wine.

## 1. INTRODUCCIÓN

El cambio climático se define como cualquier cambio en el estado del clima que persiste durante un periodo prolongado de tiempo. El aumento de las temperaturas que se está dando actualmente viene provocado por la emisión de gases de efecto invernadero (en concreto el CO<sub>2</sub>) a la atmósfera. Estas altas temperaturas están afectando a diferentes aspectos relacionados con la viticultura, como es la fecha de cosecha, el rendimiento y la composición del racimo (Meier et al., 2007). La composición y maduración del racimo se ve afectada porque aumenta el contenido en azúcar, y por consiguiente el grado alcohólico del vino, disminuye la acidez, y se alteran los metabolitos secundarios, afectando al aroma y al color de las uvas (Droulia et al., 2021). Todo esto está provocado porque el salto térmico entre el día y la noche es menor (Venios et al., 2020), esta variación de temperatura es necesaria porque los días cálidos y las noches frías hacen que las uvas maduren con una buena cantidad de azúcar además de una buena conservación de los ácidos, del color y de los aromas (Hidalgo, 2019).

Europa es el continente con mayor superficie de viñedo, sin embargo, el aumento de las temperaturas del orden de 1,7 °C entre 1950 y el 2004 está provocando que haya disminuido, quedándose con el 38% del viñedo mundial. (Fraga et al., 2012). Se estima, que a lo largo de los años, las temperaturas globales aumenten unos 0,2-0,3 grados por década (Venios et al., 2020), lo que provocará que a lo largo de los años las vides irán necesitando latitudes más altas para crecer, ya que es una planta muy sensible a las temperaturas extremas. En España, algunas denominaciones de origen podrían desaparecer y, algunas zonas de nuestra situación geográfica se van a ver afectadas por la sequía, como por ejemplo Andalucía o Castilla la Mancha (Fraga et al., 2012).



**El calentamiento global (°C) comparado las temperaturas con respecto a principios del siglo xx.**

*Imagen 1: Evolución de la temperatura sobre la superficie terrestre. Fuente: (Hidalgo Fernández Cano, 2019).*

En resumidas cuentas, el cambio climático está dando diversas problemáticas en la vinificación como son la disminución del color, la composición de los compuestos aromáticos del vino, el aumento del grado alcohólico y la disminución de la acidez (Fraga et al., 2012; Venios et al., 2020). Para solventarlos, se está recurriendo, entre otras cosas, a la utilización de fermentaciones mixtas entre levaduras *no-Saccharomyces* y *Saccharomyces* las cuales, además aportan al vino final características que mejoran su calidad final (Izquierdo et al., 2011; Padilla et al., 2016).

## 1.1. Fermentaciones mixtas

La fermentación alcohólica espontánea es el proceso por el cual una sucesión de levaduras *no-Saccharomyces*, y levaduras *Saccharomyces*, transforma el mosto de uva en vino (Ciani et al., 2010), transformando los azúcares de la uva en etanol y dióxido de carbono, además de otros metabolitos secundarios (Gutiérrez et al., 2018). En este proceso, las levaduras del género *Saccharomyces* son, las mayoritarias. Sin embargo, las levaduras *no-Saccharomyces* tienen un gran interés enológico, puesto que aportan caracteres interesantes y contribuyen a la mejora de la calidad del vino (Madrigal et al., 2013).

Antiguamente se pensaba que las levaduras *no-Saccharomyces* eran perjudiciales debido a que secretan metabolitos poco interesantes para el vino. Afortunadamente esta forma de pensar ha cambiado debido a que diversos estudios han demostrado que eso no es del todo cierto, ya que estas levaduras dejan en el medio compuestos muy interesantes para las levaduras *Saccharomyces* como enzimas, péptidos, proteínas, aminoácidos o compuestos nitrogenados (Vejarano, 2020). Además junto a *Saccharomyces* pueden contribuir a una mayor producción de polisacáridos y modular las concentraciones finales de diferentes ácidos y compuestos volátiles (Domizio et al., 2011).

Las fermentaciones mixtas pueden realizarse de forma secuencial, en la cual las primeras levaduras inoculadas serían levaduras *no-Saccharomyces* y a las 24-48 horas se inocularían las levaduras del género *Saccharomyces*. Esta fermentación se asemeja, debido a la intervención de diferentes géneros de levadura (Ferraro et al., 2000), a una fermentación espontánea, pero con la ventaja de que se conoce qué levadura es la responsable de la fermentación. Por otro lado, también se puede hacer una inoculación simultánea, en cuyo caso se inocularían las dos levaduras a la vez. En ambos casos se corre el riesgo de que las levaduras *no-Saccharomyces* se vean afectadas por la población inicial de levaduras presentes en la uva (Padilla et al., 2017), sin embargo, se tendría un mayor control microbiológico y un aumento de la complejidad aromática (Imagen 2).

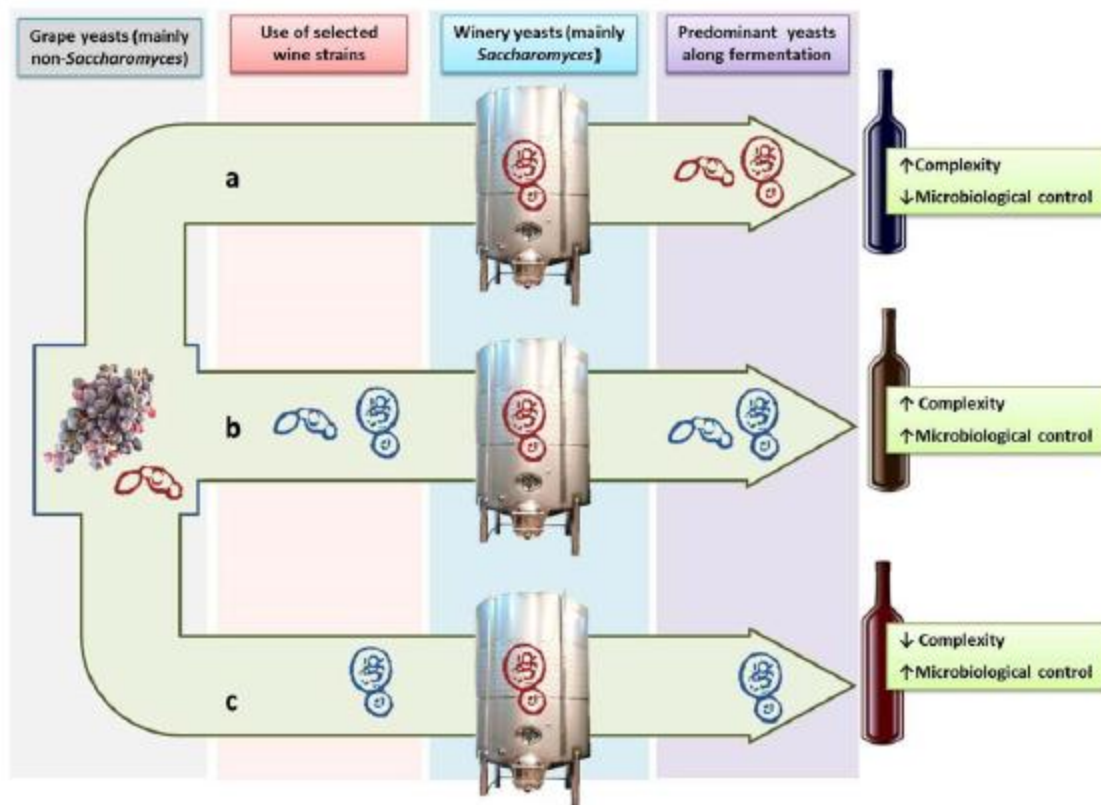


Imagen 2: Comparación entre fermentaciones espontáneas, mixtas o dirigida con una sola levadura. Fuente: (Padilla et al., 2016).

Además de para mejorar la complejidad del vino y, por consiguiente, su calidad, el recurso de las fermentaciones mixtas se utiliza para resolver algunos problemas citados anteriormente, provenientes del cambio climático, cómo, por ejemplo, reducir el contenido del grado alcohólico, ya que un exceso del mismo aumenta el amargor, la astringencia y enmascara algunos compuestos volátiles (García et al., 2020). Para solucionar el problema se podría adelantar la vendimia y recoger la uva más temprano, sin embargo, este método no sería viable puesto que la uva no estaría madura y podría ocasionar problemas a la hora de vinificarla y, además daría gustos y sabores indeseables (Quirós et al., 2014).

Para conseguir una disminución del grado alcohólico mediante medios biológicos la levadura debe metabolizar el azúcar del mosto sin la formación de etanol o que lo haga con menos eficacia (Padilla et al., 2018), por ello se han realizado estudios con levaduras *no-Saccharomyces*.

## 1.2. *Wickerhamomyces anomalus*

En este estudio se emplea como estrategia para modular el grado alcohólico cultivos mixtos de *Wickerhamomyces anomalus* y una cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae*.

*W. anomalus*, antes conocida como *Hansenula anomala*, *Candida pelliculosa* y como *Pichia anomala* (Cioch-Skoneczny et al., 2019), es una levadura capaz de crecer en condiciones extremas de estrés ambiental, como pH alto y bajo, con altas presiones osmóticas y en condiciones anaerobias (Passoth et al., 2006), aunque algunas cepas

de esta levadura son capaces de tolerar hasta el 12%vol no suele ser lo más habitual en ella. También es conocida por su formación de velo (Padilla et al., 2018), y por su efecto *killer* sobre otras levaduras no-*Saccharomyces*, por lo que puede implantarse mejor que otras levaduras al inicio de la fermentación, y sobre otros microorganismos perjudiciales para la vinificación como levaduras pertenecientes al género *Brettanomyces/Dekkera* (Vejarano, 2020). Además, esta levadura es una buena productora de enzimas con carácter interesante para la vinificación como  $\beta$ -glucosidasas, proteasas, glucanasas o pectinasas (Madrigal et al., 2013; Padilla et al., 2018). Esta levadura se ha empleado en otras bebidas como en la cerveza, a la cual aporta enzimas, o en la sidra, en la que, junto a *Saccharomyces cerevisiae*, aporta una gran cantidad de ésteres, alcoholes superiores, aldehídos y cetona. (Padilla et al., 2018).

En algunos estudios realizados, *W. anomalus* ha contribuido a reducir el grado alcohólico del vino entre 0,8 y 1,3 % (v/v) (García et al., 2020), además, influye en otros compuestos como son la acidez volátil, el color o el ácido láctico (Izquierdo et al., 2014). En el caso del vino de arroz las fermentaciones con inoculaciones simultáneas entre *W. anomalus* y *S. cerevisiae* ayudan a mejorar el grado alcohólico, la acidez volátil y total, y mejoran el perfil aromático (Chen et al., 2021). Sin embargo, esta levadura que posee un buen potencial sobre los aromas del vino, ha sido poco estudiada para su empleo en la reducción del grado alcohólico.

## 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Este trabajo se planteó para estudiar el comportamiento de diferentes cepas de *W. anomalous* en fermentaciones mixtas con *S. cerevisiae* y su capacidad de modificar el grado alcohólico del vino, en mosto procedente de uva Verdejo. Las cepas de levadura usadas en este estudio han sido aisladas de la Denominación de Origen Rueda y han sido estudiadas a nivel enzimático, presentando actividades enzimáticas de proteasas,  $\beta$ -glucosidasas,  $\beta$ -glucanasas y  $\beta$ -liasas, enzimas que presentan un gran interés en la vinificación del vino blanco (Izquierdo, 2019).

El objetivo principal de este estudio es la utilización de un cultivo mixto durante la vinificación formado por las levaduras *W. anomalous* y *S. cerevisiae* para modificar el grado alcohólico de los vinos blancos.

Para ello se han propuesto diversos objetivos específicos:

- Estudio de la compatibilidad de ambas levaduras usando medios específicos.
- Estudio de la implantación de las levaduras en las diferentes etapas de la fermentación.
- Estudio de las características finales del vino mediante analíticas básicas.



### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Microorganismos**

##### **3.1.1. Levaduras no-*Saccharomyces***

Las levaduras no-*Saccharomyces* que se han utilizado en el estudio han sido aisladas durante la fermentación de mosto Verdejo procedente de la Denominación de Origen Rueda. La especie utilizada es *Wickerhamomyces anomalus*, de la que se utilizaron 16 cepas diferentes, designadas del 1 al 16 respectivamente, con el prefijo WA antes del número (WA 1, WA 2, ..., WA 16).

##### **3.1.2. Levaduras *Saccharomyces***

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada para el estudio ha sido la cepa comercial WAM de la casa comercial Lallemand, la cual fue aislada en 1998 en la DO Rueda.

##### **3.1.3. Observación al microscopio**

Para comprobar el desarrollo de las levaduras durante la vinificación, se han observado en el microscopio (Leica DM750) con el objetivo de 40X. Para ello, directamente se cogió una gota con una pipeta Pasteur del cultivo, previamente homogeneizado y se cubrió con un cubreobjetos. A continuación, se realizó la observación.

##### **3.1.4. Estimación de células para la siembra**

Para sembrar las levaduras a la concentración deseada, se estableció el volumen a inocular en cada matraz, para ello se utilizó la escala McFarland. Este método relaciona la turbidez de la muestra con unos patrones de sulfato de bario, medida en un espectrofotómetro (Thermo Scientific™ UV-Vis Genesys™ 150) a una longitud de onda de 600 nm. Con esta técnica se determina el número de unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml) presente en nuestra muestra (McFarland et al., 1999).

##### **3.1.5. Conservación de las levaduras**

Se realizó una siembra en estría de las levaduras en placas de medio YPD, CECT 138 y de medio lisina (descritos en los apartados 3.2.2. y 3.2.3. respectivamente), ya que, de este modo, se observaba el medio en que las levaduras tenían un mejor crecimiento.

En todos los casos, después de la siembra se incubaron en la estufa a 21 °C.



Imagen 3: Agar inclinado con medio CECT 138. Fuente: Propia.

### 3.2. Medios de cultivo

A continuación, se indican los medios de cultivo utilizados y su composición.

#### 3.2.1. Mosto

El mosto utilizado para este estudio es de la variedad Verdejo de la añada del 2020.

Antes de su uso se hizo una analítica inicial de grado probable, pH y anhídrido sulfuroso. Para determinar el grado probable se utilizó un refractómetro (ATAGO, Hand refractometer ATC-1), en el caso del pH se determinó mediante un pH-metro SENSION TM+ y el anhídrido sulfuroso libre (SO<sub>2</sub> libre) se resolvió con un analizador automático (SO<sub>2</sub>-MATIC, CRISON).

Tabla 1: Analítica inicial del mosto.

| Analítica             | Resultado       |
|-----------------------|-----------------|
| pH                    | 3,72 ± 0,2      |
| Grado probable        | 23,2 ± 0,1 Brix |
| SO <sub>2</sub> libre | 30 ± 1 mg/l     |

#### 3.2.2. Medio YPD

El medio YPD (extracto de levadura-peptona-dextrosa) es un medio sólido compuesto por un 2% (p/v) de glucosa, un 2% (p/v) de peptona, un 1% (p/v) de extracto de levadura y un 1,5% (p/v) de agar. Antes de utilizar este medio se esteriliza durante 20 min a una temperatura de 121 °C en el autoclave.

#### 3.2.3. Medio CECT 138

Este medio, según la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) es específico para levaduras *no-Saccharomyces*, está formado por un 1% (p/v) de glucosa, un 0,5% (p/v) de peptona vegetal nº 1, un 0,3% (p/v) de extracto de levadura, un 0,3% (p/v) de extracto de malta y un 2% (p/v) de agar. La esterilización se realizó durante 20 min a 121 °C en el autoclave.

#### **3.2.4. Medio Lisina**

Este medio es utilizado para el crecimiento de levaduras no-*Saccharomyces*, para su preparación se ha seguido el protocolo recogido en la Resolución OIV/OENO 206/2010, pero modificando la esterilización, ya que esta se ha realizado a vapor fluyente durante 20 min. Su composición es: 1,18% (p/v) de base carbonatada de levaduras, 0,25% (p/v) de lisina-HCL y 2% (p/v) de agar.

#### **3.2.5. Medio para la interacción entre levaduras**

Este medio se ha utilizado para comprobar la producción de toxinas de unas levaduras y la resistencia de otras frente a ellas. Es un medio sólido descrito por Izgü et al en 1997 el cual está compuesto por 0,1% (p/v) de extracto de levadura, 0,2% (p/v) de bactopectona, 0,2% (p/v) de glucosa, 0,35% (p/v) de agar, el cual se acidifica con ácido cítrico 1M hasta obtener un pH 4,2-4,7, a continuación, se le añade 2% de azul de metileno preparado previamente al 1%, y un 1% de tampón citrofosfato 2M. Antes de su utilización el medio se esteriliza durante 20 minutos a vapor fluyente. (Izgü et al., 1997).

#### **3.2.6. Medio actividad $\beta$ -glucosidasa**

Este medio se utilizó para evaluar la presencia y actividad de la enzima  $\beta$ -glucosidasa presente en la levadura *W. anomalus*. El método fue descrito por Diddens y Lodder, citado por Lodder y Kreger Van Rij (Lodder, 1974). El medio de cultivo está compuesto por 0,5% (p/v) de arbutina, 0,1% (p/v) de extracto de levadura, 2% de agar y 0,1% de cloruro férrico preparado al 1%. Antes de su utilización se esterilizó durante 20 minutos a una temperatura de 121 °C en el autoclave.

### **3.3. Estudio de interacción entre levaduras**

#### **3.3.1. Resistencia y producción de toxinas**

Para comprobar que las levaduras eran compatibles entre sí se comprobó su capacidad para producir toxinas y su resistencia a las mismas. Para ello se enfrentó a las levaduras *W. anomalus* (WA) y *S. cerevisiae* (WAM) mediante el test *killer* y sensible, en el cual se utiliza el medio descrito en el apartado 3.2.5.

Por un lado, se sembró la levadura WAM en profundidad en el medio, y una vez que el medio se había solidificado se sembró en estría la levadura WA en la placa.

Por otro lado, la siembra se realizó al revés, las levaduras que se siembran en profundidad junto con el medio son las levaduras WA y, sobre ellas, una vez solidificado el medio se siembra la levadura WAM en estría.

Las placas se incubaron durante una semana en la estufa a 21 °C. Una vez transcurrido este tiempo, para comprobar que ambas levaduras son compatibles, se observó si alrededor de la levadura que está sembrada en estría se formaba un halo indicativo de que impide a la levadura sembrada en profundidad crecer. En caso de que ocurra esto es que las levaduras no son compatibles, pero si no se forma halo es que todas las levaduras son compatibles y pueden coexistir en un mismo medio.

### 3.4. Microvinificaciones

#### 3.4.1. Primer ensayo

Inicialmente se planteó el estudio utilizando seis réplicas de cada levadura, haciendo un total de 102 matraces Erlenmeyer, seis para el control donde solamente se inoculó la levadura *S. cerevisiae* (WAM) y en los demás se inoculó la levadura WAM con cada una de las cepas de *W. anomalus* (WA) de forma simultánea. En tres de los matraces de las diferentes levaduras se colocó una válvula Müller para valorar la pérdida de CO<sub>2</sub> durante la fermentación, y los otros tres se utilizaron para extraer la muestra del seguimiento de las levaduras durante las fermentaciones.

Se procedió a la descongelación del mosto de uva y a su posterior homogeneización y reparto en los matraces, los cuales se llenaron con 50 ml de mosto. Una vez que se tuvieron preparados los matraces se esterilizaron.

Para el pie de cuba en esta ocasión se utilizó mosto esterilizado, en el que se sembró cada una de las levaduras por separado. A las 72 horas de haber realizado el pie de cuba se sembraron los matraces. Se colocó las válvulas en tres de los matraces correspondientes y se realizó la primera medida de su peso, después se llevaron a la estufa junto con las otras tres réplicas y se dejaron fermentar a 21 °C.



Imagen 4: Matraces en fermentación con válvula en estufa. Fuente: propia.

Una vez que los matraces iniciaron la fermentación, se procedió a realizar el seguimiento de las levaduras, para ello se realizó una siembra en estría en placas de lisina e YPD. Este proceso se realizó en condiciones estériles tras la homogeneización del matraz, en el que a continuación se introdujo el asa de siembra para tomar la muestra y finalmente se sembró la muestra sobre las placas. Una vez llevado a cabo las placas se llevaron a la estufa, donde permanecieron durante 7 días a 21 °C. El seguimiento de las levaduras se realizó a las 72 horas y a los 9 días del inicio de la fermentación.

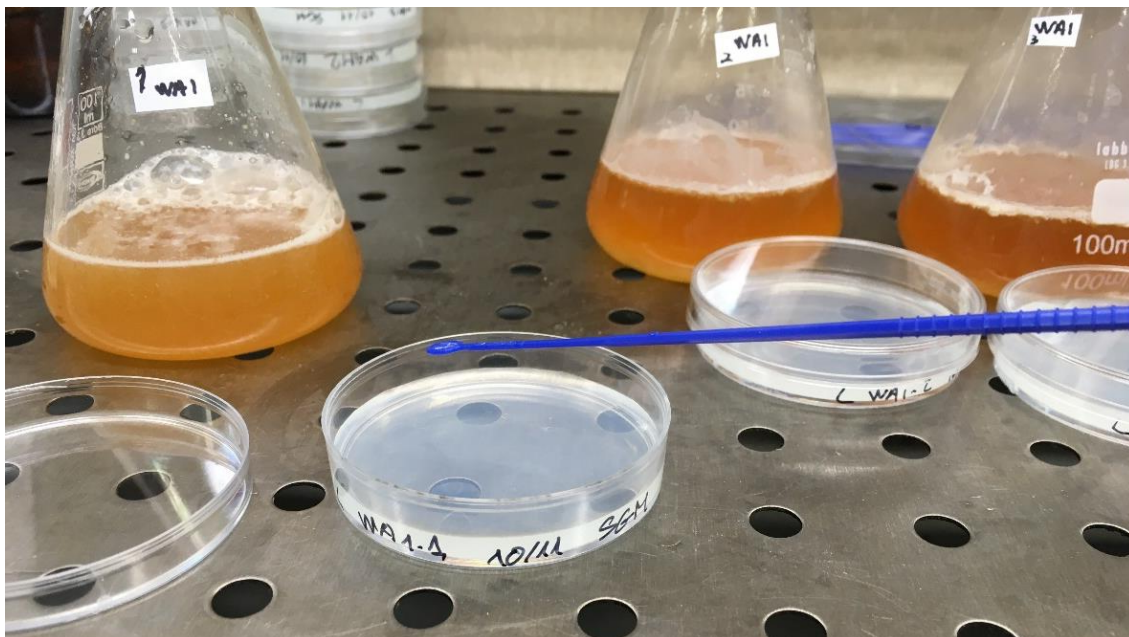


Imagen 5: Siembra en placa para el seguimiento de las levaduras. Fuente: propia.

### 3.4.2. Segundo ensayo

Se realizaron dos réplicas de cada una de las levaduras, usando un total de 34 matraces de 250 ml cada uno, en los que se añadió 200 ml de mosto.

Primeramente, se realizó un pase de las levaduras a agar inclinado de los medios YPD y CECT 138, para refrescar las levaduras de los cultivos originales.

En cuanto a los pies de cuba, en este caso se realizaron en los medios líquidos YPD y CECT 138. El medio YPD se utilizó para la levadura WAM y el medio CECT 138 se utilizó para las cepas de la levadura WA.

Antes de realizar la siembra de las levaduras se comprobó, observando cada uno de los pies de cuba al microscopio, su morfología y su crecimiento. Además, se utilizó la escala McFarland para determinar el volumen a sembrar en cada matraz, ya que se quería inocular una cantidad final de  $10^6$  UFC/ml (tabla 2).

Tabla 2: Concentración en UFC/ml de los pies de cuba obtenida mediante la escala McFarland.

| Muestra | UFC/ ml        |
|---------|----------------|
| WAM     | $4 \cdot 10^9$ |
| WA 1    | $4 \cdot 10^9$ |
| WA 2    | $5 \cdot 10^9$ |
| WA 3    | $4 \cdot 10^9$ |
| WA 4    | $3 \cdot 10^9$ |
| WA 5    | $4 \cdot 10^9$ |
| WA 6    | $2 \cdot 10^8$ |
| WA 7    | $6 \cdot 10^7$ |
| WA 8    | $4 \cdot 10^9$ |
| WA 9    | $4 \cdot 10^9$ |
| WA 10   | $4 \cdot 10^9$ |
| WA 11   | $4 \cdot 10^9$ |
| WA 12   | $5 \cdot 10^9$ |
| WA 13   | $4 \cdot 10^9$ |
| WA 14   | $5 \cdot 10^9$ |
| WA 15   | $5 \cdot 10^9$ |
| WA 16   | $4 \cdot 10^9$ |

Una vez hecha la siembra de las levaduras se procedió a dejar los matraces en la estufa a 21 °C para la realización de la fermentación alcohólica. A continuación, se realizó el seguimiento de las levaduras en cada una de las fases de la fermentación, realizando siembras a las 48 horas, a los 7 días y a los 21 días del inicio de la fermentación. Finalmente, la fermentación se dio por concluida a los 21 días y a continuación se realizaron las analíticas finales.

#### 3.4.2.1. Mosto base

El mosto tiene la composición descrita en la Tabla 1 y, en este caso, no ha sido esterilizado porque se consideró exponer a las levaduras a unas condiciones lo más próximas a las que se podrían encontrar en una bodega, como por ejemplo a la competencia con otros microorganismos.

#### 3.4.2.2. Seguimiento de las levaduras

Este estudio se realizó con el objetivo de poder diferenciar a las levaduras *S. cerevisiae* de las levaduras *W. anomalus*, puesto que las primeras no tienen actividad  $\beta$ -glucosidasa, mientras que las segundas sí.

Si la placa ha adquirido una tonalidad oscura, es debido a que la enzima  $\beta$ -glucosidasa hidroliza la arbutina liberando una quinona que reacciona con el hierro presente en el medio por la adición de cloruro férrico.

Para poder realizarlo se preparó el medio y se añadió en condiciones de esterilidad a las placas Petri. Una vez sólido se sembraron en estría las levaduras de estudio y se dejaron incubando en la estufa durante dos semanas a 21 °C.

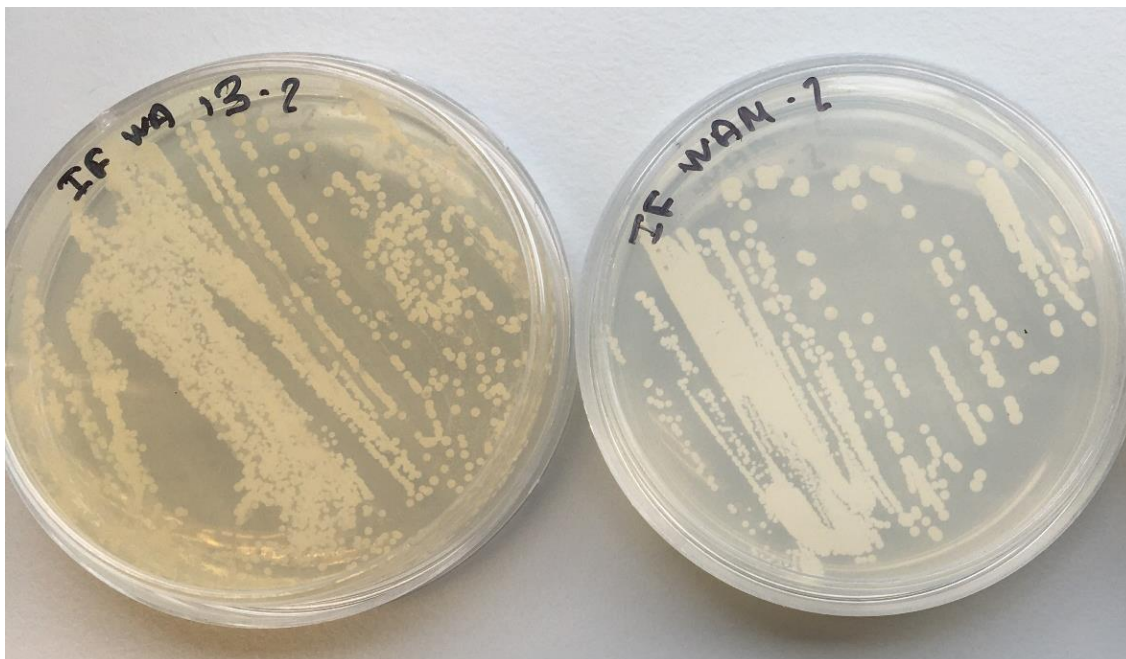


Imagen 6: Resultados positivo (izquierda) y negativo (derecha) de placas con medio actividad  $\beta$ -glucosidasa. Fuente: propia.

La toma de muestra de la fase inicial de la fermentación se sembró a las 48 horas de la inoculación del mosto con las levaduras, además se comprobó que el mosto ya estaba fermentando en los matraces debido a una formación de espuma.

Para realizar la siembra primeramente se preparó el medio y las placas y una vez que estaban solidificadas se homogeneizó el matraz mediante una agitación manual, después, se introdujo el asa de siembra dentro del matraz para tomar la muestra y a continuación, se sembró en estría en la placa deslizando el asa de siembra por toda la superficie del medio.

Una vez sembradas las placas, se llevaron a la estufa para el crecimiento de las levaduras y tras encontrarse a 21 °C durante dos semanas se pueden comprobar los resultados.

Las tomas de muestras de la fase intermedia y final de la fermentación se realizaron a los 7 y 21 días respectivamente.

### 3.4.2.3. Análisis químicos

Tras haber transcurrido 21 días se procedió a comprobar que la fermentación alcohólica había terminado mediante la analítica de los azúcares reductores. Además, se caracterizó el vino final mediante el análisis del grado alcohólico y la medición del pH (pH-metro SENSION™ +).

#### Azúcares reductores

La medición de los azúcares reductores se llevó a cabo siguiendo el procedimiento de Rebelein. Este procedimiento consta en provocar la reacción de los azúcares presentes en el vino con sales cúpricas en una solución alcalina y con una adición de calor. Para ello se realizó el proceso con el vino y el blanco paralelamente, este último consiste en sustituir la cantidad de vino por agua.

El protocolo a seguir marca que en un matraz Erlenmeyer de 100 ml se añade 1 ml de vino (agua en el caso del blanco), 5 ml de disolución cúprica, 2,5 ml de disolución alcalina de Sal de Seignette y algunas bolitas de vidrio. Después, se lleva a ebullición la mezcla para hacer reaccionar a los compuestos y se mantiene en ebullición durante 2 minutos. Una vez que ha transcurrido este tiempo, hay que enfriar la reacción bajo el agua con una leve agitación. A continuación, se añade a la muestra 5 ml de yoduro de potasio (KI) al 30%, 5 ml de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) al 16% y 5 ml de almidón al 1%, una vez añadidos los reactivos se homogeneiza. Finalmente, se realiza una valoración con tiosulfato sódico ( $Na_2S_2O_3$ ) hasta que se obtiene una tonalidad color marfil (García, 1990).

La diferencia entre los mililitros gastados de tiosulfato sódico al valorar el blanco y los del vino nos da el resultado de azúcares reductores en g/l.

En la Denominación de Origen Rueda, según la Orden APA/2059/2002, se considera que un vino es seco cuando tiene una cantidad menor de 4 g/l de azúcares reductores.

### Grado alcohólico

El análisis del grado alcohólico se hizo con un ebullómetro (Ebullómetro GAB System), para realizar la medición primeramente hay que añadir agua para poder calibrar la regla que posteriormente nos dará los resultados en función de la temperatura de ebullición del vino. Una vez que se ha introducido la muestra simplemente hay que encender el ebullómetro y esperar a que la temperatura del termómetro que lleva incorporado se estabilice.

Los resultados se obtienen con la regla de medición, en la que se asocia una temperatura de ebullición a un grado alcohólico en %vol.

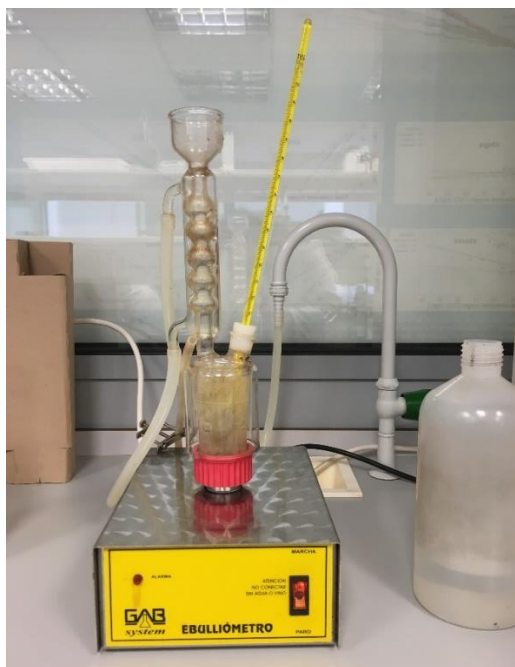


Imagen 7: Medición del grado alcohólico con ebullómetro. Fuente: propia.



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para llevar a cabo los ensayos de fermentación, previamente hay que comprobar que las levaduras son compatibles entre sí, este proceso se ha llevado a cabo siguiendo el ensayo descrito en el apartado 3.3.1. Tras saber si las levaduras son compatibles o no, hay que conocer la cantidad de levaduras que tenemos en los pies de cuba para realizar la inoculación correctamente, en este caso estimando su concentración mediante la escala McFarland. Esto es importante porque como el mosto no está estéril puede haber otras levaduras en el medio que compitan con las que se quieren inocular, no realizando la fermentación las levaduras deseadas. Además, la observación al microscopio se empleó para comprobar su viabilidad.

Durante la fermentación, se ha realizado el seguimiento de las levaduras implantadas mediante medios específicos, de este modo se conoce si la levadura WAM permite a la levadura WA intervenir durante la fermentación tras la inoculación simultánea de ambas levaduras. Finalmente, se realizan los análisis químicos para asegurar el final de la fermentación y conocer el grado alcohólico alcanzado por las levaduras y si se ha alcanzado el objetivo principal del estudio.

### 4.1. Interacción entre levaduras

Para comprobar que las levaduras pueden coexistir y llevar a cabo la fermentación juntas se ha realizado un estudio, en el que enfrentamos a las levaduras entre sí.

Para realizar el ensayo, primeramente, se siembra en una placa Petri una de las dos levaduras en profundidad en un medio específico, y una vez solidificado se siembra la otra levadura en estría. En la Tabla 3 se observan los resultados de este ensayo, en la columna central, la levadura que se encontraba sembrada en profundidad era la WAM, mientras que, en la columna de la derecha, se encontraba sembrada en estría. En ambos casos, las dos cepas han dejado que la otra creciera, puesto que no se apreció formación de halo en la placa alrededor de la levadura sembrada en estría (Imagen 8), dando así resultados negativos en el test y, por consiguiente, siendo, ambas levaduras compatibles entre sí.

En conclusión, con este ensayo comprobamos que ambas levaduras podían llevar a cabo una fermentación mixta, ya que no se inhiben entre ellas.

Tabla 3: Resultados de la interacción entre levaduras. El signo - significa que las levaduras son compatibles entre ellas, el signo + es que no son compatibles y el símbolo \* es que las levaduras no han crecido, por lo que los resultados no son concluyentes.

| Levadura | Formación de halo por inhibición de WAM | Formación de halo por inhibición de WA |
|----------|---|--|
| WA 1     | -                                       | -                                      |
| WA 2     | -                                       | -                                      |
| WA 3     | -                                       | -                                      |
| WA 4     | -                                       | -                                      |
| WA 5     | -                                       | -                                      |
| WA 6     | *                                       | *                                      |
| WA 7     | *                                       | -                                      |
| WA 8     | -                                       | -                                      |
| WA 9     | -                                       | -                                      |
| WA 10    | -                                       | -                                      |
| WA 11    | -                                       | -                                      |
| WA 12    | -                                       | -                                      |
| WA 13    | -                                       | -                                      |
| WA 14    | -                                       | -                                      |
| WA 15    | -                                       | -                                      |
| WA 16    | -                                       | -                                      |

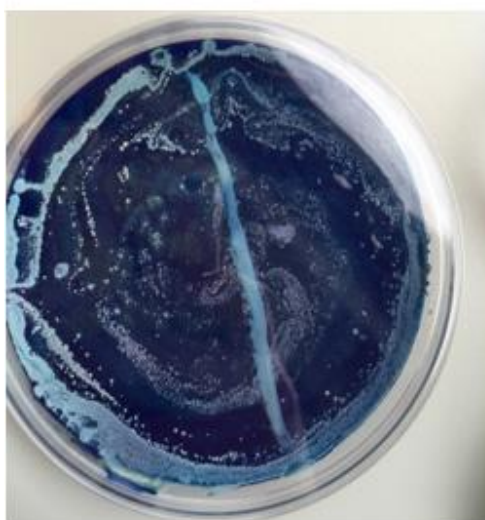


Imagen 8: : Crecimiento de levadura WAM sobre levadura WA.

## 4.2. Microvinificaciones

Los métodos moleculares son complicados de aplicar en vinificaciones con varias levaduras, debido a que se requiere de un aislamiento previo para su análisis ya que es necesario el uso de cultivos puros para poder obtener resultados. Por este motivo se han utilizado medios de cultivo específicos para levaduras *no-Saccharomyces* para realizar el seguimiento de las especies que estaban llevando a cabo la fermentación. Como el mosto no se encuentra estéril, no podemos identificar que especie en concreto se encuentra realizando la fermentación alcohólica, debido a la posible presencia de

otras levaduras, pero sí diferenciar entre levaduras *Saccharomyces* de las que no lo son.

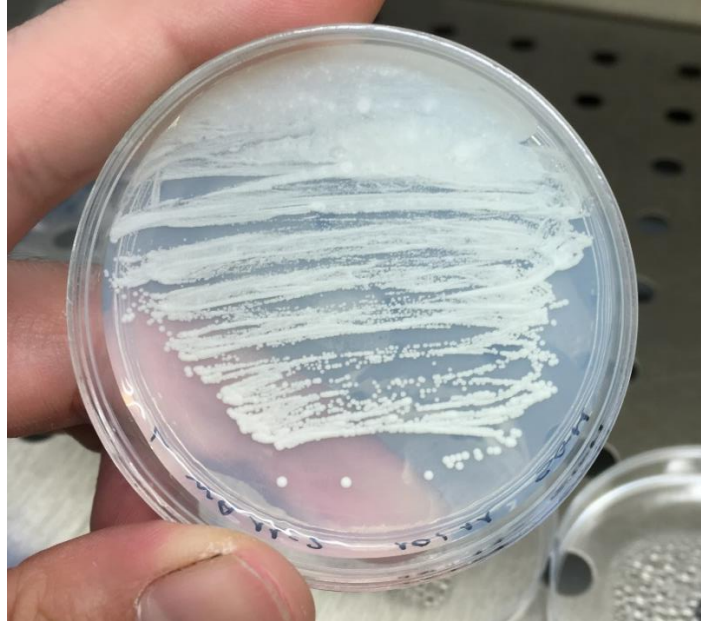
En el primer ensayo, se utilizaron los medios YPD y Lisina, ya que, estudios previos en el laboratorio demostraron que la levadura WAM no crece en el medio lisina, mientras que las levaduras WA sí. Por lo que se esperaba que en la primera etapa de la fermentación se observase crecimiento de levaduras en este medio y en las siguientes etapas no. Sin embargo, este ensayo no dio resultados puesto que la levadura *S. cerevisiae* no llevo a cabo la fermentación alcohólica debido a que tuvo problemas de implantación o se cometió algún error experimental.

En un segundo ensayo se decidió utilizar el medio de la actividad  $\beta$ -glucosidasa, que nos permite diferenciar entre especies de levaduras que presenten esta actividad de las que no lo presentan, como es el caso de las levaduras pertenecientes a la especie *S. cerevisiae*. El empleo de este medio de cultivo, además, permiten llevar a cabo la progresión de las fermentaciones, puesto que ayudan a conocer en qué fase de la fermentación nos encontramos, ya que las levaduras *no-Saccharomyces* se encuentran en la fase inicial de la misma. Una vez que estas levaduras dejan de estar presentes en este proceso nos encontramos ya en la fase tumultuosa, donde intervienen las levaduras *Saccharomyces* y, además, se aprecia que el matraz donde se está realizando la fermentación se encuentra con mayor actividad fermentativa, en la fase final se aprecia como la actividad disminuye, señal de que hay una menor población de levaduras.

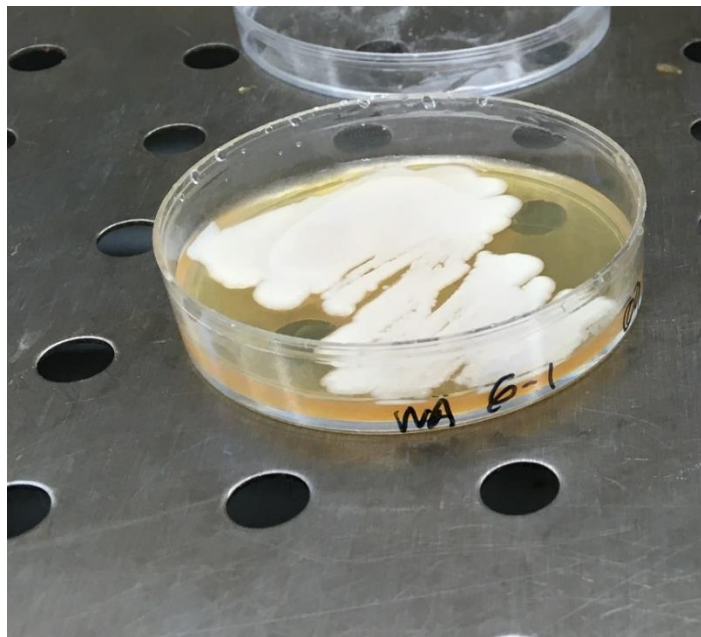
#### **4.2.1. Primer ensayo**

En el primer ensayo se realizó el seguimiento de las levaduras de la fermentación mediante los medios YPD y Lisina, para ello se utilizaron 3 de los 6 matraces con 50 ml de mosto que se sembraron, puesto que los otros tres se utilizaron para determinar el grado alcohólico mediante la pérdida de CO<sub>2</sub>.

Este ensayo tiene la finalidad de conocer las levaduras presentes en cada etapa de la fermentación. Para poder llevarlo a cabo se ha utilizado un medio genérico en el que crecen todas las levaduras (medio YPD) y un medio más específico para levaduras *no-Saccharomyces* (medio Lisina), dando los siguientes resultados.



*Imagen 9: Levaduras sembradas en estría en placa con medio Lisina.*



*Imagen 10: Levaduras sembradas en estría en placa con medio YPD.*

Tabla 4: Resultados del seguimiento de las levaduras fermentativas en los medios YPD y lisina. El signo + significa que la levadura ha crecido en el medio y el signo - es que no ha crecido.

| Levadura | Inicio FA |        | Fase tumultuosa FA |        |
|----------|-----------|--------|--------------------|--------|
|          | YPD       | Lisina | YPD                | Lisina |
| WAM 1    | +         | +      | +                  | +      |
| WAM 2    | +         | +      | +                  | +      |
| WAM 3    | +         | +      | +                  | +      |
| WA 1-1   | +         | +      | +                  | +      |
| WA 1-2   | +         | +      | +                  | +      |
| WA 1-3   | +         | +      | +                  | +      |
| WA 2-1   | +         | +      | +                  | +      |
| WA 2-2   | +         | +      | +                  | +      |
| WA 2-3   | +         | +      | +                  | +      |
| WA 3-1   | +         | +      | +                  | +      |
| WA 3-2   | +         | +      | +                  | +      |
| WA 3-3   | +         | +      | +                  | +      |
| WA 4-1   | +         | +      | +                  | +      |
| WA 4-2   | +         | +      | +                  | +      |
| WA 4-3   | +         | +      | +                  | +      |
| WA 5-1   | +         | +      | +                  | +      |
| WA 5-2   | +         | +      | +                  | +      |
| WA 5-3   | +         | +      | +                  | +      |
| WA 6-1   | +         | +      | +                  | +      |
| WA 6-2   | +         | +      | +                  | +      |
| WA 6-3   | +         | +      | +                  | +      |
| WA 7-1   | +         | +      | +                  | +      |
| WA 7-2   | +         | +      | +                  | +      |
| WA 7-3   | +         | +      | +                  | +      |
| WA 8-1   | +         | +      | +                  | +      |
| WA 8-2   | +         | +      | +                  | +      |
| WA 8-3   | +         | +      | +                  | +      |
| WA 9-1   | +         | +      | +                  | +      |
| WA 9-2   | +         | +      | +                  | +      |
| WA 9-3   | +         | +      | +                  | +      |
| WA 10-1  | +         | +      | +                  | +      |
| WA 10-2  | +         | +      | +                  | +      |
| WA 10-3  | +         | +      | +                  | +      |
| WA 11-1  | +         | +      | +                  | +      |
| WA 11-2  | +         | +      | +                  | +      |
| WA 11-3  | +         | +      | +                  | +      |
| WA 12-1  | +         | +      | +                  | +      |
| WA 12-2  | +         | +      | +                  | +      |
| WA 12-3  | +         | +      | +                  | +      |
| WA 13-1  | +         | +      | +                  | +      |
| WA 13-2  | +         | +      | +                  | +      |
| WA 13-3  | +         | +      | +                  | +      |
| WA 14-1  | +         | +      | +                  | +      |
| WA 14-2  | +         | +      | +                  | +      |
| WA 14-3  | +         | +      | +                  | +      |
| WA 15-1  | +         | +      | +                  | +      |
| WA 15-2  | +         | +      | +                  | +      |
| WA 15-3  | +         | +      | +                  | +      |
| WA 16-1  | +         | +      | +                  | +      |
| WA 16-2  | +         | +      | +                  | +      |
| WA 16-3  | +         | +      | +                  | +      |

En la Tabla 4 se aprecia como en todos los matraces las levaduras han crecido en ambos medios en las dos etapas estudiadas. Este método no ha resultado efectivo porque en la fase tumultuosa de la fermentación alcohólica, las levaduras WA no deberían haber crecido en el medio Lisina, puesto que eso significaría que han desaparecido del medio y quien estaba realizando la fermentación era la levadura WAM.

En las dos fases de la fermentación estudiadas, nos encontramos con que WAM presenta crecimiento en el medio Lisina, este crecimiento puede deberse a los nutrientes procedentes del mosto, o a que en el momento de inocular WAM se produjese algún tipo de contaminación y la levadura que se ha desarrollado en el matraz sea otra especie diferente.

Por otro lado, la pesada de los matraces utilizados para medir la pérdida de CO<sub>2</sub> no mostró cambios significativos, puesto que apenas disminuía el peso de los mismos, esto indicó que algo pasaba con la fermentación, por lo que se hizo una prueba de azúcares reductores antes de realizar el pase a la fase final de la fermentación. En esta prueba los resultados fueron de más de 28 g/l de azúcares, por lo que el método Rebelein no es efectivo. Otro indicador de que la fermentación no había terminado es que el velo que se formó en los matraces debido a la levadura WA no desaparecía.

Tras los resultados de estos ensayos, se concluyó que la levadura WAM no se había implantado por el motivo que fuera, por lo que en los matraces de fermentación solamente estaban implantadas las cepas de *W. anomalus*. Se realizó un pase de los matraces al medio de actividad  $\beta$ -glucosidasa para comprobar si la levadura WAM estaba implantada, encontrando que las levaduras que estaban implantadas presentaban actividad  $\beta$ -glucosidasa, por lo que se llegó a la conclusión final de que WAM no se había implantado en los matraces.

Por otro lado, el medio Lisina se descartó para realizar el seguimiento de la fermentación. Las levaduras podrían llevar muchos nutrientes del mosto y crecen bien en el medio de Lisina, por lo que haría falta varios pases para que las levaduras pierdan los nutrientes que arrastran del mosto y solamente tengan los propios del medio.

#### **4.2.2. Segundo ensayo**

En este segundo ensayo, se realizó la coinoculación de las levaduras en 200 ml de mosto sin esterilizar, por lo que se corría el riesgo de competencia con otras levaduras. El seguimiento de las levaduras que estaban presentes en las diferentes etapas de la fermentación se realizó mediante el medio de actividad  $\beta$ -glucosidasa, puesto que las levaduras WA si presentan la actividad  $\beta$ -glucosidasa mientras que WAM no. A continuación, se exponen los resultados de este estudio.

Tabla 5: Resultados del seguimiento de las levaduras en fermentación mediante el medio de la actividad  $\beta$ -glucosidasa. El signo + es que la levadura presenta la actividad  $\beta$ -glucosidasa y el signo - es que no presenta actividad y el símbolo \* es que las levaduras no han crecido.

| Levadura | Inicio. FA | Fase tum. FA | Final. FA |
|----------|------------|--------------|-----------|
| WAM 1    | -          | -            | (1)       |
| WAM 2    | -          | -            | -         |
| WA 1-1   | +          | -            | -         |
| WA 1-2   | +          | -            | -         |
| WA 2-1   | +          | -            | (1)       |
| WA 2-2   | +          | -            | -         |
| WA 3-1   | +          | -            | -         |
| WA 3-2   | +          | -            | -         |
| WA 4-1   | +          | -            | -         |
| WA 4-2   | +          | -            | -         |
| WA 5-1   | +          | -            | -         |
| WA 5-2   | +          | -            | -         |
| WA 6-1   | *          | -            | -         |
| WA 6-2   | *          | -            | -         |
| WA 7-1   | *          | -            | -         |
| WA 7-2   | *          | -            | -         |
| WA 8-1   | +          | -            | -         |
| WA 8-2   | +          | -            | -         |
| WA 9-1   | +          | -            | (1)       |
| WA 9-2   | +          | -            | -         |
| WA 10-1  | +          | -            | -         |
| WA 10-2  | +          | -            | (1)       |
| WA 11-1  | +          | -            | -         |
| WA 11-2  | +          | -            | (1)       |
| WA 12-1  | +          | -            | -         |
| WA 12-2  | +          | -            | -         |
| WA 13-1  | +          | -            | -         |
| WA 13-2  | +          | -            | -         |
| WA 14-1  | +          | -            | -         |
| WA 14-2  | +          | -            | -         |
| WA 15-1  | +          | -            | -         |
| WA 15-2  | +          | -            | -         |
| WA 16-1  | +          | -            | -         |
| WA 16-2  | +          | -            | -         |

(1) Las placas han sufrido contaminaciones, por lo que estos resultados no son concluyentes en esas levaduras.



Imagen 11: Resultados secuenciales de la fermentación en placas con el medio de la actividad  $\beta$ -glucosidasa. La placa de la izquierda corresponde a la fase inicial de la fermentación, la placa del medio a la fase tumultuosa y la placa de la derecha a la fase final.

Como se aprecia en la Tabla 5 y en la Imagen 11, las levaduras WA estaban presentes en la fase inicial de la fermentación, para después desaparecer en la fase tumultuosa, a partir de la cual la única levadura implantada en el mosto es la levadura WAM, la cual finaliza la fermentación alcohólica a los 21 días.

En la imagen se puede observar como en la fase inicial coexisten las dos levaduras, puesto que las colonias pertenecientes a la levadura *W. anomalus* se ven de un color más oscuro que las levaduras *S. cerevisiae*, además, se aprecia que el color de la placa ha cambiado con respecto a las placas de la fase tumultuosa y la fase final, en las cuales la única levadura que ha crecido es *S. cerevisiae*.

#### 4.3. Análisis químicos

Las analíticas básicas son un recurso que se utiliza para conocer las características químicas del vino final, en este estudio se han realizado las correspondientes a los valores de azúcares reductores, grado alcohólico y pH una vez concluida la fermentación alcohólica en el segundo ensayo.

Los azúcares reductores permiten conocer si la fermentación ha terminado. La determinación del grado alcohólico en el vino final, permitirá conocer la influencia de los cultivos mixtos sobre el contenido de etanol en comparación con la fermentación llevada a cabo sólo con WAM. Por último, se decidió realizar la analítica de pH porque es una forma rápida de conocer si las levaduras han modificado la acidez ya sea aumentándola o disminuyéndola.

A modo de resumen, en la Tabla 6 se observan las analíticas finales de los vinos, en el caso del pH y de los azúcares las analíticas se realizaron por duplicado y en el caso del grado alcohólico, se realizaron cuatro réplicas por cada una de las levaduras. Como se puede apreciar, todos los matraces han terminado la fermentación debido a que tienen menos de 4 g/l, por lo que nos encontramos ante vinos secos. En el caso del grado alcohólico, observamos como algunas WA en coinoculación han disminuido el grado alcohólico con respecto a la WAM y otras lo han aumentado, sin embargo, las mayores diferencias las encontramos entre las diferentes cepas de levadura WA. Con respecto al pH observamos que estas levaduras tienden a aumentar el pH del vino final, por lo



que podría ser interesante investigar esta levadura como medio biológico para desacidificar los vinos.

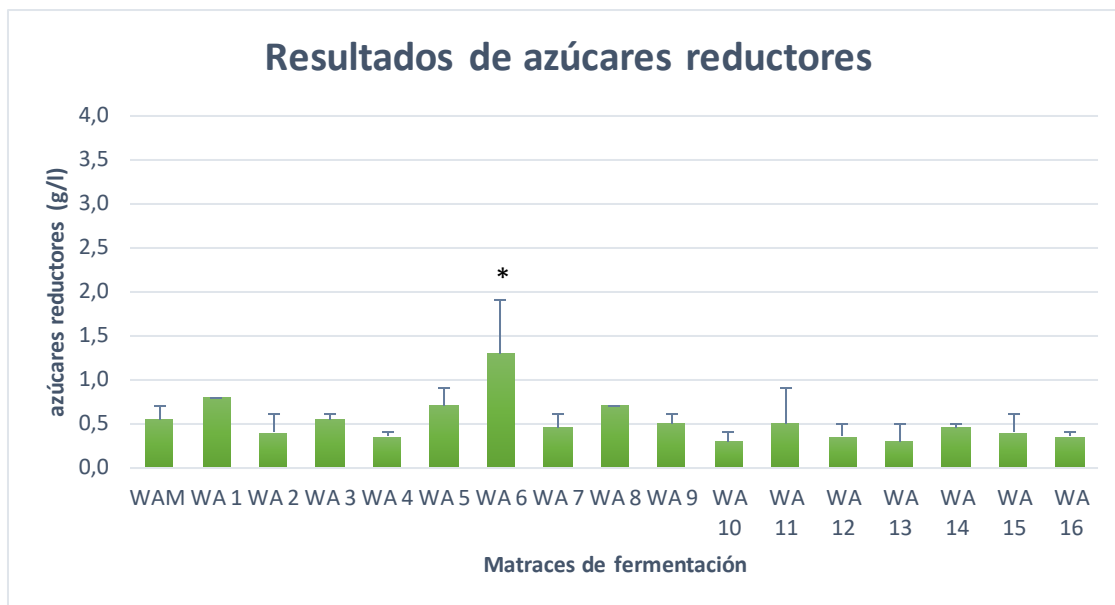
Tabla 6: Resultados de la analítica final del vino. Los azúcares reductores se encuentran expresados en g/l. El grado alcohólico en % Vol.

| Levadura | pH                         | Az. Red (g/l)           | G. alcohólico (%Vol)       |
|----------|----------------------------|-------------------------|----------------------------|
| WAM      | 3,52 ± 0 <sup>ab</sup>     | 0,6 ± 0,2 <sup>a</sup>  | 12,6 ± 0,5 <sup>bcd</sup>  |
| WA 1     | 3,61 ± 0 <sup>abcd</sup>   | 0,8 ± 0,0 <sup>ab</sup> | 12,6 ± 0,5 <sup>bcd</sup>  |
| WA 2     | 3,54 ± 0 <sup>abc</sup>    | 0,4 ± 0,2 <sup>a</sup>  | 12,1 ± 0,6 <sup>abcd</sup> |
| WA 3     | 3,61 ± 0 <sup>abcd</sup>   | 0,6 ± 0,1 <sup>a</sup>  | 12,3 ± 0,2 <sup>abcd</sup> |
| WA 4     | 3,54 ± 0 <sup>abc</sup>    | 0,4 ± 0,1 <sup>a</sup>  | 12,3 ± 0,3 <sup>abcd</sup> |
| WA 5     | 3,55 ± 0,1 <sup>abcd</sup> | 0,7 ± 0,2 <sup>ab</sup> | 12,1 ± 0,2 <sup>abc</sup>  |
| WA 6     | 3,51 ± 0,1 <sup>a</sup>    | 1,3 ± 0,6 <sup>b</sup>  | 11,8 ± 0,4 <sup>a</sup>    |
| WA 7     | 3,62 ± 0 <sup>abcd</sup>   | 0,5 ± 0,2 <sup>ab</sup> | 12,0 ± 0,4 <sup>ab</sup>   |
| WA 8     | 3,56 ± 0 <sup>abcd</sup>   | 0,7 ± 0,0 <sup>a</sup>  | 12,0 ± 0,6 <sup>ab</sup>   |
| WA 9     | 3,64 ± 0 <sup>bcd</sup>    | 0,6 ± 0,1 <sup>a</sup>  | 12,4 ± 0,7 <sup>abcd</sup> |
| WA 10    | 3,62 ± 0 <sup>cd</sup>     | 0,3 ± 0,1 <sup>a</sup>  | 12,0 ± 0,5 <sup>ab</sup>   |
| WA 11    | 3,66 ± 0,1 <sup>abcd</sup> | 0,5 ± 0,4 <sup>a</sup>  | 12,5 ± 0,7 <sup>abcd</sup> |
| WA 12    | 3,61 ± 0 <sup>abcd</sup>   | 0,4 ± 0,2 <sup>a</sup>  | 12,8 ± 0,7 <sup>bcd</sup>  |
| WA 13    | 3,61 ± 0 <sup>abcd</sup>   | 0,3 ± 0,2 <sup>a</sup>  | 12,3 ± 0,2 <sup>abcd</sup> |
| WA 14    | 3,62 ± 0 <sup>abcd</sup>   | 0,5 ± 0,1 <sup>a</sup>  | 13,0 ± 0,4 <sup>d</sup>    |
| WA 15    | 3,67 ± 0 <sup>d</sup>      | 0,4 ± 0,2 <sup>a</sup>  | 12,9 ± 0,6 <sup>cd</sup>   |
| WA 16    | 3,55 ± 0,1 <sup>abc</sup>  | 0,4 ± 0,1 <sup>a</sup>  | 12,1 ± 0,2 <sup>abc</sup>  |

#### 4.3.1. Azúcares reductores

Para los vinos secos es muy importante que los azúcares se agoten, ya que de este modo el vino es más estable microbiológicamente hablando porque se reducen las posibilidades de que ciertos microorganismos puedan crecer en el vino.

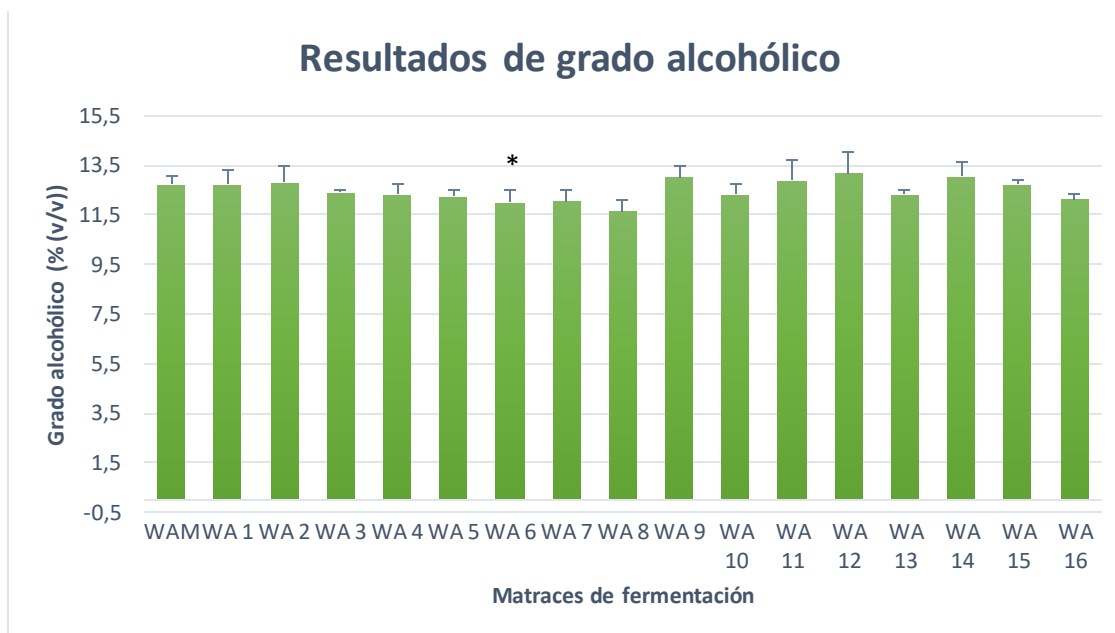
Como se ve en la Gráfica 1, hay diferencias significativas entre WAM y su coinoculación con WA 6. Además, entre la levadura WA 6 con otras cepas de levaduras WA también se encuentran diferencias significativas, en concreto con las cepas 2, 3, 4, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16.



Gráfica 1: Resultados de la analítica de los azúcares reductores. \*  $p > 0,05$  con respecto a WAM

#### 4.3.2. Grado alcohólico

Como se aprecia en la Tabla 6, los valores obtenidos en las fermentaciones están comprendidos entre 11,5 y 13 % (v/v), lo cual son valores normales para un vino procedente de la variedad Verdejo.



Gráfica 2: Resultados de la analítica del grado alcohólico. \*  $p > 0,05$  con respecto a levadura WAM.

En la Gráfica 2, se observa como el matraz de fermentación correspondiente a la levadura WAM presenta diferencias significativas respecto al matraz que contiene la coinoculación de esta levadura con WA 6, esto se puede deber a que, además, tiene una mayor cantidad de azúcares reductores que el resto de las coinoculaciones.

Sin embargo, hay más diferencias entre las coinoculaciones de WAM con las diferentes cepas de WA, en algunos casos el contenido de grado alcohólico aumenta, siendo el

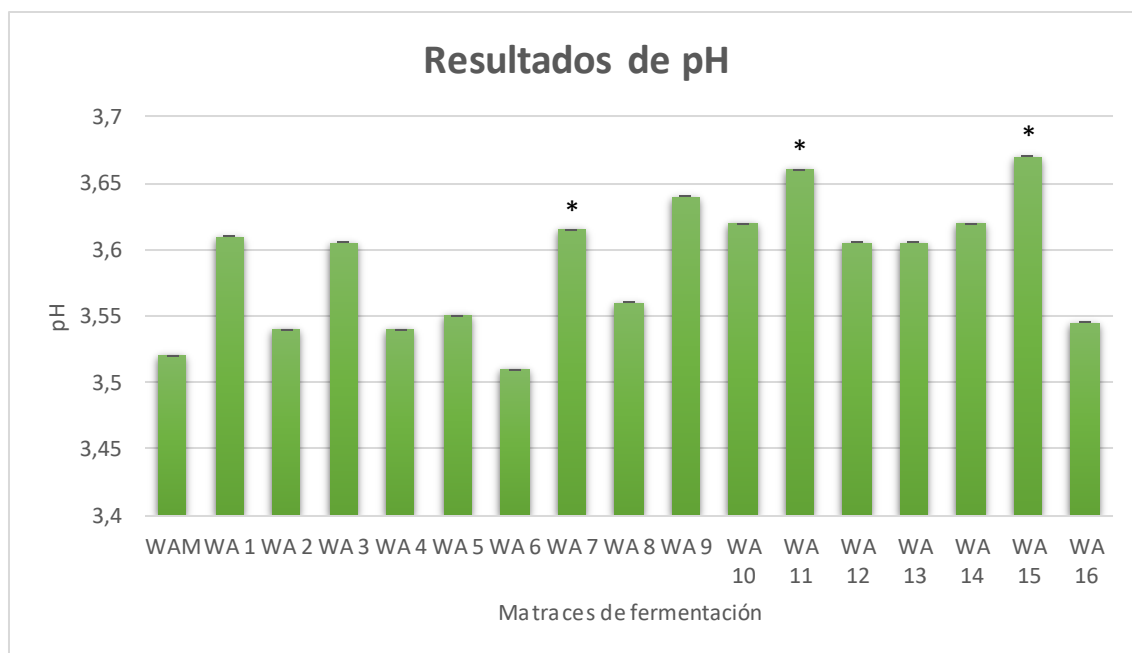
caso de las cepas WA 15 con WA 6, WA 7 y WA 8 o de las cepas WA 12 y WA 1 con WA 6. En otros casos el contenido de alcohol ha disminuido, como en el caso de WA 10 con WA 14 y 15.

Que se hayan obtenido diferencias significativas entre las coinoculaciones con distintas cepas nos indica que, aunque las levaduras sean pertenecientes a una misma especie, cada cepa funciona de una forma diferente. Por ello no solo hay que tener en cuenta la especie, sino que también es importante tener en cuenta la cepa.

### 4.3.3. pH

Los parámetros normales de pH para un vino están entre 3 y 4 (Moreno et al., 2010), si el vino está por debajo de esos valores se puede recurrir a una corrección para desacidificarlo, mediante diferentes técnicas, tanto químicas (carbonato cálcico, bicarbonato potásico o tartrato neutro de potasio) como biológicas (uso de levaduras secas activas o la fermentación maloláctica). Por el contrario, si el vino se encuentra por encima de estos valores la acidificación podría realizarse mediante ácidos orgánicos, como el ácido tartárico o el ácido cítrico, o con resinas de intercambio catiónico (Hidalgo, 2018).

En la Gráfica 3 se muestran los valores obtenidos en nuestros vinos, los cuales se encuentran entre los valores antes citados, por lo que consideramos que los valores son correctos. Se observan diferencias significativas de las levaduras WA 7, WA 11 y WA 15 con respecto a la levadura WAM, las cuales, fijándonos en la Tabla 6, han hecho que aumente el pH, lo que podría ser interesante en zonas donde la acidez del vino sea baja.



Gráfica 3: Resultados de la analítica de pH. \*  $p > 0,05$  con respecto a levadura WAM.

Al igual que en los casos anteriores, hay diferencias también entre las cepas de las levaduras WA, siendo la WA 7 la que mayor número de diferencias presenta con las demás, puesto que estadísticamente se diferencia de las levaduras WA 2, WA 4, WA 5, WA 6, WA 8 y WA 16. En todos estos casos el pH es menor que con WA 7, lo cual es interesante porque a nivel microbiológico el vino es más estable y se podría utilizar en zonas donde el pH sea alto. Sin embargo, esta no es la única levadura, ya que WA 6

presenta diferencias con WA 9, WA 11 o WA 15, en este caso al igual que ocurre con aquellas inoculaciones que presentan diferencia con la WAM, el pH aumenta. Y WA 15 presenta diferencias con WA 2, WA 4 y WA 16, provocando también, una disminución del pH.

## 5. CONCLUSIONES

Tras conocer los resultados del presente estudio se han llegado a las siguientes conclusiones:

- Las cepas estudiadas de levadura *W. anomalus* son compatibles con la cepa de *S. cerevisiae* que se ha utilizado para el estudio.
- Durante la fermentación mixta, primero se han implantado las levaduras *W. anomalus* y después ha actuado *S. cerevisiae* llegando a finalizar la fermentación correctamente, puesto que en todos los vinos la cantidad de azúcares reductores ha sido menor a 4 g/l.
- Los medios de cultivo basados en propiedades enzimáticas específicas de las levaduras no-*Saccharomyces* son de utilidad para realizar el seguimiento de las levaduras durante la fermentación.
- La influencia sobre el grado alcohólico del uso de un cultivo mixto mediante la inoculación simultánea de levaduras *W. anomalus* y *S. cerevisiae* es dependiente de la cepa.
- Algunas cepas de *W. anomalus* son capaces de disminuir o aumentar el pH del vino, por lo que es una levadura a tener en cuenta para realizar correcciones de acidez de forma biológica.

Se deben realizar más estudios sobre la fermentación mixta con diferentes cepas de estas levaduras en vino blanco puesto que la especie *W. anomalus* tiene un gran potencial enológico. Podría ser interesante analizar sensorialmente los vinos fermentados con esta levadura, con objeto de determinar compuestos aromáticos que pudieran mejorar el potencial aromático de la variedad Verdejo. También, analizar parámetros que pudieran perjudicar a las características organolépticas del vino, como pudiera ser la acidez volátil o el color. Por último, cabe destacar que sería conveniente realizar los estudios en volúmenes de mosto mayores para que los resultados se asemejen lo máximo posible a lo que puede ocurrir en una bodega.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Chen, L., Li, D., Ren, L., Song, S., Ma, X., & Rong, Y. (2021). Effects of simultaneous and sequential cofermentation of *Wickerhamomyces anomalus* and *Saccharomyces cerevisiae* on physicochemical and flavor properties of rice wine. *Food Science and Nutrition*, 9(1), 71–86. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1899>
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., & Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: A new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Research*, 10(2), 123–133. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00579.x>
- Cioch-Skoneczny, M., Satora, P., Skoneczny, S., & Skotniczny, M. (2019). Yeasts associated with the spontaneously fermented grape musts obtained from cool climate white grape varieties. *Journal of Food and Nutrition Research*, 58(4), 295–306.
- Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Comitini, F., Gobbi, M., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2011). Outlining a future for non-*Saccharomyces* yeasts: Selection of putative spoilage wine strains to be used in association with *Saccharomyces cerevisiae* for grape juice fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 147(3), 170–180. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.020>
- Droulia, F., & Charalampopoulos, I. (2021). Future climate change impacts on european viticulture: A review on recent scientific advances. *Atmosphere*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/atmos12040495>
- Ferraro, L., Fatichenti, F., & Ciani, M. (2000). Pilot scale vinification process using immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*, 35(10), 1125–1129. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00148-5](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00148-5)
- Fraga, H., Malheiro, A. C., Moutinho-Pereira, J., & Santos, J. A. (2012). An overview of climate change impacts on European viticulture. *Food and Energy Security*, 1(2), 94–110. <https://doi.org/10.1002/fes3.14>
- García Barceló, J. (1990). Técnicas analíticas para vinos. In *Técnicas analíticas para vinos*. GAB.
- García, M., Esteve-Zarzoso, B., Cabellos, J. M., & Arroyo, T. (2020). Sequential non-saccharomyces and saccharomyces cerevisiae fermentations to reduce the alcohol content in wine. *Fermentation*, 6(2). <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION6020060>
- Gutiérrez, A., Boekhout, T., Gojkovic, Z., & Katz, M. (2018). Evaluation of non-*Saccharomyces* yeasts in the fermentation of wine, beer and cider for the development of new beverages. *Journal of the Institute of Brewing*, 124(4), 389–402. <https://doi.org/10.1002/jib.512>
- Hidalgo Fernández Cano, L. (2019). *Tratado de viticultura* (5ª ed. rev). Mundi prensa.
- Hidalgo Togores, J. (2018). *Tratado de enología* (Ediciones Mundi-Prensa (ed.); 3ª Edición).
- Izgü, F., Altınbay, D., & Yüceliş, A. (1997). Identification and killer activity of a yeast contaminating starter cultures of *Saccharomyces cerevisiae* strains used in the Turkish baking industry. *Food Microbiology*, 14(2), 125–131. <https://doi.org/10.1006/fmic.1996.0082>

- Izquierdo Cañas, P. M., Palacios García, A. T., & García Romero, E. (2011). Enhancement of flavour properties in wines using sequential inoculations of non-*Saccharomyces* (*Hansenula* and *Torulasporea*) and *Saccharomyces* yeast starter. *Vitis - Journal of Grapevine Research*, 50(4), 177–182.
- Izquierdo, L. (2019). *Caracterización enológica de levaduras no-Saccharomyces procedentes de la D.O. Rueda*. <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/36948>
- Izquierdo, P. M., García-Romero, E., Heras Manso, J. M., & Fernández-González, M. (2014). Influence of sequential inoculation of *Wickerhamomyces anomalus* and *Saccharomyces cerevisiae* in the quality of red wines. *European Food Research and Technology*, 239(2), 279–286. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2220-1>
- Madrigal, T., Maicas, S., & Mateo Tolosa, J. J. (2013). Glucose and ethanol tolerant enzymes produced by *Pichia* (*Wickerhamomyces*) isolates from enological ecosystems. *American Journal of Enology and Viticulture*, 64(1), 126–133. <https://doi.org/10.5344/ajev.2012.12077>
- McFarland, L. V., Surawicz, C. M., Rubin, M., Fekety, R., Elmer, G. W., & Greenberg, R. N. (1999). Recurrent *Clostridium difficile* disease: epidemiology and clinical characteristics. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 20(1), 43–50. <https://doi.org/10.1086/501553>
- Meier, N., Rutishauser, T., Pfister, C., Wanner, H., & Luterbacher, J. (2007). Grape harvest dates as a proxy for Swiss April to August temperature reconstructions back to AD 1480. *Geophysical Research Letters*, 34(20), 1–6. <https://doi.org/10.1029/2007GL031381>
- Moreno Vígara, J. J., & Peinado Amores, R. A. (2010). *Química enológica* (1ª ed.). A. Madrid Vicente[et al.].
- Padilla, B., Gil, J. V., & Manzanares, P. (2016). Past and future of non-*Saccharomyces* yeasts: From spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAR), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00411>
- Padilla, B., Gil, J. V., & Manzanares, P. (2018). Challenges of the non-conventional yeast *wickerhamomyces anomalus* in winemaking. *Fermentation*, 4(3). <https://doi.org/10.3390/fermentation4030068>
- Padilla, B., Zulian, L., Ferreres, À., Pastor, R., Esteve-Zarzoso, B., Beltran, G., & Mas, A. (2017). Sequential inoculation of native non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae* strains for wine making. *Frontiers in Microbiology*, 8(JUL), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01293>
- Passoth, V., Fredlund, E., Druvefors, U. Ä., & Schnürer, J. (2006). Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. *FEMS Yeast Research*, 6(1), 3–13. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2005.00004.x>
- Quirós, M., Rojas, V., Gonzalez, R., & Morales, P. (2014). Selection of non-*Saccharomyces* yeast strains for reducing alcohol levels in wine by sugar respiration. *International Journal of Food Microbiology*, 181, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.024>
- Vejarano, R. (2020). *Non- Saccharomyces in Winemaking : Source of Mannoproteins , Nitrogen , Enzymes , and Antimicrobial Compounds*. 1–18.
- Venios, X., Korkas, E., Nisiotou, A., & Banilas, G. (2020). Grapevine responses to heat stress and global warming. *Plants*, 9(12), 1–15. <https://doi.org/10.3390/plants9121754>

## Anexos

### Anexo I. UFC/ml de los pies de cuba.

Tabla 7: Resultados de la Escala McFarland.

| Muestra    | Absorbancia (600 nm) | UFC/ml         | Volumen a sembrar |
|------------|----------------------|----------------|-------------------|
| Blanco YPD | -                    | -              | -                 |
| Blanco 138 | -                    | -              | -                 |
| WAM        | 1,440                | $4 \cdot 10^9$ | 50 $\mu$ l        |
| WA 1       | 1,450                | $4 \cdot 10^9$ | 50 $\mu$ l        |
| WA 2       | 1,630                | $5 \cdot 10^9$ | 40 $\mu$ l        |
| WA 3       | 1,462                | $4 \cdot 10^9$ | 50 $\mu$ l        |
| WA 4       | 1,277                | $3 \cdot 10^9$ | 60 $\mu$ l        |
| WA 5       | 1,490                | $4 \cdot 10^9$ | 50 $\mu$ l        |
| WA 6       | 0,279                | $2 \cdot 10^8$ | 1 ml              |
| WA 7       | 0,183                | $6 \cdot 10^7$ | 3 ml              |
| WA 8       | 1,419                | $4 \cdot 10^9$ | 50 $\mu$ l        |
| WA 9       | 1,394                | $4 \cdot 10^9$ | 50 $\mu$ l        |
| WA 10      | 1,379                | $4 \cdot 10^9$ | 50 $\mu$ l        |
| WA 11      | 1,472                | $4 \cdot 10^9$ | 50 $\mu$ l        |
| WA 12      | 1,567                | $5 \cdot 10^9$ | 40 $\mu$ l        |
| WA 13      | 1,499                | $4 \cdot 10^9$ | 50 $\mu$ l        |
| WA 14      | 1,641                | $5 \cdot 10^9$ | 40 $\mu$ l        |
| WA 15      | 1,588                | $5 \cdot 10^9$ | 40 $\mu$ l        |
| WA 16      | 1,468                | $4 \cdot 10^9$ | 50 $\mu$ l        |



## Anexo II. Resultados por matraces de la analítica final del vino.

Tabla 8: Resultados de las analíticas finales del vino por matraces.

| Levadura       | pH   | %Vol |      |      | Az. Red (g/l) | Levadura       | pH   | %Vol |      |      | Az.Red (g/l) | Levaduras    | MEDIA pH | MEDIA % Vol | MEDIA Az. Red |
|----------------|------|------|------|------|---------------|----------------|------|------|------|------|--------------|--------------|----------|-------------|---------------|
|                |      | 1ª M | 2ª M | Med  |               |                |      | 1ª M | 2ª M | Med  |              |              |          |             |               |
| <b>WAM 1</b>   | 3.47 | 12.3 | 11.9 | 12.1 | 0.4           | <b>WAM 2</b>   | 3.57 | 13.1 | 13.1 | 13.1 | 0.7          | <b>WAM</b>   | 3.52     | 12.6        | 0.6           |
| <b>WA 1-1</b>  | 3.63 | 13.3 | 12.9 | 13.1 | 0.8           | <b>WA 1-2</b>  | 3.59 | 12.1 | 12.1 | 12.1 | 0.8          | <b>WA 1</b>  | 3.61     | 12.6        | 0.8           |
| <b>WA 2-1</b>  | 3.52 | 13.5 | 12.1 | 12.2 | 0.6           | <b>WA 2-2</b>  | 3.56 | 12.1 | 11.9 | 12.0 | 0.2          | <b>WA 2</b>  | 3.54     | 12.1        | 0.4           |
| <b>WA 3-1</b>  | 3.61 | 12.5 | 11.9 | 12.2 | 0.6           | <b>WA 3-2</b>  | 3.60 | 12.3 | 12.5 | 12.4 | 0.5          | <b>WA 3</b>  | 3.61     | 12.3        | 0.6           |
| <b>WA 4-1</b>  | 3.58 | 12.7 | 12.3 | 12.5 | 0.4           | <b>WA 4-2</b>  | 3.50 | 11.9 | 12.1 | 12.0 | 0.3          | <b>WA 4</b>  | 3.54     | 12.3        | 0.4           |
| <b>WA 5-1</b>  | 3.50 | 12.5 | 11.9 | 12.2 | 0.5           | <b>WA 5-2</b>  | 3.60 | 12.0 | 11.9 | 11.9 | 0.9          | <b>WA 5</b>  | 3.55     | 12.1        | 0.7           |
| <b>WA 6-1</b>  | 3.43 | 12.5 | 11.5 | 12.0 | 0.7           | <b>WA 6-2</b>  | 3.59 | 11.5 | 11.5 | 11.5 | 1.9          | <b>WA 6</b>  | 3.51     | 11.8        | 1.3           |
| <b>WA 7-1</b>  | 3.61 | 12.5 | 12.1 | 12.3 | 0.6           | <b>WA 7-2</b>  | 3.62 | 11.6 | 11.7 | 11.7 | 0.3          | <b>WA 7</b>  | 3.62     | 12.0        | 0.5           |
| <b>WA 8-1</b>  | 3.50 | 11.0 | 12.5 | 11.8 | 0.7           | <b>WA 8-2</b>  | 3.62 | 12.1 | 12.1 | 12.1 | 0.7          | <b>WA 8</b>  | 3.56     | 12.0        | 0.7           |
| <b>WA 9-1</b>  | 3.64 | 13.5 | 11.7 | 12.6 | 0.4           | <b>WA 9-2</b>  | 3.64 | 12.5 | 11.9 | 12.2 | 0.6          | <b>WA 9</b>  | 3.64     | 12.4        | 0.6           |
| <b>WA 10-1</b> | 3.62 | 12.7 | 11.8 | 12.3 | 0.4           | <b>WA 10-2</b> | 3.62 | 11.9 | 11.4 | 11.7 | 0.2          | <b>WA 10</b> | 3.62     | 12.0        | 0.3           |
| <b>WA 11-1</b> | 3.61 | 13.7 | 12.1 | 12.9 | 0.1           | <b>WA 11-2</b> | 3.71 | 12.1 | 12.1 | 12.1 | 0.9          | <b>WA 11</b> | 3.66     | 12.5        | 0.5           |
| <b>WA 12-1</b> | 3.62 | 14.0 | 12.3 | 13.2 | 0.5           | <b>WA 12-2</b> | 3.59 | 12.3 | 12.3 | 12.3 | 0.2          | <b>WA 12</b> | 3.61     | 12.8        | 0.4           |
| <b>WA 13-1</b> | 3.60 | 12.5 | 12.1 | 12.3 | 0.5           | <b>WA 13-2</b> | 3.61 | 12.1 | 13.3 | 12.2 | 0.1          | <b>WA 13</b> | 3.61     | 12.3        | 0.3           |
| <b>WA 14-1</b> | 3.61 | 13.6 | 12.9 | 13.3 | 0.4           | <b>WA 14-2</b> | 3.63 | 12.5 | 12.7 | 12.6 | 0.5          | <b>WA 14</b> | 3.62     | 13.0        | 0.5           |
| <b>WA 15-1</b> | 3.63 | 12.9 | 13.8 | 13.4 | 0.2           | <b>WA 15-2</b> | 3.71 | 12.5 | 12.1 | 12.3 | 0.6          | <b>WA 15</b> | 3.67     | 12.9        | 0.4           |
| <b>WA 16-1</b> | 3.46 | 12.3 | 12.1 | 12.2 | 0.4           | <b>WA 16-2</b> | 3.63 | 11.9 | 11.9 | 11.9 | 0.3          | <b>WA 16</b> | 3.55     | 12.1        | 0.4           |