

Universidad de Valladolid

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE
INGENIERÍAS AGRARIAS

GRADO EN ENOLOGÍA

Aislamiento y selección de levaduras no-*Saccharomyces* en Tempranillo

Alumna

Martín de la Higuera, Sara

Tutora

Ruipérez Prádanos, Violeta

Palencia, 2022

ÍNDICE

RESUMEN.....	2
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Levaduras no- <i>Saccharomyces</i>	3
1.2. Selección de levaduras	5
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	6
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	7
3.1. Aislamiento y selección	7
3.1.1. Toma de muestra en viñedo	7
3.1.2. Aislamiento en el laboratorio	7
3.1.3. Selección de levaduras	9
3.2. Identificación de levaduras	9
3.2.1. Crecimiento en medio lisina	9
3.2.2. Actividad enzimática	10
3.2.3. Crecimiento en medio agar nutriente WL	10
3.2.4. Secuenciación	11
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
4.1. Aislamiento y selección	12
4.2. Identificación de levaduras no- <i>Saccharomyces</i>	12
4.2.1. Crecimiento en medio lisina	13
4.2.2. Actividad enzimática	14
4.3. Identificación de especies no- <i>Saccharomyces</i>	18
4.3.1. Crecimiento en agar nutriente WL.....	19
4.3.2. Secuenciación	21
4.3.3. Especies no- <i>Saccharomyces</i> aisladas	22
5. CONCLUSIONES	25
6. BIBLIOGRAFÍA.....	26
ANEXOS.....	30

RESUMEN

En los últimos años se ha demostrado la aportación de características organolépticas diferentes de las levaduras no-*Saccharomyces* en el vino, mejorando así la calidad y/o el perfil aromático de los vinos. Por otro lado, ya que el cambio climático ha afectado mucho al sector vitivinícola, en las últimas décadas, se está buscando el empleo de estas levaduras para, por ejemplo, la disminución del grado alcohólico provocado por el aumento de la concentración de azúcares en las uvas.

Los estudios de estas levaduras comparten la finalidad de innovar positivamente en el ámbito enológico para el interés de cada bodega, aportando variabilidad y tipicidad a los vinos, con características aromáticas únicas, facilitando el proceso de elaboración o mejorando las características finales del vino, y todo ello adaptándose a la variedad de uva a utilizar.

En este estudio se realizó un aislamiento y selección de levaduras no-*Saccharomyces* procedentes de un viñedo de variedad Tempranillo ubicado en Pesquera, identificando las levaduras con posible interés enológico para modular y mejorar las características finales del vino.

ABSTRACT

In the last few years, there has been demonstrated the contribution of non-*Saccharomyces* yeasts to organoleptic characteristics of wine, improving the quality and/or the aromatic profile of wines. Besides that, since climate change has greatly affected the wine sector in recent decades, the use of these yeasts is being sought for, for example, the decrease in alcohol content caused by the increase in the concentration of sugar in grapes.

The studies of these yeasts share the purpose of innovating positively in the oenological field for the interest of each winery, providing variability and authenticity to the wines, with unique aromatic characteristics, facilitating the winemaking process or improving the final characteristics of the wine, and all of this with the adaptation to the grape variety used.

In this study it was carried out the isolation and selection of non-*Saccharomyces* yeasts from a Tempranillo vineyard located in Pesquera, identifying yeasts of possible oenological interest to modulate and improve the final characteristics of the wine.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el cambio climático es un factor importante que afecta a la industria vitivinícola, provocando un aumento del contenido de azúcares en el mosto, y por consiguiente el aumento del grado alcohólico en el vino como uno de los problemas más importantes. El contenido de etanol en el vino ha aumentado de manera considerable en los últimos 20 años, tanto por el impacto del cambio climático en la producción como por buscar nuevos estilos de vino que requieran mayor madurez de la uva. Hay estudios que cuantifican el impacto del aumento de la temperatura y la luz en el rendimiento de la uva, el contenido y la acumulación de azúcares (Abeyasinghe et al., 2016). Además, su influencia en la fenología de la planta y la composición de la uva da lugar a una reducida acidez, la alteración de la maduración fenológica y el contenido en taninos (Ciani et al., 2016). La creciente demanda de nuevos productos está abriendo puertas a muchas levaduras distintas del género *Saccharomyces* (Benito S., 2018). En este sentido, algunas especies de levaduras no-*Saccharomyces* son capaces de reducir el contenido inicial de etanol en un 1 – 2 % (v/v) dependiendo de las condiciones de fermentación (Ciani et al., 2016; Röcker et al., 2016; Contreras et al., 2014).

En el proceso de fermentación no solo es importante la transformación de azúcares en etanol, sino también la formación de diferentes metabolitos secundarios que dan las características organolépticas que caracterizan y distinguen a un vino de calidad, dándole autenticidad. Tradicionalmente, las levaduras no-*Saccharomyces* se han considerado microorganismos no deseados porque podían generar compuestos desfavorables. Sin embargo, se ha demostrado que, dependiendo de la especie, son capaces de aportar propiedades interesantes y, como se ha mencionado en el párrafo anterior, incluso reducir el contenido de etanol (Binati et al., 2020). Por lo tanto, en la actualidad las levaduras no-*Saccharomyces* son de interés enológico por su potencial contribución positiva a la complejidad sensorial, a través de una producción de aromas y otros compuestos agradables sensorialmente (Ciani et al., 2016; Binati et al., 2020).

1.1. Levaduras no-*Saccharomyces*

Durante varias décadas, se consideraba que muchas de las especies de levaduras no-*Saccharomyces* eran microorganismos asociados con las características desfavorables que pudiera presentar el vino, por lo que el género *Saccharomyces* era la única opción que se consideraba a la hora de elaborar el vino.

Estas levaduras suelen estar más presentes en las primeras etapas de la fermentación alcohólica (Padilla et al., 2016), antes de ser desplazadas por levaduras de género *Saccharomyces* (Di Maro et al., 2007), ya que estas son más tolerantes al etanol y se adaptan mejor a las condiciones del mosto como anaerobiosis, bajo pH, altas temperaturas, maceración, adición de anhídrido sulfuroso (a excepción de algunos géneros como *Schizosaccharomyces*), etc. En general, los géneros de levaduras con una baja resistencia al etanol predominan en la primera etapa de arranque de la fermentación (*Hanseniaspora*, *Candida*, *Rodotorula*, *Pichia*), aquellos con resistencia moderada persisten más tiempo (*Lachancea*, *Torulaspora*), y por último el género *Saccharomyces* domina el medio hasta que se metabolizan por completo en etanol todos los azúcares fermentables (Röcker et al., 2016; Manzanares et al., 2011; Benito, Á. et al., 2019; Liu et al., 2016). Por lo tanto, las levaduras no-*Saccharomyces* tienen un papel importante en las fermentaciones espontáneas hasta que el nivel de etanol

alcanza el 4 % (v/v), una concentración que la mayoría de especies no-*Saccharomyces* no toleran (Benito, Á. et al., 2019; Calderón et al., 2019; Hierro et al., 2006; Liu et al., 2016). Sin embargo, hay géneros de no-*Saccharomyces*, como *Hanseniospora* o *Candida*, que pueden estar presentes hasta el final de la fermentación, y en consecuencia influir positivamente mejorando propiedades aromáticas y creando perfiles complejos, si se les aplica una disminución de la temperatura. (Di Maro et al., 2007).

En los últimos años se ha demostrado que algunas cepas de no-*Saccharomyces* influyen positivamente en ciertos parámetros como puede ser la calidad, los aromas, la acidez, el color, etc. (Benito, Á. et al., 2019)

Las levaduras no-*Saccharomyces* constituyen una herramienta alternativa a los métodos químicos para paliar los desequilibrios de acidez causados por el cambio climático. Se ha demostrado que el uso de algunas levaduras no-*Saccharomyces* puede llegar a reducir el pH o incrementarlo en 0,5 unidades. También algunas especies de no-*Saccharomyces* pueden producir vinos con contenidos de ácido acético más bajos que *S. cerevisiae*, como *T. delbrueckii* o *L. thermotolerans* (Calderón et al., 2019).

Estas levaduras tienen la capacidad de producir ciertas enzimas que pueden llegar a facilitar algunas operaciones en el proceso de vinificación (maceración, filtración o clarificación), aumentar el rendimiento y extracción de color, y mejorar las características del vino, especialmente aportando aromas (influencia en los aromas primarios y secundarios de los vinos). Los estudios demuestran que algunas especies de no-*Saccharomyces* pueden mejorar la intensidad aromática, aumentar la liberación de aromas varietales, como terpenos o tioles, y pueden producir concentraciones más altas de ésteres afrutados o manoproteínas que *S. cerevisiae* (Padilla et al., 2016; Manzanares et al., 2011; Hierro et al., 2006; Binati et al., 2020).

Cabe destacar que las levaduras no-*Saccharomyces* no tienen un alto poder fermentativo, por lo que es arriesgado su empleo como levadura única ya que no agota todos los azúcares, lo que supone dificultades de cara a la finalización de la fermentación (Manzanares et al., 2011; Di Maro et al., 2007). Estos finales de fermentación, junto con un pH alto, pueden aumentar el riesgo de paradas de fermentación. Este hecho también puede influir en los parámetros de calidad, e incluso producir compuestos indeseados o peligrosos para la salud humana como aminos biógenos y carbamato de etilo. Estudios científicos demuestran que hay microorganismos vinícolas no convencionales, como es el caso de algunas levaduras no-*Saccharomyces*, que se utilizan para eliminar el ácido málico de los productos ya fermentados y para estabilizar dichos vinos (Calderón et al., 2019).

Por tanto, una opción acertada para solventar la baja actividad fermentativa de las levaduras no-*Saccharomyces* y a su vez obtener las influencias positivas que nos pueden aportar, sería recurrir a los cultivos iniciadores mixtos, de forma secuencial o simultánea, como alternativa a la fermentación espontánea o inoculación de cepas comerciales de *S. cerevisiae*. Esta combinación suele suponer un retraso fermentativo de unos pocos días en comparación con la inoculación exclusiva de *S. cerevisiae* (Binati et al., 2020; Padilla et al., 2016; Liu et al., 2016; Benito, Á. et al., 2019).

1.2. Selección de levaduras

Un factor importante para conseguir una gran diversidad de vinos es emplear cepas seleccionadas procedentes de la zona vitivinícola de interés. Esta selección depende de la interacción de ciertas variables como la variedad de uva elegida, las condiciones que se emplean para el proceso de fermentación, el área de producción, la edad del viñedo, las condiciones climáticas, la integridad y técnica de la cosecha, el proceso de vinificación implantado y el tipo de vino producido, con variaciones posteriores de la calidad del vino dependiendo de la región o el año (Di Maro et al., 2007; Hart et al., 2019).

En la actualidad, se han desarrollado estrategias para optimizar y mejorar la producción de los vinos. Entre ellas, se menciona el aislamiento y la selección de cepas nativas a través de técnicas de microbiología enológica, biología molecular, e incluso de ingeniería metabólica. La selección de cepas nativas o seleccionadas localmente favorece que estas levaduras estén bien adaptadas a las condiciones de la región productora de vino y a la composición del mosto de uva. Más importante aún, pueden influir en gran medida en los perfiles aromáticos finales del vino al generar un carácter regional único (Liu et al., 2016). Es por ello que ahora existe la ventaja de la inoculación de levaduras nativas seleccionadas, una opción para poder conseguir un vino más reproducible sin privarle de las características únicas que le confieren estas levaduras nativas (Miranda-Castilleja et al., 2015).

La capacidad que tienen las levaduras no-*Saccharomyces* de secretar enzimas y producir metabolitos secundarios, etanol y glicerol, de liberar manoproteínas o de contribuir a la estabilidad del color, es específica de la especie y la cepa, por lo que es de gran importancia una selección de cuidadosa e inteligente de la cepa (Padilla et al., 2016). Por ello, es necesario un cribado amplio de las cepas para seleccionar las que posean atributos positivos y rechazar aquellas con impactos negativos, como sobreproducción de ácido sulfhídrico o ácido acético (Fleet, 2008). La combinación de cepas complementarias no-*Saccharomyces* o la inoculación de cultivos mixtos resulta una alternativa interesante, para lo que es necesaria la selección de dichas levaduras (Gutiérrez Fernández, 2018; Zhuang & Feng, 2022).

Las cepas que se incluyen en el proceso de selección son aisladas preferentemente del mosto. Una vez aislado un número significativo se procede a la caracterización. Se comienza con un número elevado de cepas, por lo que, en las primeras fases de selección, hay que incluir criterios fáciles de evaluar para identificar y descartar más rápidamente cepas que no interesen. Dependiendo de autores, hay diferentes criterios de selección teniendo en cuenta las características particulares que se quieran obtener de cada cepa de levadura para el producto final (Escribano-Viana, 2021). El presente estudio está enfocado al aislamiento e identificación de levaduras no-*Saccharomyces* presentes en uva de la variedad Tempranillo mediante su caracterización enzimática y posterior identificación a nivel de especie.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Actualmente, debido al cambio climático, los mostos pueden presentar un grado alcohólico probable alto, que conlleva difíciles finales de fermentación para los protocolos establecidos y la acidez generalmente se reduce en esos casos, lo que puede generar pH alto. La fermentación alcohólica convencional de mostos con alto grado alcohólico y elevado pH conlleva riesgos que pueden influir y/o deteriorar la calidad principal del vino, afectando a parámetros tales como acidez volátil, acidez total y azúcares residuales (Calderón et al., 2020).

El aislamiento y selección de levaduras no-*Saccharomyces* principalmente pretende mejorar la calidad de los vinos y/o facilitar el proceso de elaboración. El empleo de levaduras autóctonas favorece la adaptación a las condiciones de la región y a la composición del mosto. Por otro lado, se busca la diferenciación de los vinos, lo que podría realizarse con fermentaciones espontáneas, o bien, seleccionando estas levaduras. La opción menos arriesgada sería la selección e inoculación de dichas levaduras para llevar a cabo la fermentación.

Por lo tanto, el principal objetivo de este estudio es el aislamiento y selección de distintas levaduras no-*Saccharomyces* en las primeras etapas de la fermentación del mosto, donde estas levaduras predominan.

Para ello se plantean estos objetivos secundarios:

- Aislamiento en laboratorio de levaduras.
- Selección de levaduras aisladas y obtención de cultivos puros.
- Identificación de las especies aisladas mediante diferentes medios de cultivo y actividades enzimáticas características de levaduras no-*Saccharomcyes*.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Aislamiento y selección

3.1.1. Toma de muestra en viñedo

Para el estudio se realizó un muestreo en una parcela de un viñedo en Pesquera, Valladolid. No se necesitaba mucha uva, por lo que se consiguieron seleccionar uvas en su estado óptimo de maduración, midiendo el grado Brix de cada uno de los racimos seleccionados y seleccionando aquellos que presentaban un estado sanitario aparentemente idóneo. El muestreo se realizó cada dos líneas y tomando racimos de diferentes cepas de cada línea. En cada racimo seleccionado se cogieron uvas de la parte de la cola si éste era muy grande, y el racimo entero si era de tamaño mediano. Los racimos se trasladaron en bolsas estériles rápidamente al laboratorio de microbiología la ETSIIAA.

3.1.2. Aislamiento en el laboratorio

3.1.2.1. Mosto base

El mosto utilizado para el estudio es de la variedad Tempranillo de la añada 2021. Las muestras tomadas del viñedo se estrujaron en un digestor y se retiró la pasta. Antes de coger muestras para el estudio de mosto recién estrujado, se realizó un análisis del pH, grado probable y acidez total.

Tabla 1: Análisis del mosto base

Analítica	Resultado
pH	3,64
Grado Brix	25,2 °Brix
Grado alcohólico probable	14,9 %vol
Acidez total	6,6 g/L TH ₂

Para estos análisis se emplearon las siguientes metodologías e instrumentos:

- pH: se utilizó un pH-metro (HACH Sesion + pH3) con una escala calibrada que permita mediciones con una precisión mínima de $\pm 0,01$ uds. de pH. (Method OIV-MA-AS313-15).
- Grado Brix: se utilizó un refractómetro (ATAGO, Hand refractometer ATC-1), que indique la concentración de azúcar mediante un índice de refracción. (Method OIV-MA-AS2-02).
- Grado alcohólico probable (GAP): se calculó a partir de la determinación del grado Brix. $GAP (\%vol) = (0,6757 \cdot \text{°Brix}) - 2,0839$.
- Acidez total: se utilizó el método potenciométrico en el que hay que llevar el mosto a pH 7 añadiendo una solución de NaOH 0,1N. (Method OIV-MA-AS313-01).

3.1.2.2. Medios de cultivo de aislamiento

Los medios para el aislamiento de las levaduras empleados fueron el medio sólido YPD, medio genérico para levaduras y medio CECT 138, recomendado para el cultivo de levaduras no-*Saccharomyces*.

Medio YPD

Es un medio de cultivo sólido muy completo con un alto valor nutritivo y es capaz de favorecer el desarrollo de la mayoría de microorganismos. Se suele usar para el crecimiento de levaduras.

Medio YPD/YEPD (OIV/OENO 206/2010):

- Glucosa 20 g/L (Labkem).
- Peptona 20 g/L (Panreac).
- Extracto de levadura 10 g/L (Labkem).
- Agar 15 g/L (Bacto™,BD).

Medio CECT 138

Según la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), este es un medio de cultivo sólido recomendado para el cultivo de levaduras no-*Saccharomyces*, no es específico ya que también pueden crecer levaduras del género *Saccharomyces*.

Se usa para el aislamiento y el cultivo de levaduras, mohos y otros microorganismos acidúricos.

Medio YM/CECT 138 (OIV/OENO 206/2010):

- Glucosa 10 g/L (Labkem).
- Peptona vegetal 5 g/L (Sigma-Aldrich).
- Extracto de levadura 3 g/L (Labkem).
- Extracto de malta 3 g/L (Scharlab).
- Agar 20 g/L (Bacto™,BD).

Los medios se esterilizaron en un autoclave a 121°C durante 15 minutos.

3.1.2.3. Fermentación

Se tomó la primera muestra (Día 0) del mosto recién estrujado antes de introducirlo en la estufa a 26°C. La fermentación se llevó a cabo en un recipiente estéril. Se realizó una siembra en profundidad en placas Petri estériles con los medios YEPD y CECT 138 descritos en el apartado 3.1.2.3. Se sembraron placas con 1,0 mL y 0,1 mL del mosto recién estrujado por duplicado y para cada medio, por lo que se obtuvieron un total de 8 placas del día 0. Tres días después, al comienzo de la fermentación, se tomó la segunda muestra (Día 3), al igual que a los días 6 (fase tumultuosa) y 10 (fin de fermentación). De estos tres últimos días se realizaron diluciones de las muestras de mosto, hasta 10⁻⁸, y se realizaron siembras en profundidad de cada dilución para cada medio de cultivo. Se dejaron solidificar las placas y se incubaron en una estufa a 26°C durante una semana para su crecimiento. Se consiguió un total de 8 placas el día 0 y 16 placas del resto de días (día 3, día 6 y día 10).

Todo esto se realizó en una campana de flujo laminar (INDELAB) para asegurar un ambiente aséptico. Ya que se esperaba poder aislar entre 50 y 80 colonias, pasado este tiempo se tomaron de cada día 24 colonias aleatorias, 12 de cada medio de cultivo en placas Petri independientes, realizando tres pases, mediante siembra en estría, de la misma colonia tomada en el medio correspondiente de crecimiento (YPD o CECT 138) para un aislamiento puro.

3.1.3. Selección de levaduras

3.1.3.1. Observación al microscopio

Se observó la morfología de cada microorganismo aislado al microscopio (LeicaDM750) para descartar bacterias y confirmar morfología correspondiente a levaduras. Directamente del cultivo sólido, las levaduras fueron tomadas con el asa de siembra y llevadas a una gota de agua destilada estéril depositada en un portaobjetos, se realizó una extensión de la colonia sobre la gota de agua y se cubrió la preparación con un cubreobjetos. A continuación, se realizó la observación.

3.1.3.2. Conservación de las levaduras

Posteriormente, se realizó un pase a agar inclinado de cada levadura para una mejor conservación (medio YPD/YEPD sólido). Los cultivos se mantuvieron a 4°C para su empleo durante este estudio.

3.2. Identificación de levaduras

La identificación se llevó a cabo mediante crecimiento en medios de cultivo específicos para levaduras no-*Saccharomyces* y determinación de actividades enzimáticas, β -glucosidasa y proteasa. Finalmente, se comprobó mediante secuenciación la especie de las levaduras seleccionadas como potenciales no-*Saccharomyces*.

3.2.1. Crecimiento en medio lisina

El crecimiento en medio agar lisina se utilizó para descartar levaduras del género *Saccharomyces*. En este medio de cultivo, la lisina representa la única fuente de nitrógeno utilizable por lo que las levaduras de género *Saccharomyces* no pueden crecer en este medio, ya que forman un inhibidor intermediario. Por el contrario, la mayoría de las levaduras no-*Saccharomyces* sí que pueden utilizar este aminoácido como única fuente de nitrógeno, por lo que si se observa crecimiento en este medio se trata de levaduras no-*Saccharomyces*, pero si no crecen puede tratarse de levaduras del género *Saccharomyces*, o de levaduras no-*Saccharomyces* las cuales no han crecido (Fugelsang & Edwards, 2007).

Este medio descrito en la resolución OIV/OENO 206/2010 está compuesto por 1,2% (p/v) de base carbonatada de levaduras (Difco™), 0,25% (p/v) de lisina HCl (EMD Millipore corporation) y 2% (p/v) de agar (Bacto™, BD) [22]. Antes de su utilización se esterilizó a vapor fluyente durante 20 minutos a una temperatura de 121°C en el autoclave y se vertió en placas Petri. Tras solidificar se sembraron las levaduras y se incubaron en la estufa a 25°C durante 7 días. Pasados estos 7 días se realizó un segundo pase. Tras el segundo pase se procedió a la observación visual de las placas. Cuando la prueba es positiva se observa cómo las colonias han crecido, por el contrario, si se observa un crecimiento mínimo o nulo la prueba es negativa.

Martín de la Higuera, Sara

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID, CAMPUS DE PALENCIA

Grado en Enología

Se utilizaron controles tanto positivos como negativos. Para el control positivo se utilizó la levadura *Wickerhamomyces anomalus*, que es capaz de crecer en medio lisina, y como control negativo se eligió *Saccharomyces cerevisiae* (WAM), ambas aisladas en la ETSIIAA.

3.2.2. Actividad enzimática

3.2.2.1. Ensayo β -glucosidasa

Se utilizó el método descrito por Suárez-Lepe, Diddens y Lodder. El medio de cultivo está compuesto por 0,5% (p/v) de arbutina (Sigma), 0,1% (p/v) de extracto de levadura (Labkem), 2% (p/v) de agar (Bacto™, BD) y 2% (v/v) de una solución de cloruro férrico (Panreac) preparado al 1% (p/v). Antes de su utilización se esterilizó durante 15 minutos a una temperatura de 121°C en el autoclave. El medio se vertió en placas Petri, y después de solidificar se sembraron las levaduras en estría y se incubaron en la estufa a 25°C durante 7 días. Pasados estos 7 días se realizó una observación visual de las placas. Cuando la prueba es positiva, el medio de cultivo se ennegrece, ya que la enzima β -glucosidasa ha hidrolizado la arbutina liberando una quinona que reacciona con el hierro presente en el medio por la adición de cloruro férrico.

Se emplearon controles tanto positivos como negativos. Para el control positivo se usó la levadura *Wickerhamomyces anomalus* y como controles negativos se empleó una placa sin sembrar y otra con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (WAM), la cual no tiene actividad β -glucosidasa.

3.2.2.2. Ensayo proteasa

El medio de cultivo empleado ha sido descrito por Belda *et al.*, (2016). Contiene 1% (p/v) de extracto de levadura (Labkem), 2% (p/v) de peptona (Panreac), 2% (p/v) de glucosa (Labkem), 2% (p/v) de agar (Bacto™, BD) y 2% (p/v) de leche desnatada en polvo. El medio se esterilizó durante 15 minutos a 121°C por separado de la solución de leche desnatada para mezclarlo posteriormente. El medio se vertió en placas Petri, y después de solidificar se sembraron las levaduras y se incubaron en la estufa a 25°C durante 7 días. Pasados estos 7 días se realizó una observación visual de las placas. Se sabe que la prueba es positiva si alrededor de las colonias se ha formado un halo translúcido. Esto quiere decir que la enzima proteasa ha degradado la proteína de la leche para obtener nitrógeno, la presencia de esta enzima es capaz de hidrolizar la caseína del medio (Lin *et al.*, 2020).

Se emplearon controles tanto positivos como negativos. Para el control positivo utilizamos de nuevo la levadura *Wickerhamomyces anomalus*, que según estudios ha sido descrita como una de las secretoras de esta enzima, y como control negativo *Torulasporea delbrueckii* y *Saccharomyces cerevisiae* (WAM), que no poseen este tipo de actividad enzimática. Todas ellas aisladas en la ETSIIAA.

3.2.3. Crecimiento en medio agar nutriente WL

El agar nutriente WL (Laboratorio Wallerstein) se utilizó para evaluar la diversidad de colonias y discriminar presuntivamente las especies de levadura por la morfología y el color de la colonia (Medina *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2020).

El medio descrito en la resolución OIV/OENO 206/2010 está compuesto por 50 g/L de glucosa, 5 g/L de peptona, 4 g/L de extracto de levadura, 0,55 g/L de fosfato dihidrógeno potásico (KH₂PO₄), 0,425 g/L de cloruro potásico (KCl), 0,125 g/L de cloruro cálcico (CaCl₂), 0,125 g/L de sulfato de magnesio (MgSO₄), 0,0025 g/L de cloruro férrico (FeCl₃), 0,0025 g/L de sulfito de manganeso (MnSO₄), 0,022 g/L de verde de bromocresol y 12 g/L de agar. Antes de su utilización se esterilizó durante 15 minutos a una temperatura de 121°C en el autoclave. El medio se vertió en placas Petri, y después de solidificar se sembraron las levaduras en estría para incubarlas en la estufa a 25°C durante 5 días. Pasados estos 5 días se realizó una observación visual de las placas. Según el reconocimiento de colonias de levadura con agar nutriente WL de la Resolución OIV/OENO 206/2010 se propuso la especie de levadura no-*Saccharomyces*, descartando las colonias de color verde pálido a crema que cumplen con las características de *Saccharomyces cerevisiae*.

Se utilizó control positivo con *Wickerhamomyces anomalus* sabiendo que las colonias tendrían un color crema, con una morfología circular, superficie suave y consistencia butírica. Y como control negativo se utilizó *Saccharomyces cerevisiae* contando con el hecho de que sus colonias serían circulares de color crema a verde pálido, con protuberancias cónicas o redondas, superficie lisa y opaca y consistencia butírica (Pallman et al., 2001; Cavazza et al., 1992).

3.2.4. Secuenciación

Las muestras de los días 0 y 3, fueron enviadas al Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León para ser secuenciadas. Adicionalmente, se eligió al azar levaduras de los días 6 y 10 que se habían identificado en los medios de cultivo como *Saccharomyces* para confirmar esta identificación.

La identificación de especies se llevó a cabo mediante biología molecular, amplificando por PCR las regiones ITS del ADN ribosómico (D1/D2) y la comparación del análisis de secuencia de ADN con las regiones ITS fúngicas conocidas (OIV/OENO 408/2011), guardadas en la base de datos GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information) y con la ayuda del programa BLAST.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Aislamiento y selección

El aislamiento de levaduras procedentes de la vinificación de mosto Tempranillo en este trabajo se realizó mediante siembra de distintas muestras en diferentes días del proceso de vinificación (día 0, 3, 6 y 10). Al tomar la segunda muestra, el tercer día del proceso, la fermentación no era apreciable. El cuarto día se empezaron a observar indicios de actividad fermentativa. Las muestras de los días 6 y 10 se tomaron en fase tumultuosa de la fermentación y al finalizar la fermentación respectivamente.

Para el aislamiento se utilizaron dos medios de cultivo, YEPD y CECT 138. El medio YEPD es un medio genérico para levaduras y CECT 138 es un medio recomendado, según la Colección Española de Cultivos Tipo, para el cultivo de levaduras no-*Saccharomyces*, por lo que se usaron ambos para comprobar el medio en el que las levaduras tenían un mejor crecimiento y favorecer el aislamiento de especies no-*Saccharomyces*. Se pueden incorporar antibióticos (agentes selectivos) o reducir el pH mediante la adición de ácido para aumentar la selectividad. También se pueden añadir otros materiales fungistáticos al medio para eliminar mohos y solo permitir la proliferación de levaduras. En este trabajo no se añadieron antibióticos o antifúngicos ni se acidificó el medio CECT 138, lo que permitió el crecimiento de levaduras, mohos y bacterias, y dificultó el aislamiento de levaduras no-*Saccharomyces*.

Se trabajó con aquellas placas que presentaban colonias claramente diferenciadas o separadas. Del día 0 solo se pudo trabajar con una placa, de la cual se tomaron 12 colonias y se sembraron en estría en medio YEPD, ya que era el medio de donde provenían. Del resto de días se tomaron 12 colonias de cada medio de cultivo y se sembraron en estría en el correspondiente medio (YEPD o CECT 138). Se aislaron un total de 84 colonias.

Con el propósito de aislar sólo levaduras no-*Saccharomyces* se realizó una observación al microscopio para descartar, según su tamaño y forma, el aislamiento de bacterias. Aunque en ambos medios de cultivo se aislaron bacterias, el medio CECT 138 tuvo mayor crecimiento de estas. Los dos medios tienen una composición similar excepto por la incorporación del extracto de malta del medio CECT 138 y el pH más ácido del medio YEPD, lo que podría explicar el mayor crecimiento de bacterias en el medio CECT 138 (anexo 1). Teniendo en cuenta estos datos se consideró el medio YEPD como medio principal de aislamiento y conservación de las levaduras.

Finalmente, tras descartar aquellos aislados que microscópicamente se identifican como bacterias, se aislaron un total de 64 levaduras en medio YEPD en diferentes etapas de la fermentación espontánea que se llevó a cabo en condiciones asépticas y fuera del entorno de una bodega. Se obtuvieron 9 levaduras de mosto recién estrujado (día 0), provenientes del viñedo, 15 levaduras a los tres días de ser estrujado, iniciándose la fermentación, 16 levaduras el sexto día en fase de fermentación tumultuosa, y 24 levaduras el décimo día finalizada ya la fermentación (anexo 1).

4.2. Identificación de levaduras no-*Saccharomyces*

Se realizaron varios ensayos para la diferenciación de levaduras no-*Saccharomyces* y levaduras *Saccharomyces*: la capacidad de crecimiento en medio lisina y la producción

de las enzimas β -glucosidasa y proteasa por parte de los aislados de levadura, ya que son consideradas como propiedades características de levaduras no-*Saccharomyces*.

4.2.1. Crecimiento en medio lisina

El primer paso en la identificación consistió en el empleo del medio agar lisina, descrito en el apartado 3.2.3., para el descarte de levaduras del género *Saccharomyces* (Fugelsang & Edwards, 2007).

Tabla 2: Resultado del crecimiento de las levaduras aisladas en medio de cultivo lisina. Leyenda: - no crecimiento, + crecimiento medio, ++ crecimiento alto.

Día	Microorg.	Lisina	Día	Microorg.	Lisina
0	T0.1	++	6	T6.9	-
0	T0.2	++	6	T6.10	-
0	T0.3	++	6	T6.11	-
0	T0.4	++	6	T6.12	-
0	T0.5	++	6	T6.13	-
0	T0.6	++	6	T6.14	-
0	T0.7	++	6	T6.15	-
0	T0.8	++	6	T6.16	-
0	T0.9	++	10	T10.1	-
3	T3.1	++	10	T10.2	-
3	T3.2	++	10	T10.3	-
3	T3.3	++	10	T10.4	-
3	T3.4	++	10	T10.5	-
3	T3.5	+	10	T10.6	-
3	T3.6	+	10	T10.7	-
3	T3.7	++	10	T10.8	-
3	T3.8	++	10	T10.9	-
3	T3.9	++	10	T10.10	-
3	T3.10	++	10	T10.11	-
3	T3.11	++	10	T10.12	-
3	T3.12	-	10	T10.13	-
3	T3.13	++	10	T10.14	-
3	T3.14	++	10	T10.15	-
3	T3.15	++	10	T10.16	-
6	T6.1	-	10	T10.17	-
6	T6.2	-	10	T10.18	-
6	T6.3	-	10	T10.19	-
6	T6.4	-	10	T10.20	-
6	T6.5	-	10	T10.21	-
6	T6.6	-	10	T10.22	-
6	T6.7	-	10	T10.23	-
6	T6.8	-	10	T10.24	-

Martín de la Higuera, Sara

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID, CAMPUS DE PALENCIA

Grado en Enología

Se realizaron dos pases en este medio para evitar crecimiento debido a la reserva de nutrientes de las levaduras provenientes del mosto y se realizó una estimación visual de su crecimiento.

Las muestras a tiempo 0 y 3, presentaron un crecimiento claro en las placas, indicando la posibilidad de ser levaduras pertenecientes a géneros diferentes de *Saccharomyces*. La muestra T3.12 dio crecimiento negativo en el medio lisina. Como se puede observar los días 6 y 10 no mostraron crecimiento, por lo que podría tratarse de levaduras del género *Saccharomyces*, esto concuerda con el hecho de que las levaduras *Saccharomyces* predominen durante la fermentación desplazando a las levaduras no-*Saccharomyces*, que suelen estar en las primeras etapas de la fermentación por su baja tolerancia al etanol y peor adaptación a las condiciones del mosto como pH, altas temperaturas... (Benito, Á. et al., 2019; Hierro et al., 2006).

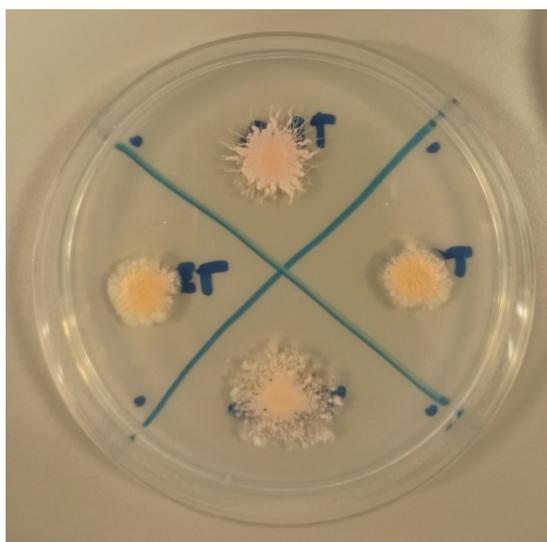


Figura 1: Resultado positivo para el crecimiento de levadura en medio lisina.

4.2.2. Actividad enzimática

En los últimos años, la contribución de las levaduras no-*Saccharomyces* se ha reevaluado, ya que tienen características enológicas deseadas ausentes en *S. cerevisiae*, como la producción de altos niveles de compuestos aromáticos y la producción y secreción de enzimas mediante transformaciones de compuestos durante ciertos procesos de fermentación (Maturano et al., 2015; Tolosa & Prieto, 2019; Liu et al., 2016). Por lo tanto, en este estudio se utilizaron estas actividades enzimáticas como método de identificación de levaduras no-*Saccharomyces*.

4.2.2.1. Actividad β -glucosidasa

Desde un punto de vista enológico, la actividad β -glucosidasa es de interés debido a que, durante la fermentación, la levadura puede liberar glucosidasas y estas enzimas pueden hidrolizar los enlaces glicosídicos de las formas inodoras unidas de monoterpenos, liberando más compuestos que contribuyen al olor del vino (Huang et al., 2021; Styger et al., 2011). La actividad enzimática β -glucosidasa aumenta significativamente la cantidad de terpenos libres, lo que sugiere que esta enzima podría ser potencialmente aplicable en la mejora del aroma del vino (Zhang et al., 2021; Baffi et al., 2013; González-Pombo et al., 2011). Sin embargo, sólo unas pocas

Martín de la Higuera, Sara

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID, CAMPUS DE PALENCIA

Grado en Enología

enzimas de levaduras aisladas de los ecosistemas enológicos y del mosto son activas en las condiciones del vino y de su proceso de elaboración, teniendo una gran influencia las características fisicoquímicas del mosto/vino como pH, temperatura, etanol, azúcares, polifenoles, etc. (Palmeri & Spagna, 2007; Zhang et al., 2021; Gao et al., 2022). Este medio nos permite diferenciar entre especies de levaduras que presentan esta actividad y las especies de *Saccharomyces cerevisiae*, las cuales, según lo descrito en la bibliografía (Jolly et al., 2014; Suranská et al., 2016), no la presentan.

Tabla 3: Resultado de las levaduras aisladas en medio de cultivo β -glucosidasa. Leyenda: - sin actividad, + actividad media, ++ mucha actividad.

Día	Microorg.	Glucosidasa	Día	Microorg.	Glucosidasa
0	T0.1	++	6	T6.9	-
0	T0.2	++	6	T6.10	-
0	T0.3	++	6	T6.11	-
0	T0.4	++	6	T6.12	-
0	T0.5	++	6	T6.13	-
0	T0.6	++	6	T6.14	-
0	T0.7	++	6	T6.15	-
0	T0.8	++	6	T6.16	-
0	T0.9	++	10	T10.1	+
3	T3.1	++	10	T10.2	-
3	T3.2	++	10	T10.3	-
3	T3.3	++	10	T10.4	-
3	T3.4	+	10	T10.5	-
3	T3.5	+	10	T10.6	++
3	T3.6	+	10	T10.7	+
3	T3.7	++	10	T10.8	-
3	T3.8	++	10	T10.9	-
3	T3.9	++	10	T10.10	-
3	T3.10	+	10	T10.11	-
3	T3.11	++	10	T10.12	-
3	T3.12	++	10	T10.13	-
3	T3.13	++	10	T10.14	-
3	T3.14	++	10	T10.15	-
3	T3.15	++	10	T10.16	-
6	T6.1	-	10	T10.17	-
6	T6.2	-	10	T10.18	-
6	T6.3	-	10	T10.19	-
6	T6.4	-	10	T10.20	-
6	T6.5	-	10	T10.21	-
6	T6.6	-	10	T10.22	+
6	T6.7	-	10	T10.23	-
6	T6.8	-	10	T10.24	-

Martín de la Higuera, Sara

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID, CAMPUS DE PALENCIA

Grado en Enología

En los primeros días (día 0 y 3) la mayoría de los aislados presentaron actividad β -glucosidasa alta, ya que en las primeras etapas es donde se encuentran más levaduras no-*Saccharomyces*, las cuales pueden poseer esta actividad. El 43,7% de las placas se ennegrecieron, lo que quiere decir que la enzima β -glucosidasa ha hidrolizado la arbutina del medio (Lin et al., 2020). Alguna placa del día 3 empezó a tener menos actividad por su menor coloración negra. Los días siguientes de fase tumultuosa (día 6) y final de fermentación (día 10), no presentaron esta actividad enzimática, las placas permanecieron igual que el control (*S. cerevisiae*). Hubo excepciones en el día 10, ya que en principio las levaduras del género *Saccharomyces* no tienen esta actividad, es posible que el medio cambiase ligeramente de color por el tiempo transcurrido en la estufa, debido a contaminaciones, o a la presencia de levaduras no-*Saccharomyces*.

Es importante destacar que la secreción de cada enzima varía significativamente dependiendo del género, especie y cepa de levadura analizada, y algunas cepas pueden no producir esta enzima en absoluto (Ganga & Martínez, 2003).

La actividad β -glucosidasa está ampliamente extendida entre la mayor parte de las levaduras, aunque cabe destacar como potenciales candidatos para su uso en la liberación de terpenos las especies de *Hanseniaspora* spp., *Wickerhamomyces anomalus*, y *Metschnikowia pulcherrima*, en las cuales se ha detectado una intensa actividad (Belda et al., 2016; Mendes Ferreira et al., 2011).

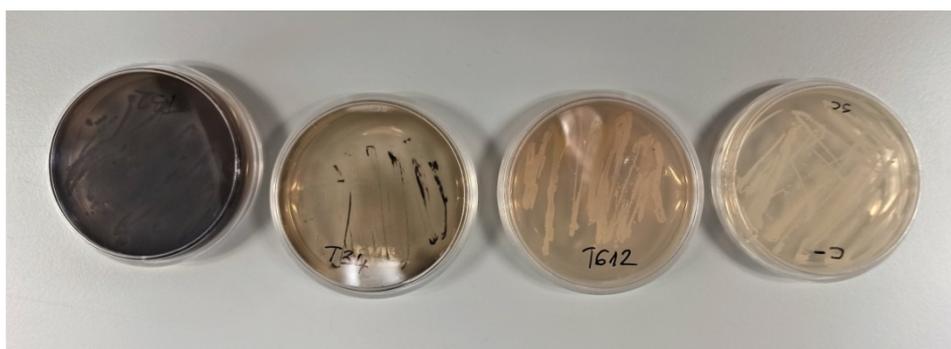


Figura 2: Resultado positivo (izquierda) y negativo (derecha) en medio β -glucosidasa

4.2.2.2. Actividad proteasa

Desde un punto de vista enológico, la actividad proteasa es de interés debido a que las levaduras pueden liberar enzimas proteasas, las cuales tienen la capacidad de hidrolizar los enlaces peptídicos de las proteínas en péptidos y/o aminoácidos libres, se pueden utilizar para mejorar la digestibilidad, el sabor del vino y el valor nutricional (descomposición de la proteína en aminoácidos) para prevenir de paradas de fermentación (Tolosa & Prieto, 2019; Toy et al., 2022).

La inestabilidad proteica inducida por las altas concentraciones de alcohol y el bajo pH podría ser la fuente de formación de neblina en los vinos. Algunas levaduras no-*Saccharomyces* descritas al secretar proteasas, reducen el potencial de neblina fría. Por lo tanto, se han realizado estudios con el propósito de encontrar proteasas que pudieran reducir la inestabilidad proteica en los vinos mediante la eliminación de las proteínas antes de la fermentación alcohólica (Tolosa & Prieto, 2019; Guo et al., 2018).

Martín de la Higuera, Sara

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID, CAMPUS DE PALENCIA

Grado en Enología

Además, esta enzima también tiene un papel importante cuando se necesita un alto contenido en nitrógeno como nutriente para las levaduras, y poder fermentar todos los azúcares del mosto, ya que el contenido de estos cada vez es mayor (Escribano et al., 2017; Strauss et al., 2001).

Este medio nos permite diferenciar entre especies de levaduras que presentan esta actividad y las especies de *Saccharomyces cerevisiae*, las cuales según lo descrito en la bibliografía, no la presentan (Strauss et al., 2001; Jolly et al., 2014).

Tabla 4: Resultado de las levaduras aisladas en medio de cultivo proteasa. Leyenda: - sin actividad, + con actividad.

Día	Microorg.	Proteasa	Día	Microorg.	Proteasa
0	T0.1	+	6	T6.9	-
0	T0.2	+	6	T6.10	-
0	T0.3	+	6	T6.11	-
0	T0.4	+	6	T6.12	-
0	T0.5	+	6	T6.13	-
0	T0.6	+	6	T6.14	-
0	T0.7	+	6	T6.15	-
0	T0.8	+	6	T6.16	-
0	T0.9	+	10	T10.1	-
3	T3.1	+	10	T10.2	-
3	T3.2	+	10	T10.3	-
3	T3.3	+	10	T10.4	-
3	T3.4	+	10	T10.5	-
3	T3.5	+	10	T10.6	+
3	T3.6	+	10	T10.7	-
3	T3.7	+	10	T10.8	-
3	T3.8	+	10	T10.9	-
3	T3.9	+	10	T10.10	-
3	T3.10	+	10	T10.11	-
3	T3.11	+	10	T10.12	-
3	T3.12	-	10	T10.13	-
3	T3.13	+	10	T10.14	-
3	T3.14	+	10	T10.15	-
3	T3.15	+	10	T10.16	-
6	T6.1	-	10	T10.17	-
6	T6.2	-	10	T10.18	-
6	T6.3	-	10	T10.19	-
6	T6.4	-	10	T10.20	-
6	T6.5	-	10	T10.21	-
6	T6.6	-	10	T10.22	-
6	T6.7	-	10	T10.23	-
6	T6.8	-	10	T10.24	-

Martín de la Higuera, Sara

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID, CAMPUS DE PALENCIA

Grado en Enología

En total, el 37,5% de los aislados fueron capaces de sintetizar proteasas y formaron halos más claros alrededor de las colonias (Lin et al., 2020), la gran mayoría de ellas en el día 0 y día 3, donde hay más probabilidad de encontrarnos con levaduras no-*Saccharomyces*, por estar en las primeras etapas de la fermentación (Ganga & Martínez, 2003). La muestra T3.12 dio negativo en esta prueba. Los días siguientes de fase tumultuosa (día 6) y final de fermentación (día 10), no presentaron esta actividad enzimática, las placas permanecieron igual que el control (*S. cerevisiae*). Hubo excepciones en el día 10, T10.6 dio positivo en actividad proteasa.



Figura 3: Resultado positivo en medio proteasa

Los resultados obtenidos del crecimiento en medio lisina y de las actividades enzimáticas de los aislados para la identificación de levaduras no-*Saccharomyces*, apuntan a que los días 0 y 3, siendo en las primeras etapas de la fermentación y habiendo dado positivo en medio lisina y actividades enzimáticas de β -glucosidasa y proteasa, sean levaduras no-*Saccharomyces*. Por el contrario, los días 6 y 10, siendo etapas posteriores de la fermentación, con un alto nivel de etanol, podrían considerarse del género *Saccharomyces* por su mínimo crecimiento o nulo en medio lisina y resultados negativos en actividades enzimáticas de β -glucosidasa y proteasa.

T10.6 da resultados que no concuerdan con características del género *Saccharomyces*, ya que, aunque no creció en medio lisina, posee actividad enzimática de β -glucosidasa y proteasa, por lo que no se descarta la posibilidad de que esta levadura sea no-*Saccharomyces*. Por otro lado, T3.12 da resultados que no concuerdan con características de levaduras no-*Saccharomyces*, ya que no creció en medio lisina siendo un aislado de las primeras etapas de la fermentación, ni presentó actividad proteasa, pero presenta actividad enzimática β -glucosidasa, por lo que sería necesaria una identificación a nivel de especie para concretar estos dos aislados.

4.3. Identificación de especies no-*Saccharomyces*

Para identificar a nivel de especie los aislados que previamente se han preclasificado como posibles no-*Saccharomyces*, se empleó inicialmente el crecimiento de estas levaduras en el medio agar nutriente WL. Posteriormente se realizó una secuenciación de levaduras de interés para identificar las levaduras a nivel de especie.

Martín de la Higuera, Sara

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID, CAMPUS DE PALENCIA

Grado en Enología

4.3.1. Crecimiento en agar nutriente WL

Como ya se mencionó en el apartado 3.2.4., este medio permite la detección de diferencias morfológicas entre especies (Lin et al., 2020). Las morfologías de las colonias de las levaduras presentes en la superficie de la uva y en los mostos en fermentación son lo suficientemente singulares como para ser identificadas hasta el género/especie por medio de placas. Por ello, se trataron de identificar los aislados mediante este método visual, el cual no pretende una identificación de especies a gran escala, puede suponer una forma rápida y barata de prever el género de algunas levaduras, es una primera aproximación a lo que se puede encontrar. No cubre todas las especies posibles aisladas en el vino.

Según la resolución OIV/OENO 206/2010 Anexo 6 de reconocimiento de colonias de levadura con agar nutriente WL, basándose en Pallman et al., 2001 y Cavazza et al., 1992, se evaluaron las morfologías de las colonias:

Tabla 5: Descripción de los aislados y posible género/especie de levadura en medio agar nutriente WL.
* = Levadura aislada distinta del resto en los días 6 y 10

Día	Microorg.	Morfología	Posible levadura
0	T0.1	azul grisáceo claro	<i>Pichia</i> spp.
0	T0.2	crema claro un poco rosa	<i>Metschnikowia</i> spp.
0	T0.3	crema un poco verdoso	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>
0	T0.4	crema claro un poco rosa	<i>Metschnikowia</i> spp.
0	T0.5	crema claro un poco rosa	<i>Metschnikowia</i> spp.
0	T0.6	azul grisáceo claro	<i>Pichia</i> spp.
0	T0.7	crema un poco verdoso	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>
0	T0.8	azul grisáceo claro	<i>Pichia</i> spp.
0	T0.9	crema un poco verdoso	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>
3	T3.1	crema claro un poco rosa	<i>Metschnikowia</i> spp.
3	T3.2	azul grisáceo oscuro	<i>Pichia</i> spp.
3	T3.3	azul grisáceo oscuro	<i>Pichia</i> spp.
3	T3.4	crema rosa borde marrón	<i>Metschnikowia</i> spp.
3	T3.5	verde claro	<i>Torulaspota</i> spp.
3	T3.6	verde claro	<i>Torulaspota</i> spp.
3	T3.7	crema claro un poco rosa	<i>Metschnikowia</i> spp.
3	T3.8	azul oscuro	<i>Pichia anomala</i>
3	T3.9	azul grisáceo oscuro	<i>Pichia</i> spp.
3	T3.10	crema claro un poco rosa	<i>Metschnikowia</i> spp.
3	T3.11	azul claro granulado polvo	<i>Pichia membranifaciens</i>
3	T3.12	verde guisante	<i>Candida stellata</i>
3	T3.13	crema rosa borde marrón	<i>Metschnikowia</i> spp.
3	T3.14	crema rosa borde marrón	<i>Metschnikowia</i> spp.
3	T3.15	crema claro un poco rosa	<i>Metschnikowia</i> spp.
6 y 10	-	crema verde pálido	<i>Saccharomyces</i> spp.
10	T10.6*	algunas crema, otras azuladas	<i>Pichia anomala</i>

Martín de la Higuera, Sara

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID, CAMPUS DE PALENCIA

Grado en Enología

Las descripciones de referencia para identificar levaduras no-*Saccharomyces* indican que, de las 64 levaduras aisladas, el 14,06% podrían pertenecer al género *Pichia* spp., pudiendo ser a nivel de especie dos de ellas *Pichia anomala* y una de ellas *Pichia membranifaciens*. El 15,62% de las levaduras aisladas tenían morfología de *Metschnikowia* spp., el 4,69% podrían ser *Zygosaccharomyces bailii*, el 3,12% *Torulaspota* spp. y una de ellas se asemeja a la especie *Candida stellata*. Por la morfología similar en todas las levaduras aisladas de los días 6 y 10, y no haber crecido en medio agar lisina, apunta a que se trata de *Saccharomyces cerevisiae*, un 60,94% del total de aislados, a excepción de T10.6, la cual dio positivo en actividades enzimáticas β -glucosidasa y proteasa pero no creció en agar lisina, siendo también su morfología en este medio diferente a la de *Saccharomyces* spp. pudiendo asemejarse a la especie *Pichia anomala*.



Figura 4: Morfología de levaduras no-*Saccharomyces* en medio agar nutriente WL



Figura 5: Morfología de levaduras no-*Saccharomyces* en medio agar nutriente WL

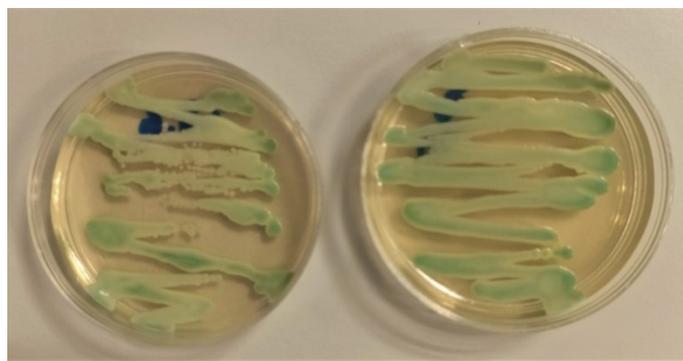


Figura 6: Morfología de levaduras *Saccharomyces* en medio agar nutriente WL

Martín de la Higuera, Sara
 UNIVERSIDAD DE VALLADOLID, CAMPUS DE PALENCIA
 Grado en Enología

Ante la incertidumbre y subjetividad de la identificación de la mayoría de los aislados mediante el medio agar nutriente WL, se enviaron muestras concretas a ser secuenciadas para comprobar la validez de estos resultados.

4.3.2. Secuenciación

Las muestras de los días 0 y 3, con más probabilidad de pertenecer al género no-*Saccharomyces* y cuatro aislados elegidos al azar de los días 6 y 10 de entre las levaduras identificadas como *Saccharomyces*, fueron enviadas al Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León para ser secuenciadas. La identificación de especies se llevó a cabo mediante biología molecular, según lo descrito en el método del apartado 3.2.4. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 6: Resultados de la identificación nivel especie por secuenciación de las muestras aisladas. Fuente: Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León.

Día	Microorg.	SECUENCIACIÓN
0	T0.1	<i>Aureobasidium pullulans</i>
0	T0.2	<i>Aureobasidium pullulans</i>
0	T0.3	<i>Aureobasidium pullulans</i>
0	T0.4	<i>Aureobasidium pullulans</i>
0	T0.5	<i>Aureobasidium pullulans</i>
0	T0.6	<i>Aureobasidium pullulans</i>
0	T0.7	<i>Aureobasidium pullulans</i>
0	T0.8	<i>Aureobasidium pullulans</i>
0	T0.9	<i>Aureobasidium pullulans</i>
3	T3.1	<i>Aureobasidium pullulans</i>
3	T3.2	<i>Aureobasidium pullulans</i>
3	T3.3	<i>Aureobasidium pullulans</i>
3	T3.4	<i>Aureobasidium pullulans</i>
3	T3.5	<i>Metschnikowia pimensis</i>
3	T3.6	<i>Metschnikowia pimensis</i>
3	T3.7	<i>Aureobasidium pullulans</i>
3	T3.8	<i>Aureobasidium pullulans</i>
3	T3.9	<i>Aureobasidium pullulans</i>
3	T3.10	<i>Aureobasidium pullulans</i>
3	T3.11	<i>Hyphopichia pseudoburtonii</i>
3	T3.12	<i>Enterobacter hormaechei</i>
3	T3.13	<i>Aureobasidium pullulans</i>
3	T3.14	<i>Aureobasidium pullulans</i>
3	T3.15	<i>Aureobasidium pullulans</i>
6	T6.7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
6	T6.15	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
10	T10.7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
10	T10.15	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Martín de la Higuera, Sara

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID, CAMPUS DE PALENCIA

Grado en Enología

Como se puede observar, los resultados, con un porcentaje de similitud de > 99%, no concuerdan con los obtenidos en la prueba mediante agar nutriente WL. Sin embargo, sí concuerdan con los datos obtenidos de crecimiento en lisina y actividades enzimáticas.

La gran mayoría de los aislados en los días 0 y 3 son *Aureobasidium pullulans*, menos T3.5 y T3.6 que pertenecen a la especie *Metschnikowia pimensis* y T3.11 que es una *Hyphopichia pseudoburtonii*. El resto de aislados identificados aleatoriamente de los días 6 y 10 pertenecen a la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

La levadura T10.6 es una levadura ovoide que no fue secuenciada y no es identificable por morfología. Los resultados no son concluyentes, por lo que sería interesante identificarla a nivel de especie para concretar.

El aislado T3.12 se tuvo que identificar a parte por no pertenecer al grupo de los hongos. Se realizó una identificación de bacterias aislando su ADN y amplificando la región de interés (fragmento del gen rpoB) para su posterior secuenciación. Se introdujeron las secuencias en la base de datos GenBank NCBI, con el programa BLAST. Como se puede ver, el resultado obtenido fue la especie de bacteria *Enterobacter hormaechei*. Se repitió la observación al microscopio y se confirmó la presencia de bacterias, pudiéndose deber el error a una contaminación posterior o una visualización incorrecta al microscopio.

4.3.3. Especies no-*Saccharomyces* aisladas

De las 63 levaduras aisladas, el 36,5% resultaron ser levaduras no-*Saccharomyces*. Se aislaron tres especies diferentes de levaduras no-*Saccharomyces*: *Aureobasidium pullulans*, *Metschnikowia pimensis* y *Hyphopichia pseudoburtonii*.

Aureobasidium pullulans

Aureobasidium pullulans fue la especie más abundante, representando el 86,9% de las especies aisladas no-*Saccharomyces* presentes en el mosto. *Aureobasidium* es uno de los géneros que más abundan en las primeras etapas de los mostos espontáneos. La presencia generalizada de *A. pullulans* se atribuye a su notable tolerancia a una amplia gama de tensiones ecológicas que incluyen ambientes ácidos, básicos, fríos e hipersalinos, así como a su flexibilidad nutricional asociada a su extenso perfil enzimático (Onetto et al., 2020).

Hay estudios que han demostrado la capacidad de esta especie para sobrevivir en el mosto mientras produce polisacáridos, polímeros de ácido málico (ácido poli β-málico) y enzimas con actividad de pectinasa, β-glucosidasa, lipasa, proteasa y tanasa (Lin et al., 2020). Se ha reportado sobre todo actividad pectinolítica para la especie al crecer en mosto, donde tiene un impacto significativo en el color, las propiedades aromáticas y la eficiencia de clarificación del vino resultante (Merín & Morata de Ambrosini, 2015; Merín & Morata de Ambrosini, 2018).

En general tiene muy poca resistencia al etanol, consumiendo cantidades mínimas de azúcar comparado con otras especies (Lin et al., 2020). Tiene variabilidad de resistencia al SO₂ dentro del género.

Se ha demostrado que esta especie puede afectar a la cinética de fermentación, ya que compite por metales como Zn y Fe, afectando las capacidades de fermentación de especies como *S. cerevisiae*, y a parte, secreta Aureobasidina A (AbA), que es un compuesto que tiene una fuerte acción fungicida frente a levaduras del género *Candida* o *Saccharomyces* (Onetto et al., 2020).

La abundancia de *A. pullulans* en mosto podría afectar al perfil aromático de los vinos, reduciendo la concentración de alcoholes superiores y aumentando la concentración de algunos ésteres etílicos agradables (Morata de Ambrosini & Merín, 2018). También se observan cambios en la concentración de ácidos volátiles, (Onetto et al., 2020; Merín & Morata de Ambrosini, 2015), por lo que se requieren más estudios sensoriales para determinar el impacto de esta especie en el perfil aromático de los vinos fermentados espontáneamente.

En resumen, *A. pullulans* parece ser prometedor para aplicar a la vinificación a baja temperatura como cultivo adjunto a *S. cerevisiae* para mejorar la calidad del vino y el proceso de vinificación.

Metschnikowia pimensis

De las levaduras aisladas no-*Saccharomyces* presentes en el mosto, dos de ellas resultaron ser de la especie *Metschnikowia pimensis*. El género *Metschnikowia* es de los más abundantes en las primeras etapas de la fermentación. Sin embargo, géneros como este, pueden llegar a aparecer al final de la fermentación con *S. cerevisiae*, si se les aplica una disminución de la temperatura (Di Maro et al., 2007).

Las levaduras del género *Metschnikowia* presentan un comportamiento oxidativo, por lo que no es de extrañar encontrarlo en cosechas de uva caracterizadas por climas húmedos y lluviosos. Estudios demuestran que especies del género *Metschnikowia* presenta actividad glucosidasa, pectinasa y glucanasa (Ganga & Martínez, 2003).

Esta levadura tuvo diferentes resultados al resto de levaduras no-*Saccharomyces* del estudio, ya que tuvo menor crecimiento en medio lisina, menor actividad β -glucosidasa por su leve coloración del medio, y menor actividad proteasa ya que el halo más claro alrededor de la colonia no estaba muy marcado.

Sin embargo, no se ha encontrado ninguna referencia bibliográfica que relacione específicamente a la especie *Metschnikowia pimensis* con la elaboración de vino (Kurtzman et al., 2011).

Hyphopichia pseudoburtonii

Aislamos una *Hyphopichia pseudoburtonii* de las especies no-*Saccharomyces* presentes en el mosto. El género *Hyphopichia* fermenta glucosa y otros azúcares (Kurtzman et al., 2011).

Hyphopichia burtonii es la especie tipo del género y fue identificada como levadura con actividades amilolíticas, lipolíticas y/o proteolíticas (Tan Gana et al., 2014). Sin embargo, se le conoce como “moho de tiza” siendo una levadura de deterioro de alimentos relacionada con productos de panadería (Hocking, 2014).

Hyphopichia pseudoburtonii es una levadura de fermentación semianaeróbica. Puede utilizar como única fuente de nitrógeno la lisina y es capaz de hidrolizar la arbutina como se ha demostrado en el estudio (NCYC 3383). Rollero et al. (2018) comprobaron que esta levadura produce una ligera cantidad de H₂S. Es una especie con la capacidad de fermentación baja y con tendencia a atascarse, tiene un consumo muy bajo de nitrógeno.

No se han encontrado muchas referencias bibliográficas que relacionen a *Hyphopichia pseudoburtonii* con la elaboración de vino.

5. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el presente estudio, en el que se ha llevado a cabo aislamiento y selección de levaduras no-*Saccharomyces* y su posterior identificación a nivel de especie mediante distintos métodos, se pueden sacar las siguientes conclusiones:

- De los dos medios de cultivo que se emplearon para el aislamiento, el medio CECT 138 se utilizó con la finalidad de facilitar el aislamiento de no-*Saccharomyces*, aunque al no adicionar antibióticos, fungistáticos, o modificar el pH, se complicó el aislamiento con el crecimiento de más bacterias y mohos que en el medio YEPD.
- El medio agar lisina y los medios de cultivo basados en propiedades enzimáticas específicas de levaduras no-*Saccharomyces* son útiles para poder diferenciar levaduras no-*Saccharomyces* de levaduras del género *Saccharomyces* después de un aislamiento.
- Las levaduras no-*Saccharomyces* se aíslan en las primeras etapas de la fermentación, encontrando *Saccharomyces cerevisiae* en etapas más avanzadas de esta, fermentación tumultuosa y final de fermentación.
- Las cepas estudiadas de levaduras no-*Saccharomyces* poseen actividades enzimáticas proteasa y β -glucosidasa, por lo que pueden resultar de interés para inoculaciones mixtas.
- El empleo del medio de cultivo WL para identificación de levaduras a nivel de especie no resultó ser adecuado. Se identificaron morfologías distintas dentro de la misma especie y no se disponía de la descripción morfológica de todas las especies de levaduras presentes en el mosto.
- La especie de levadura aislada *Aureobasidium pullulans* es una de las más presentes en las primeras etapas de la fermentación y todos los aislados de esta especie poseen las actividades enzimáticas estudiadas.

La actividad enzimática no es característica de un género o especie en particular, sino que depende de la cepa de levadura seleccionada por lo que es interesante caracterizar cada aislado para determinar su potencial como productor de enzimas. Entre las perspectivas de futuro del estudio realizado se sugiere continuar con la caracterización de *Aureobasidium pullulans*, su interacción y/o compatibilidad con otras levaduras y comprobar su potencial enológico en profundidad.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abeysinghe, S., Greer, D., & Rogiers, S. (2016). The interaction of temperature and light on yield and berry composition of *Vitis vinifera* 'Shiraz' under field conditions. *Acta Horticulturae* (1115), 119-126.
- Análisis microbiológico de vinos y mostos - Revisión de la Resolución OENO 8/95. En *OIV/OENO 206/2010*.
- Baffi, M., Martin, N., Tobal, T., Ferrarezi, A., Henrique, J., Lago, G., et al. (2013). Purification and characterization of an ethanol-tolerant β -glucosidase from *sporidiobolus pararoseus* and its potential for hydrolysis of wine aroma precursors. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171, 1681-1691.
- Belda, I., Ruiz, J., Alastruey-Izquierdo, A., Navacué, 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.
- Benito, Á. (2020). Use of non-*Saccharomyces* yeasts to improve the quality and food safety of wine.
- Benito, Á., Calderón, F., & Benito, S. (2019). The Influence of Non-*Saccharomyces* Species on Wine Fermentation Quality Parameters. *Fermentation*, 5(3), 54.
- Benito, S. (2018). The impact of *Torulasporea delbrueckii* yeast in winemaking. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 3081-3094.
- Binati, R., Lemos Junior, W., Luzzini, G., Slaghenaufi, D., Ugliano, M., & Torriani, S. (2020). Contribution of non-*Saccharomyces* yeasts to wine volatile and sensory diversity: A study on *Lachancea thermotolerans*, *Metschnikowia* spp. and *Starmerella bacillaris* strains isolated in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 318.
- Calderón, F., Benito, Á., & Benito, S. (2019). *Schizosaccharomyces pombe* and *Lachancea thermotolerans*: Joint Use as an Alternative to the Traditional Fermentations by *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni* in Oenology. In *Alcoholic Beverages*, 387-417.
- Catálogo de cepas y medios de cultivo. En *Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)*. Universidad de Valencia.
- Cavazza, A., Grando, M., & Zini, C. (1992). Rilevazione della flora microbica di mosti e vini. *Vignevini*, 9, 17-20.
- Ciani, M., Morales, P., Comitini, F., Tronchoni, J., Canonico, L., Curiel, J., et al. (2016). Non-conventional Yeast Species for Lowering Ethanol Content of Wines. *Frontiers in Microbiology*.
- Contreras, A., Hidalgo, C., Henschke, P., Chambers, P., Curtin, C., & Varela, C. (2014). Evaluation of non-*Saccharomyces* yeasts for the reduction of alcohol content in wine. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 1670-1678.
- Di Maro, E., Ercolini, D., & Coppola, S. (2007). Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the Catalanesca grape. *International Journal of Food Microbiology*, 117(2), 201-210.
- Escribano, R., González-Arenzana, L., Garijo, P., Berlanas, C., López-Alfaro, I., López, R., et al. (2017). Screening of enzymatic activities within different enological

Martín de la Higuera, Sara

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID, CAMPUS DE PALENCIA

Grado en Enología

- non-*Saccharomyces* yeasts. *Journal of Food Science and Technology* , 54, 1555-1564.
- Escribano-Viana, R. (2021). Selection of non-*Saccharomyces* yeasts for the production of quality red wines. *ICVV* .
- Fleet, G. (2008). Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Research* , 8(7), 979-995.
- Fugelsang, K., & Edwards, C. (2007). Media preparation and culture techniques. In *Wine Microbiology. Practical Applications and Procedures*. (pp. 195-196). Springer.
- Ganga, M., & Martínez, C. (2003). Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non-*Saccharomyces* yeasts. *Journal of Applied Microbiology* , 96(1), 76-83.
- Gao, P., Sam, F., Zhang, B., Peng, S., Li, M., & Wang, J. (2022). Enzymatic Characterization of Purified β -Glucosidase from Non-*Saccharomyces* Yeasts and Application on Chardonnay Aging. *Foods* , 11(6), 852.
- González-Pombo, P., Fariña, L., Carrau, F., Batista-Viera, F., & Brena, B. (2011). A novel extracellular β -glucosidase from *Issatchenkia terricola*: Isolation, immobilization and application for aroma enhancement of white Muscat wine. *Process Biochemistry* , 46(1), 385-389.
- Guo, J., Yan, Y., Wang, M., Wu, Y., Liu, S., Chen, D., et al. (2018). Effects of enzymatic hydrolysis on the chemical constituents in jujube alcoholic beverage fermented with *Torulaspora delbrueckii*. *LWT* , 97, 617-623.
- Gutiérrez Fernández, J. (2018). El papel de la selección de levaduras en la elaboración del vino. *Dialnet* .
- Hart, R., Jolly, N., & Ndimba, B. (2019). Characterisation of hybrid yeasts for the production of varietal Sauvignon blanc wine - A review. *Journal of Microbiological Methods* , 165.
- Hierro, N., González, Á., Mas, A., & Guillamón, J. (2006). Diversity and evolution of non-*Saccharomyces* yeast populations during wine fermentation: Effect of grape ripeness and cold maceration. *FEMS Yeast Research* , 6, 102-111.
- Hocking, A. (2014). FUNGI | Foodborne Fungi: Estimation by Cultural Techniques. In *Encyclopedia of Food Microbiology* (Second edition ed., pp. 68-75).
- Huang, R., Zhang, F., Yan, X., Qin, Y., Jiang, J., Liu, Y., et al. (2021). Characterization of the β -Glucosidase activity in indigenous yeast isolated from wine regions in China. *Journal of Food Science* , 86(6), 2327-2345.
- Jolly, N., Varela, C., & Pretorio, I. (2014). Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Research* , 14(2), 215-237.
- Kurtzman, C., Fell, J., & Boekhout, T. (2011). *The yeasts, a taxonomic study*. (5th ed. ed.). Elsevier Science & Technology.
- Lin, M., Boss, P., Walker, M., Sumbly, K., Grbin, P., & Jiranek, V. (2020). Evaluation of indigenous non-*Saccharomyces* yeasts isolated from a South Australian vineyard for their potential as wine starter cultures. *International Journal of Food Microbiology* , 312.
- Liu, P., Lu, L., Duan, C., & Yan, G. (2016). The contribution of indigenous non-*Saccharomyces* wine yeast to improved aromatic quality of Cabernet Sauvignon

Martín de la Higuera, Sara

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID, CAMPUS DE PALENCIA

Grado en Enología

- wines by spontaneous fermentation. *LWT - Food Science and Technology* , 71, 356-363.
- Manzanares, P., Vallés, S., & Viana, F. (2011). Chapter 4 - Non-*Saccharomyces* Yeasts in the Winemaking Process. *Molecular Wine Microbiology* , 85-110.
- Maturano, Y., Assof, M., & Fabani, M. e. (2015). Enzymatic activities produced by mixed *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* cultures: relationship with wine volatile composition. . *Antonie van Leeuwenhoek* , 108, 1239-1256.
- Medina, K., Boido, E., Dellacassa, E., & Carrau, F. (2012). Growth of non-*Saccharomyces* yeasts affects nutrient availability for *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology* , 157(2), 245-250.
- Mendes Ferreira, A., Clímaco, M., & Mendes Faia, A. (2011). The role of non-*Saccharomyces* species in releasing glycosidic bound fraction of grape aroma components — a preliminary study. . *Journal of Applied Microbiology* , 91(1), 67-71.
- Merín, M., & Morata de Ambrosini, V. (2015). Highly cold-active pectinases under wine-like conditions from non-*Saccharomyces* yeasts for enzymatic production during winemaking. . *Letters in Applied Microbiology* , 60(5), 467-474.
- Miranda-Castilleja, D., Ortiz-Barrera, E., Arvizu-Medrano, S., Ramiro-Pacheco, J., Aldrete-Tapia, J., & Martínez-Peniche, R. (2015). Isolation, selection and identification of native *Saccharomyces* spp. yeasts from vineyards in Querétaro, México. *Agrociencia* , 49(7), 759-773.
- Molecular tools for identification of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast and another yeast species related to winemaking. In *Resolution OIV/OENO 408/2011*.
- Morata de Ambrosini, V., & Merín, M. (2018). Kinetic and metabolic behaviour of the pectinolytic strain *Aureobasidium pullulans* GM-R-22 during pre-fermentative cold maceration and its effect on red wine quality. *International Journal of Food Microbiology* , 285, 18-26.
- National Collection of Yeast Cultures (NCYC) 3383 *Hyphopichia pseudoburtonii*.
- Onetto, C., Borneman, A., & Schmidt, S. (2020). Investigating the effects of *Aureobasidium pullulans* on grape juice composition and fermentation. *Food Microbiology* , 90.
- Padilla, B., Gil, J., & 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, Art. 411.
- Pallman, C., Brown, J., Olineka, T., Cocolin, L., Mills, D., & Bisson, L. (2001). Use of WL medium to profile native flora fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture* , 52(3), 198-203.
- Palmeri, R., & Spagna, G. (2007). β -Glucosidase in cellular and acellular form for winemaking application. *Enzyme and Microbial Technology* , 40(3), 382-389.
- Röcker, J., Strub, S., Ebert, K., & Grossmann, M. (2016). Usage of different aerobic non-*Saccharomyces* yeasts and experimental conditions as a tool for reducing the potential ethanol content in wines. *European Food Research and Technology* , 242, 2051-2070.

Martín de la Higuera, Sara

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID, CAMPUS DE PALENCIA

Grado en Enología

- Rollero, S., Bloem, A., Ortiz-Julien, A., Camarasa, C., & Divol, B. (2018). Fermentation performances and aroma production of non-conventional wine yeasts are influenced by nitrogen preferences. *FEMS Yeast Research* , 18.
- Strauss, M., Jolly, N., Lambrechts, M., & Van Rensburg, P. (2001). Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology* , 91(1), 182-190.
- Styger, G., Prior, B., & Bauer, F. (2011). Wine flavor and aroma. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* , 38(9), 1145.
- Suranská, H., Vránová, D., & Omelková, J. (2016). Isolation, identification and characterization of regional indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Brazilian Journal of Microbiology* , 47(1), 181-190.
- Tan Gana, N., Mendoza, B., & Monsalud, R. (2014). Isolation, screening and characterization of yeasts with amyolytic, lipolytic, and proteolytic activities from the surface of Philippine bananas (*Musa* spp.). *Philippine Journal of Science* , 143(1), 81-87.
- Tolosa, J., & Prieto, S. (2019). Non-*Saccharomyces* yeasts: An enzymatic unexplored world to be exploited. In *Enzymes in Food Biotechnology. Production, Applications, and Future Prospects* (pp. 433-450).
- Toy, J., Lu, Y., Huang, D., Matsumura, K., & Liu, S. (2022). Enzymatic treatment, unfermented and fermented fruit-based products: current state of knowledge. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* , 62(7), 1890-1911.
- Zhang, P., Zhang, R., Sirisena, S., Gan, R., & Fang, Z. (2021). Beta-glucosidase activity of wine yeasts and its impacts on wine volatiles and phenolics: A mini-review. *Food Microbiology* , 100.
- Zhuang, H., & Feng, T. (2022). Isolation, identification, and application of yeast strains from the local ecosystem of Summer Black vineyard. *Journal of Food Processing and Preservation* , 46(3).

ANEXOS

ANEXO 1. Aislados en medio YEPD y CECT 138 de día 0, 3, 6 y 10.

Tabla 7: Total de aislados en medio YEPD y CECT 138 de los días 0, 3, 6 y 10 y su nomenclatura

T = 0			
AISLADOS	MEDIO CULTIVO	MICROORGANISMO	NOMENCLATURA
1	YPD	LEVADURA	T0.1
2	YPD	LEVADURA	T0.2
3	YPD	BACTERIA	-
4	YPD	BACTERIA	-
5	YPD	LEVADURA	T0.3
6	YPD	LEVADURA	T0.4
7	YPD	LEVADURA	T0.5
8	YPD	LEVADURA	T0.6
9	YPD	LEVADURA	T0.7
10	YPD	LEVADURA	T0.8
11	YPD	BACTERIA	-
12	YPD	LEVADURA	T0.9

T = 3			
AISLADOS	MEDIO CULTIVO	MICROORGANISMO	NOMENCLATURA
1	YPD	LEVADURA	T3.1
2	YPD	-	-
3	YPD	LEVADURA	T3.2
4	YPD	LEVADURA	T3.3
5	YPD	LEVADURA	T3.4
6	YPD	LEVADURA	T3.5
7	YPD	LEVADURA	T3.6
8	YPD	LEVADURA	T3.7
9	YPD	LEVADURA	T3.8
10	YPD	LEVADURA	T3.9
11	YPD	LEVADURA	T3.10
12	YPD	LEVADURA	T3.11
1	LM	BACTERIA	-
2	LM	LEVADURA	T3.12
3	LM	-	-
4	LM	LEVADURA	T3.13
5	LM	BACTERIA	-
6	LM	BACTERIA	-
7	LM	BACTERIA	-

Martín de la Higuera, Sara

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID, CAMPUS DE PALENCIA

Grado en Enología

Continuación Tabla 7: Total de aislados en medio YEPD y CECT 138 de los días 0, 3, 6 y 10 y su nomenclatura

T = 3			
AISLADOS	MEDIO CULTIVO	MICROORGANISMO	NOMENCLATURA
8	LM	-	-
9	LM	-	-
10	LM	BACTERIA	-
11	LM	LEVADURA	T3.14
12	LM	LEVADURA	T3.15

T = 6			
AISLADOS	MEDIO CULTIVO	MICROORGANISMO	NOMENCLATURA
1	YPD	LEVADURA	T6.1
2	YPD	LEVADURA	T6.2
3	YPD	LEVADURA	T6.3
4	YPD	LEVADURA	T6.4
5	YPD	LEVADURA	T6.5
6	YPD	LEVADURA	T6.6
7	YPD	LEVADURA	T6.7
8	YPD	LEVADURA	T6.8
9	YPD	LEVADURA	T6.9
10	YPD	LEVADURA	T6.10
11	YPD	LEVADURA	T6.11
12	YPD	LEVADURA	T6.12
1	LM	BACTERIA	-
2	LM	LEVADURA	T6.13
3	LM	BACTERIA	-
4	LM	BACTERIA	-
5	LM	BACTERIA	-
6	LM	BACTERIA	-
7	LM	LEVADURA	T6.14
8	LM	BACTERIA	-
9	LM	LEVADURA	T6.15
10	LM	BACTERIA	-
11	LM	LEVADURA	T6.16
12	LM	BACTERIA	-

Continuación Tabla 7: Total de aislados en medio YEPD y CECT 138 de los días 0, 3, 6 y 10 y su nomenclatura

T = 10			
AISLADOS	MEDIO CULTIVO	MICROORGANISMO	NOMENCLATURA
1	YPD	LEVADURA	T10.1
2	YPD	LEVADURA	T10.2
3	YPD	LEVADURA	T10.3
4	YPD	LEVADURA	T10.4
5	YPD	LEVADURA	T10.5
6	YPD	LEVADURA	T10.6
7	YPD	LEVADURA	T10.7
8	YPD	LEVADURA	T10.8
9	YPD	LEVADURA	T10.9
10	YPD	LEVADURA	T10.10
11	YPD	LEVADURA	T10.11
12	YPD	LEVADURA	T10.12
1	LM	LEVADURA	T10.13
2	LM	LEVADURA	T10.14
3	LM	LEVADURA	T10.15
4	LM	LEVADURA	T10.16
5	LM	LEVADURA	T10.17
6	LM	LEVADURA	T10.18
7	LM	LEVADURA	T10.19
8	LM	LEVADURA	T10.20
9	LM	LEVADURA	T10.21
10	LM	LEVADURA	T10.22
11	LM	LEVADURA	T10.23
12	LM	LEVADURA	T10.24

Martín de la Higuera, Sara

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID, CAMPUS DE PALENCIA

Grado en Enología