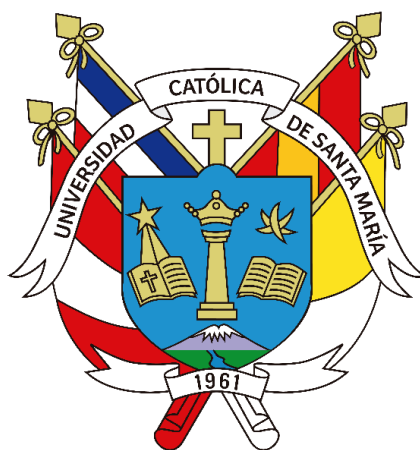


Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



“Cepas de Levaduras Nativas aisladas e identificadas del mosto de uva Negra Criolla (*Vitis Vinífera L. var. Listan Prieto*) relacionadas al proceso fermentativo en escala de laboratorio para vinificación”

Tesis presentada por la Bachiller:

Calizaya Covinos de la Gala, Diana Cecilia

ORCID: 0009-0001-9569-6746

para optar el Título Profesional de:

Ingeniero Biotecnólogo

Asesora:

M.Sc. Bardales Alvarez, Roxana Margarita

ORCID: 0000-0002-5137-4067

Arequipa - Perú

2024

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
INGENIERIA BIOTECNOLOGICA
TITULACIÓN CON TESIS
DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 30 de Enero del 2024

Dictamen: 011483-C-EPIB-2024

Visto el borrador del expediente 011483, presentado por:

2012241282 - CALIZAYA COVINOS DE LA GALA DIANA CECILIA

Titulado:

**CEPAS DE LEVADURAS NATIVAS AISLADAS E IDENTIFICADAS DEL MOSTO DE UVA NEGRA
CRIOLLA (VITIS VINÍFERA L. VAR. LISTAN PRIETO) RELACIONADAS AL PROCESO
FERMENTATIVO EN ESCALA DE LABORATORIO PARA VINIFICACIÓN**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

**29263856 - SALINAS SANCHEZ ARMANDO ANTONIO
DICTAMINADOR**



**29728642 - VALDIVIA CARPIO WILLY ANIBAL
DICTAMINADOR**



**45498291 - ALVARADO QUIROZ KENY DAVI
DICTAMINADOR**



Cepas de levaduras nativas aisladas e identificadas del mosto de uva negra criolla (VITIS VINÍFERA L. VAR. LISTAN PRIETO) relacionadas al proceso fermentativo en escala de laboratorio para vinificació

ORIGINALITY REPORT

19%

SIMILARITY INDEX

18%

INTERNET SOURCES

5%

PUBLICATIONS

8%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	redi.unjbg.edu.pe Internet Source	3%
2	kupdf.net Internet Source	2%
3	es.slideshare.net Internet Source	2%
4	www.tdx.cat Internet Source	2%
5	tesis.ipn.mx Internet Source	1%
6	eprints.ucm.es Internet Source	1%
7	repositorio.unas.edu.pe Internet Source	1%
8	www.journaluidegye.com Internet Source	1%



A mi Familia

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar gracias a Dios, por darme la fortaleza día a día para iniciar y culminar este trabajo de investigación.

Asimismo, quiero agradecer a todos los docentes que me aportaron con sus ideas. En especial a mi asesora M.Sc. Roxana Bardales y mi co-asesor Blgo. Mblgo. Edwin Obando, por guiarme y certificar mi trabajo de investigación.

Por último, quiero dar gracias a todos, a mi familia, papá, mamá, hermano, hermanas y amigas, que me dieron sus palabras de motivación y decirme que ¡sí lo lograría! A todos ellos gracias por su comprensión.



ÍNDICE

Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Índice de Figuras.....	vii
Índice de Tablas.....	ix
Resumen.....	xiii
Abstract.....	xv
 INTRODUCCIÓN.....	 17
 CAPÍTULO I	
OBJETIVO GENERAL.....	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
HIPÓTESIS.....	20
VARIABLES E INDICADORES.....	20
 CAPÍTULO II	
MARCO TEÓRICO.....	21
1. Las levaduras.....	22
1.1 Características generales.....	22
1.2 Clasificación de las levaduras.....	23
1.3 Especies de mayor relevancia enológica.....	24
1.4 Fermentación alcohólica.....	25
1.4.1 Bioquímica de la fermentación alcohólica.....	25
1.4.2 Dinámica de las poblaciones de levaduras en fermentaciones.....	28
espontáneas	
1.5 Vinificación con levaduras nativas seleccionadas.....	29
1.6 Ventajas de la utilización de levaduras nativas seleccionadas.....	30
1.7 Criterios de selección de levaduras nativas.....	32
1.7.1 Poder fermentativo.....	32
1.7.1.1 Descripción del método.....	34
1.7.2 Cinética fermentativa.....	34

1.7.3 Resistencia al estrés fermentativo en presencia de etanol.....	35
1.7.4 Efecto de la temperatura.....	36
CAPÍTULO III	
MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
1. Material Biológico.....	37
2. Reactivos Químicos.....	37
3. Material de Vidrio.....	37
4. Instrumentos y Equipos.....	38
METODOLOGÍA.....	39
1. Aislamiento de Levaduras.....	39
2. Identificación de Levaduras.....	41
3. Identificación de Especie de Levadura.....	44
4. Ensayo de Cinética y Poder Fermentativo con Levaduras Nativas.....	47
5. Ensayo de Vinificación a Escala de Laboratorio.....	50
CAPÍTULO IV	
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	51
1. Aislamiento de Levaduras.....	51
2. Identificación de Levaduras.....	53
3. Identificación de Especie de Levadura.....	54
4. Ensayo de Cinética y Poder Fermentativo con Levaduras Nativas.....	58
5. Ensayo de Vinificación a Escala de Laboratorio.....	71
CONCLUSIONES.....	78
RECOMENDACIONES.....	80
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
ANEXOS.....	86

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema de fermentación alcohólica y gliceropirúvica.
- Figura 2.** Matraz con válvula Müller para la determinación del poder fermentativo por gravimetría.
- Figura 3.** Procedimiento de diluciones seriadas.
- Figura 4.** Coloración simple de azul de metileno 40x (Forma: Ovalada).
- Figura 5.** Coloración de tinta china 40x (Capsula alrededor de ellas).
- Figura 6.** Presencia del tubo germinal 40x.
- Figura 7.** Prueba de la degradación de la urea (Formación de anillo púrpura).
- Figura 8.** Tres baterías con tubos de ensayo de ocho azúcares.
- Figura 9.** Activación de las levaduras nativas y la levadura comercial.
- Figura 10.** Diluciones en placas Petri.
- Figura 11.** Viales.
- Figura 12.** Identificación de género y especie de la levadura nativa *Kloeckera* E₁10⁻³.
- Figura 13.** Identificación de género y especie de la levadura nativa *Kloeckera* E₁10⁻².

Figura 14. Identificación de género y especie de la levadura nativa *Saccharomyces cerevisiae* E₂10⁻².

Figura 15. Primer ensayo (25/03/2023) de Cinética fermentativa de las cepas nativas *Kloeckera* y *Saccharomyces cerevisiae* versus cepa comercial *Saccharomyces bayanus*.

Figura 16. Segundo ensayo (14/04/2023) de Cinética fermentativa de las cepas nativas *Kloeckera* y *Saccharomyces cerevisiae* versus cepa comercial *Saccharomyces bayanus*.

Figura 17. Recolección de la muestra.

Figura 18. Triturado de la muestra (estrujado).

Figura 19. Preparación de material (diluyentes).

Figura 20. Siembra por diseminación de las placas 10⁻², 10⁻³ y 10⁻⁴.

Figura 21. Traspase de las levaduras nativas a viales con medio PDA inclinado.

Figura 22. Pruebas morfológicas a las levaduras nativas.

Figura 23. Observación de levaduras nativas bajo microscopio 40x con coloración simple de azul de metileno y tinta china.

Figura 24. Observación del tubo germinal 40x de las levaduras nativas.

Figura 25. Fermentación de azúcares.

Figura 26. Activación de cepas nativas y cepa comercial.

Figura 27. Procedimiento de desinfección de los racimos de uva para posteriormente usarlos en el sistema de microvinificadores.

Figura 28. Llenado del sistema de microvinificadores y control gravimétrico durante 13 días.



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Variables e Indicadores.

Tabla 2. Clasificación de los géneros de levaduras más frecuentes en mostos y vinos.

Tabla 3. Aislamiento de cepas de levaduras nativas.

Tabla 4. Pruebas morfológicas bajo microscopio.

Tabla 5. Resultados de la prueba de fermentación de azúcares.

Tabla 6. Resultados de la composición de la galería API 20 C AUX.

Tabla 7. Nombre de las cepas nativas identificadas según el sistema API 20 C AUX.

Tabla 8. Datos de Cinética Fermentativa de la Figura 15.

Tabla 9. Valores de Poder Fermentativo de la Figura 15.

Tabla 10. Datos de Cinética Fermentativa de la Figura 16.

Tabla 11. Valores de Poder Fermentativo de la Figura 16.

Tabla 12. Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la cepa nativa *Kloeckera* vs *Saccharomyces bayanus comercial*.

Tabla 13. Resumen de contrastes de hipótesis para la cepa nativa *Kloeckera* vs *Saccharomyces bayanus comercial*.

Tabla 14. Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la cepa nativa *Saccharomyces cerevisiae* vs *Saccharomyces bayanus comercial*.

Tabla 15. Resumen de contrastes de hipótesis para la cepa nativa *Saccharomyces cerevisiae* vs *Saccharomyces bayanus comercial*.

Tabla 16. Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la cepa nativa *Kloeckera* vs *Saccharomyces bayanus comercial*.

Tabla 17. Resumen de contrastes de hipótesis para la cepa nativa *Kloeckera* vs *Saccharomyces bayanus comercial*.

Tabla 18. Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la cepa nativa *Saccharomyces cerevisiae* vs *Saccharomyces bayanus comercial*.

Tabla 19. Resumen de contrastes de hipótesis para la cepa nativa *Saccharomyces cerevisiae* vs *Saccharomyces bayanus comercial*.

Tabla 20. Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la cepa nativa *Kloeckera* vs *Saccharomyces bayanus comercial*.

Tabla 21. Resumen de contrastes de hipótesis para la cepa nativa *Kloeckera* vs *Saccharomyces bayanus comercial*.

Tabla 22. Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la cepa nativa *Kloeckera* vs *Saccharomyces bayanus comercial*.

Tabla 23. Resumen de contrastes de hipótesis para la cepa nativa *Kloeckera* vs *Saccharomyces bayanus comercial*.

Tabla 24. Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la cepa nativa *Kloeckera* vs *Saccharomyces bayanus comercial*.

Tabla 25. Resumen de contrastes de hipótesis para la cepa nativa *Kloeckera* vs *Saccharomyces bayanus comercial*.

Tabla 26. Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la cepa nativa *Saccharomyces cerevisiae* vs *Saccharomyces bayanus comercial*.

Tabla 27. Resumen de contrastes de hipótesis para la cepa nativa *Saccharomyces cerevisiae* vs *Saccharomyces bayanus comercial*.

Tabla 28. Tabla promedio del Parámetro de Temperatura.

Tabla 29. Tabla promedio del Parámetro de pH.

Tabla 30. Tabla promedio del Parámetro de Grado Alcohólico.

Tabla 31. Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la cepa nativa *Kloeckera* vs *Saccharomyces bayanus comercial*.

Tabla 32. Resumen de contrastes de hipótesis para la cepa nativa *Kloeckera* vs *Saccharomyces bayanus comercial*.

Tabla 33. Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la cepa nativa *Saccharomyces cerevisiae* vs *Saccharomyces bayanus comercial*.

Tabla 34. Resumen de contrastes de hipótesis para la cepa nativa *Saccharomyces cerevisiae* vs *Saccharomyces bayanus comercial*.

Tabla 35. Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la cepa nativa *Kloeckera* vs *Saccharomyces bayanus comercial*.

Tabla 36. Resumen de contrastes de hipótesis para la cepa nativa *Kloeckera* vs *Saccharomyces bayanus comercial*.

Tabla 37. Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la cepa nativa *Saccharomyces cerevisiae* vs *Saccharomyces bayanus comercial*.

Tabla 38. Resumen de contrastes de hipótesis para la cepa nativa *Saccharomyces cerevisiae* vs *Saccharomyces bayanus comercial*.

Tabla 39. Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la cepa nativa *Kloeckera* vs *Saccharomyces bayanus comercial*.

Tabla 40. Resumen de contrastes de hipótesis para la cepa nativa *Kloeckera* vs *Saccharomyces bayanus comercial*.

Tabla 41. Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la cepa nativa *Saccharomyces cerevisiae* vs *Saccharomyces bayanus comercial*.

Tabla 42. Resumen de contrastes de hipótesis para la cepa nativa *Saccharomyces cerevisiae* vs *Saccharomyces bayanus comercial*.

Tabla 43. Urea Broth Base (Base de caldo de urea).

Tabla 44. Phenol red agar media (Medio de agar rojo fenol).

Tabla 45. Phenol red broth media (Medio de caldo rojo fenol).

RESUMEN

En el presente trabajo, se estudió cepas de levaduras nativas relacionadas al proceso de vinificación, para evaluar sus características bioquímicas y cinética y poder fermentativo durante el proceso de vinificación mediante un sistema de microvinificadores y un proceso de vinificación a escala de laboratorio.

Las cepas nativas fueron aisladas a partir de mosto de uva, obtenidas desde aproximadamente 3 kilos de uva provenientes de dos chacras, Sobraya y Piedra Blanca-Tacna.

Las cepas nativas fueron aisladas por diluciones seriadas por siembra en diseminación, y luego fueron identificadas con pruebas bajo microscopio y pruebas bioquímicas hasta determinar su nomenclatura de especie.

Se logró aislar 2 cepas nativas en total, denominadas *Kloeckera spp.* y *Saccharomyces cerevisiae*.

Luego del aislamiento y la identificación se realizó el ensayo de cinética fermentativa y poder fermentativo versus una levadura comercial *Saccharomyces bayanus*.

Se reportó los resultados de dos ensayos de cinética fermentativa y poder fermentativo, considerando a la Figura 15 y 16 realizados en distintas fechas. En el primer reporte, la cepa nativa *Kloeckera* presenta igual cinética y es tan eficaz como la cepa comercial. Respecto a la cepa nativa *Saccharomyces cerevisiae*, ésta difiere de la cepa comercial no superando su cinética.

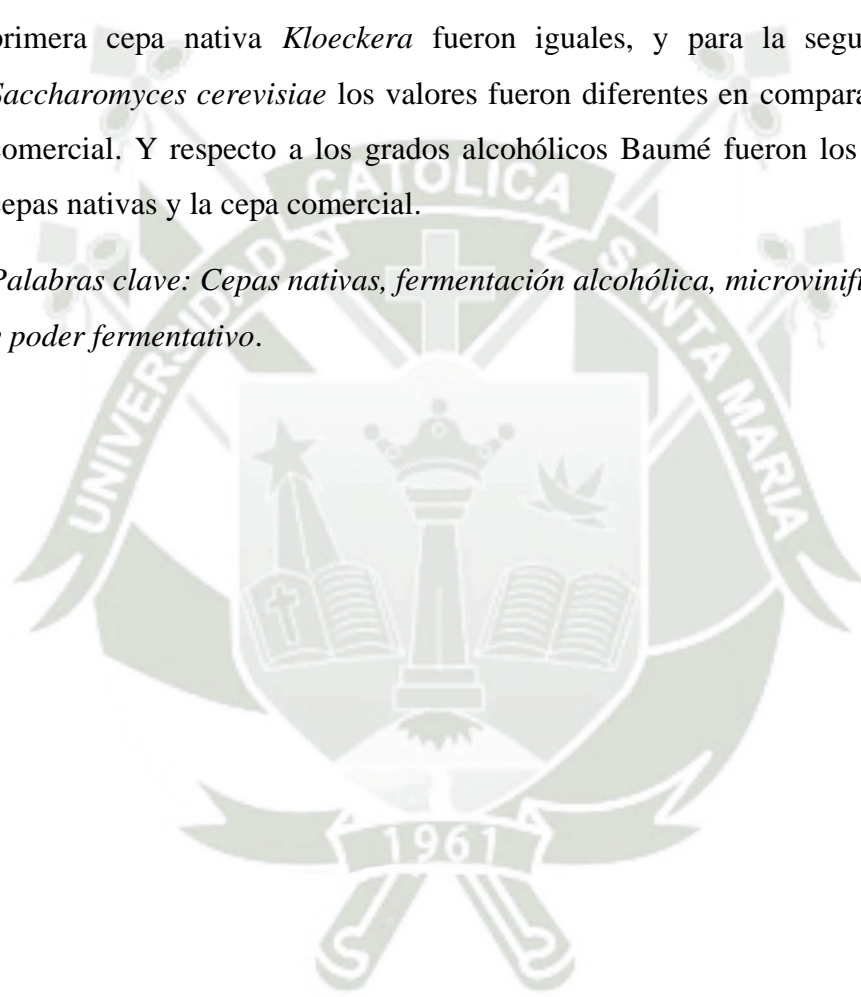
En el segundo reporte, la cepa nativa *Kloeckera* no supera su cinética en comparación con la cepa comercial. Y la cepa *Saccharomyces cerevisiae* presenta igual cinética y es tan eficaz como la cepa comercial.

En cuanto a los resultados del poder fermentativo obtenido mediante fórmula, en el primer reporte, la cepa nativa *Kloeckera* presenta diferente poder fermentativo que la cepa comercial. Asimismo, la cepa nativa *Saccharomyces cerevisiae* presenta diferente poder fermentativo que la cepa comercial.

En el segundo reporte, la cepa nativa *Kloeckera* presenta diferente poder fermentativo que la cepa comercial. Y la cepa nativa *Saccharomyces cerevisiae* presenta diferente poder fermentativo que la cepa comercial.

En el ensayo de vinificación a escala de laboratorio, se evaluó tres parámetros. La temperatura se consideró como la misma para las cepas nativas (*Kloeckera* y *Saccharomyces cerevisiae*) y la cepa comercial. Respecto al pH, los valores para la primera cepa nativa *Kloeckera* fueron iguales, y para la segunda cepa nativa *Saccharomyces cerevisiae* los valores fueron diferentes en comparación con la cepa comercial. Y respecto a los grados alcohólicos Baumé fueron los mismos para las cepas nativas y la cepa comercial.

Palabras clave: Cepas nativas, fermentación alcohólica, microvinificadores, cinética y poder fermentativo.



ABSTRACT

In this work, native yeast strains related to the winemaking process were studied to evaluate their biochemical characteristics and kinetics and fermentative power during the winemaking process using a microvinification system and a laboratory-scale winemaking process.

The native strains were isolated from grape must, obtained from approximately 3 kilos of grapes from two farms, Sobraya and Piedra Blanca-Tacna.

The native strains were isolated by serial dilutions by sowing in dissemination, and then they were identified with tests under a microscope and biochemical tests until their species nomenclature was determined.

Two native strains were isolated in total, called *Kloeckera spp* and *Saccharomyces cerevisiae*.

After isolation and identification, the fermentative kinetics and fermentative power test was carried out against a commercial yeast *Saccharomyces bayanus*.

The results of two fermentation kinetics and fermentation power tests were reported, considering Figure 15 and 16, carried out on different dates. In the first report, the native strain *Kloeckera* presents the same kinetics and is as effective as the commercial strain. Regarding the native strain *Saccharomyces cerevisiae*, it differs from the commercial strain by not surpassing its kinetics.

In the second report, the native strain *Kloeckera* does not surpass its kinetics compared to the commercial strain. And the strain *Saccharomyces cerevisiae* presents the same kinetics and is as effective as the commercial strain.

Regarding the results of the fermentation power obtained by formula, in the first report, the native strain *Kloeckera* presents a different fermentation power than the commercial strain. Likewise, the native strain *Saccharomyces cerevisiae* presents a different fermentation power than the commercial strain.

In the second report, the native strain *Kloeckera* presents a different fermentation power than the commercial strain. And the native strain *Saccharomyces cerevisiae* presents different fermentative power than the commercial strain.

In the laboratory scale winemaking test, three parameters were evaluated. The temperature was considered the same for the native strains (*Kloeckera* and *Saccharomyces cerevisiae*) and the commercial strain. Regarding the pH, the values for the first native strain *Kloeckera* were the same, and for the second native strain *Saccharomyces cerevisiae* the values were different compared to the commercial strain. And regarding the Baumé alcohol degrees, they were the same for the native strains and the commercial strain.

Keywords: Native strains, alcoholic fermentation, microvinifiers, kinetics and fermentative power.



INTRODUCCIÓN

El vino es el producto resultante de una compleja interacción biológica y bioquímica entre las uvas y diferentes microorganismos.

La industria vitivinícola en el Perú es la responsable de desarrollar la transformación de la uva en vinos, mediante procesos, de forma tecnificada y artesanal. Existen 204 hectáreas de cultivo de uva en la región de Tacna para la producción de vino, siendo el distrito de Calana en la provincia de Tacna, la que cultiva más de 110 hectáreas de la totalidad, seguida por Pocollay y Tacna.

El proceso del vino se inicia en el viñedo, continúa con la fermentación y crianza y concluye cuando el consumidor degusta el producto. Todas estas etapas son influenciadas por diferentes prácticas vitivinícolas y enológicas que ejecutan a cabo los viticultores y enólogos.

De los microorganismos involucrados en este complejo proceso, las levaduras son las que juegan el papel más preponderante cuando se desarrolla la fermentación alcohólica¹.

En fermentaciones espontáneas, hay un patrón de crecimiento progresivo de levaduras nativas, con las etapas finales invariablemente dominadas por las cepas tolerantes al alcohol, entre ellas *Saccharomyces cerevisiae*.

Esta especie se conoce universalmente como la levadura del vino y es ampliamente preferida para iniciar las fermentaciones del vino. El papel principal de esta levadura es catalizar rápido, la conversión completa y eficiente de azúcares de uva en etanol, dióxido de carbono y otros metabolitos menores, pero importantes, sin el desarrollo de sabores extraños.

Sin embargo, debido a la naturaleza exigente de las prácticas modernas de elaboración del vino y los sofisticados mercados del vino, existe una búsqueda cada vez mayor de cepas de levaduras de vino especializadas que posean una amplia gama de propiedades enológicas optimizadas, mejoradas o novedosas.

Con el uso de herramientas biotecnológicas, se puede generar una mayor oferta de producción vitivinícola, lo que representa un efecto positivo para el crecimiento del

sector agropecuario de la región de Tacna, lo que se configura preponderante para el desarrollo económico de la agroindustria.



CAPÍTULO I

OBJETIVO GENERAL

Determinar si se puede aislar e identificar cepas de levaduras nativas del mosto de uva negra criolla (*Vitis vinífera L. var. Listan Prieto*) con capacidad de ser utilizadas como cultivo iniciador en el proceso fermentativo en escala de laboratorio para vinificación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar el procedimiento de aislamiento de cepas de levaduras nativas presentes en el mosto de uva negra criolla (*Listan Prieto*) de importancia fermentativa y analizar las características bioquímicas de las levaduras nativas presentes en el proceso de vinificación para identificarlas.
2. Comparar la cinética fermentativa de las levaduras nativas (pérdida de CO₂) versus la cepa comercial.
3. Comparar el poder fermentativo de las levaduras nativas (% alcohólico) versus la cepa comercial.
4. Comparar los valores de temperatura de las cepas nativas versus la cepa comercial en el ensayo de vinificación.
5. Comparar los valores de pH de las cepas nativas versus la cepa comercial en el ensayo de vinificación.
6. Comparar los valores del grado alcohólico Baumé de las cepas nativas versus la cepa comercial en el ensayo de vinificación.

HIPÓTESIS

Se plantea que se puede aislar e identificar cepas nativas del mosto de uva negra criolla con capacidad de ser utilizadas como cultivo iniciador en el proceso de vinificación; con óptima velocidad de metabolización de azúcares (cinética fermentativa), presentar alta tolerancia al etanol (poder fermentativo), y pH y grado alcohólico en condiciones iguales de temperatura para ser elegida comparándola con una levadura comercial.

VARIABLES E INDICADORES

Tabla 1. Variables e Indicadores.

Variable Independiente	Indicador
Levadura Nativa	Identificación mediante pruebas bioquímicas: Fermentación de azúcares y sistema API 20 C AUX
Variable Dependiente	Indicador
Cinética Fermentativa	Disminución en gr. de CO ₂
Alta tolerancia al etanol (Poder Fermentativo)	% alcohol producido mediante fórmula
Parámetro de temperatura	Variación de °C
Parámetro de pH	Acidez o Alcalinidad
Parámetro de grado alcohólico Baumé	Densidad

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Muchos estudios se han realizado sobre las levaduras vínicas desde que Pasteur (1866) demostrara que éstas eran las responsables de la transformación de los azúcares del mosto en etanol, algo propio de las fermentaciones vínicas².

El vino es producto de complejas interacciones entre hongos, levaduras y bacterias que se inician en el viñedo y continúan durante todo el proceso de fermentación hasta su envasado.

La conversión del mosto de uva en vino es un proceso bioquímico complejo que implica interacciones entre levaduras, bacterias y otras especies microbianas. De estos microorganismos, las levaduras son las principales responsables de la fermentación alcohólica^{3,4,5}.

La fermentación alcohólica es una de las principales fases que tienen lugar en este proceso y consiste en la transformación de la glucosa y fructuosa presentes en el mosto en etanol y CO₂ mayoritariamente, junto con la aparición de otros subproductos muy importantes para la calidad del vino, como son los ésteres y los alcoholes superiores.

Esta conversión es llevada a cabo generalmente por cepas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, aunque en fermentaciones espontáneas pueden crecer durante las primeras fases levaduras de otros géneros como *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Debaromyces*, *Hansenula* y *Candida*, procedentes de la uva o de los tanques de fermentación. Incluso en estos procesos naturales las especies de *Saccharomyces* acaban sustituyendo al resto en el caldo de cultivo y son las que completan la fermentación.

Frente a estas fermentaciones espontáneas el uso de inóculos de cepas secas comerciales es hoy en día un procedimiento frecuente en bodega dado que la cepa utilizada como iniciadora tiende a imponerse sobre las nativas presentes en la uva y en los tanques de fermentación.

Sin embargo, las opiniones acerca de su uso se ven ampliamente divididas, ya que la biodiversidad de cepas nativas existente en las uvas no se ve reflejada en la

disponibilidad de levaduras comerciales, lo que con lleva a una pérdida de identidad y a la unificación de los caracteres de los vinos.

Una alternativa a esta problemática es el uso de cultivos iniciadores de levaduras que procedan de la zona vitivinícola donde se van a utilizar. En el presente estudio se utilizan las cepas nativas de la uva negra criolla obtenidas del distrito de Pocollay y Calana de la región Tacna.

Aunque durante las primeras fases las cepas naturales pueden tener importantes efectos en el aroma⁶, la cepa inoculada obtenida de la región sería responsable de la fermentación, y constituiría la mayor parte de la población de levaduras al final del proceso⁷.

Esta estrategia de inoculación de cultivos iniciadores de levaduras nativas proporciona ventajas tales como un acortamiento de la fase de latencia, una reducción significativa de la influencia de levaduras, una fermentación rápida y completa del mosto y la posibilidad de reproducir las características y la calidad del vino⁸.

1. Las levaduras

1.1 Características generales

Son hongos unicelulares pertenecientes en su mayor parte al grupo de los Ascomicetos, es decir, al grupo de hongos capaces de formar esporas contenidas en el interior de un asca.

Se hallan diseminadas por toda la naturaleza. Llegan a la uva por el viento y los insectos siendo retenidas en la pruina, una sustancia cerosa que recubre la piel de la uva. De ahí pasan al mosto cuando se rompe el grano de uva en las operaciones enológicas de estrujado y prensado^{9,10}.

Vistas al microscopio las distintas especies presentan formas muy variadas. Las hay elípticas (con forma de huevo) como las especies del género *Saccharomyces*, esféricas como *Torula*, alargadas como *Torulopsis stellata*, y apiculadas (con forma de limón) como *Hanseniaspora*.

Su morfología es uno de los caracteres utilizados en su clasificación, como también lo son entre otros su forma de reproducción y sus características bioquímicas¹¹.

Su reproducción puede ser vegetativa (asexual) por gemación generalmente o por escisión. Cuando las condiciones son adversas la mayor parte de las levaduras pueden reproducirse sexualmente generando ascosporas.

Entre las diversas características bioquímicas utilizadas en la clasificación de las levaduras de vinificación podemos citar¹².

- (a) El tipo de azúcares que pueden fermentar.
- (b) El rendimiento en alcohol, las hay que para producir 1 grado de alcohol consumen de 17 a 18 g de azúcar, otras en cambio con menor rendimiento metabolizan de 21 a 22 g.
- (c) Su poder alcohológeno, grado máximo de alcohol que pueden alcanzar, algunas detienen su actividad a los 5% Vol mientras que otras llegan a 17 o 18% Vol.
- (d) Productos secundarios de la fermentación.
- (e) Resistencia al anhídrido sulfuroso.
- (f) Capacidad para asimilar diferentes sustancias nitrogenadas.

1.2 Clasificación de las levaduras

Tabla 2. Clasificación de los géneros de levaduras más frecuentes en mostos y vinos.

I) Levaduras esporógenas	
subdivisión:	ASCOMYCOTINA
clase:	HEMIASCOMYCETES
orden:	ENDOMYCETALES
familia:	SACCHAROMYCETACEAE
subfamilias:	SCHIZOSSACCHAROMYCETOIDAE NADSONIOIDEAE SACCHAROMYCETOIDEAE
géneros:	Schizosaccharomyces Hanseniaspora Dekkera Saccharomyces Hansenula Kluyveromyces Torulaspora Zygosaccharomyces
II) Levaduras no esporógenas	
subdivisión:	DEUTEROMYCOTINA
clase:	BLASTOMYCETES
familia:	CRIPTOCOCCACEAE
géneros:	Brettanomyces Candida Kloeckera

Las levaduras pertenecen al Reino Fungi y dentro de él a la división Eumicota que agrupa a los denominados hongos verdaderos. Dentro de esta división las levaduras se incluyen en 2 de las 5 subdivisiones de los Eumicetos, Tabla 1. La Ascomycotina representada por las levaduras capaces de producir ascosporas, llamadas por ello esporógenas, y la Deuteromycotina representada por las levaduras incapaces de formar esporas llamadas por ello asporógenas o no esporógenas.

Asimismo, conviene referir que por debajo de los taxones género y especie las levaduras pueden ser clasificadas en subespecies y variedades que a menudo adquieren el rango de especies tras nuevas revisiones taxonómicas, o, por el contrario, varias especies son unificadas en una sola como subespecies de la misma con lo que la clasificación se complica aún más y se incrementa el número de sinonimias¹².

1.3 Especies de mayor relevancia enológica

Manteniendo la distinción hecha entre levaduras esporógenas y no esporógenas, a continuación, se detallan algunas de las especies con mayor relevancia enológica.

Entre las levaduras esporógenas denominadas frecuentemente de segunda fase por aparecer en un estado avanzado de la fermentación alcohólica y producir gran cantidad de etanol destacan:

Saccharomyces cerevisiae (*S. ellipsoideus*) es una de las más importantes en enología ya que es la responsable de la fermentación de la mayor parte de los azúcares del mosto. Su poder alcohológeno es elevado (17°) y es bastante resistente al SO₂ (250 mg/L).

Saccharomyces bayanus (*S. oviformis*), semejante a la anterior resiste también 250 mg de SO₂/L, pero su poder alcohológeno es mayor pudiendo superar los 18°. Es la levadura típica de las etapas finales de la fermentación y a menudo la responsable de refermentaciones de vinos embotellados.

Saccharomyces acidifaciens (*S. bailii*), con un poder alcohológeno de tan solo 10°, su principal característica es su elevada resistencia al SO₂ (250 a 400 mg/L) lo que le permite iniciar la fermentación en mostos muy sulfitados, comportándose en estos casos como levadura de primera fase.

Torulasporea rosei (*S. rosei*) tiene un poder alcohológeno de 8 a 14° y su principal característica es su capacidad para fermentar lentamente los azúcares con lo que los niveles de acidez volátil producidos son menores.

Entre las levaduras asporógenas, generalmente de primera fase, que se caracterizan por aparecer al principio de la fermentación alcohólica y producir gran cantidad de compuestos secundarios enriquecedores del sabor y aroma del vino, destaca:

Kloeckera apiculata, es la forma imperfecta o haploide de *Hanseniaspora uvarum*. Junto con *Saccharomyces cerevisiae* es la levadura más frecuentemente encontrada en los mostos.

Candida stellata tiene un poder alcohológeno de 10° a 11° y se caracteriza fundamentalmente por aparecer con más frecuencia en mostos de uvas atacadas de podredumbre^{12,13,14}.

1.4 Fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica es el proceso bioquímico de transformación del azúcar del mosto en alcohol, a lo largo de una serie de reacciones en cadena catalizadas por las enzimas contenidas en el citoplasma de las levaduras.

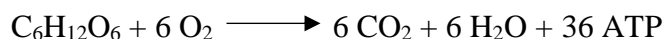
La carga enzimática de las distintas especies de levaduras presenta diversidad cualitativa y cuantitativa, incluso entre las diferentes cepas, variedades o razas de una misma especie. Por tanto, el curso de la fermentación puede ser diferente en función de las características fisiológicas de la levadura, las características físico-químicas del sustrato y las condiciones ambientales en que se desarrolle, que influirán en la producción y funcionalidad de las enzimas presentes¹⁵.

Además de alcohol, como resultado de la fermentación, se origina otros subproductos fundamentales para las cualidades organolépticas del vino.

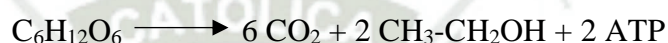
1.4.1 Bioquímica de la fermentación alcohólica

Las levaduras pueden obtener la energía que les es necesaria para vivir, siguiendo dos vías en la transformación de los azúcares del mosto:

- Respiración: Vía oxidativa que tiene lugar en presencia de oxígeno (aerobia) y que permite la degradación completa de los azúcares hasta CO₂ y agua con gran liberación de energía.



- Fermentación: Se realiza en ausencia de oxígeno (anaerobiosis) y provoca una degradación incompleta de los azúcares hasta CO₂ y etanol, con escasa liberación de energía. Por ello, las levaduras al utilizar esta vía deben transformar mucho azúcar en alcohol para cubrir sus necesidades energéticas.

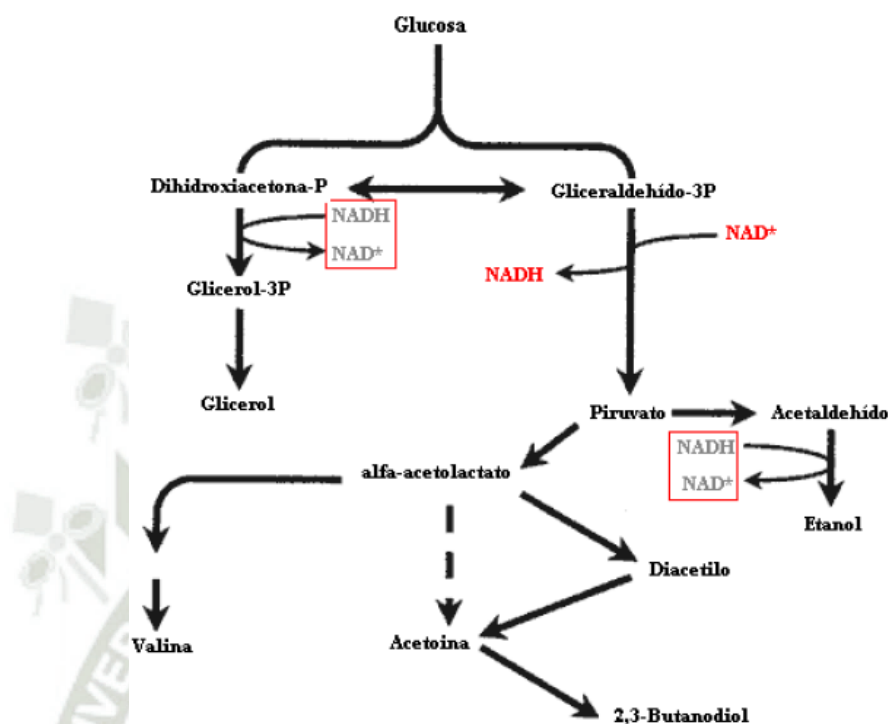


Independientemente de la vía utilizada, la principal ruta bioquímica en la degradación de los azúcares es la glicólisis, a través de la cual la glucosa se transforma en ácido pirúvico.

En la fermentación alcohólica se pueden distinguir dos etapas. En una primera etapa las levaduras degradan algunas moléculas de azúcar por vía respiratoria: el metabolismo sigue la ruta de la glicólisis, pasando el ácido pirúvico formado al ciclo de Krebs con una elevada producción de energía, que permite una rápida multiplicación de las levaduras alcanzando una gran biomasa. Esta etapa se mantiene hasta agotar el oxígeno disuelto en el mosto. Una vez agotado el oxígeno, las levaduras comienzan a seguir la vía fermentativa. En la ruta fermentativa, el ácido pirúvico formado en la glicólisis se descarboxila a etanal y éste a su vez, se reduce posteriormente, a etanol.

Pero no todas las moléculas de azúcares del mosto van a seguir esta ruta hasta la obtención de etanol y anhídrido carbónico, sino que, dependiendo del propio metabolismo de las levaduras, una parte de los azúcares son degradados mediante la fermentación gliceropirúvica, en la que además de glicerina (segundo componente cuantitativamente más importante después del etanol en el vino) se forma ácido pirúvico. Este compuesto será el origen de los diferentes productos secundarios de la fermentación alcohólica: ácido succínico, ácido acético, ácido láctico, los metabolitos del ciclo diacetilo-acetoínico, entre otros.

Figura 1. Esquema de fermentación alcohólica y gliceropirúvica.



El NADH formado en la reacción glicolítica de formación del piruvato nuevamente debe ser oxidado. Al comienzo de la fermentación se oxidará siguiendo la vía gliceropirúvica acumulándose al mismo tiempo acetaldehído y piruvato que dará lugar a toda una serie de productos secundarios. Cuando la cantidad de acetaldehído alcance una concentración crítica, se desencadenará la indicada fermentación alcohólica, la molécula de NADH se oxidará por esta vía produciendo etanol, Figura 1.

Al mismo tiempo y de forma asociada a esta degradación de los azúcares se produce la transformación de otros compuestos, fundamentalmente materia nitrogenada y compuestos azufrados, necesarios para el mantenimiento de las estructuras celulares y la multiplicación de las levaduras.

Los productos sustantivos del metabolismo nitrogenado de las levaduras en el vino son los alcoholes superiores como el isobutanol, los alcoholes amílicos o el 2-fenil etanol, que junto con sus ésteres contribuyen a la calidad organoléptica del vino. Aunque alguno de estos alcoholes superiores provenga, como el caso del n-propanol, del metabolismo glucídico.

Se utilizan los compuestos azufrados en los procesos de biosíntesis de aminoácidos, proteínas y vitaminas necesarios para que se multipliquen las levaduras. Este metabolismo azufrado puede producir compuestos como el ácido sulfhídrico o los mercaptanos que afectan de forma negativa a las características organolépticas del vino, y cuya formación va relacionada a lo que requiere la levadura de sintetizar aminoácidos azufrados.

Quedan englobados, todos los procesos bioquímicos indicados en lo que se llama fermentación alcohólica¹⁶.

1.4.2 Dinámica de las poblaciones de levaduras en fermentaciones espontáneas

Cuando los mostos no son inoculados, normalmente la fermentación es iniciada por varias especies de bajo poder alcoholígeno y cierto poder oxidativo, como *Hanseniaspora* y *Candida*, y en menor medida *Hansenula*. Estas levaduras crecen, hasta poblaciones totales del orden $10^6 - 10^7$ células/ml, durante los 2 o 3 primeros días de fermentación. Posteriormente, se empiezan a morir debido al aumento de la concentración de etanol en el medio, dando paso a cepas más resistentes al etanol y con mayor poder fermentativo como *Zygosaccharomyces*, *Torulasporea* y *Saccharomyces*^{17,18,19}.

De manera concluyente, acaban la fermentación distintas cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, las cuales van incrementando de forma gradual su población desde el principio hasta constituir prácticamente el 100% de las levaduras en la fase exponencial²⁰.

Una vez finalizada la fermentación, en los mostos es habitual la aparición de velos blastomicéticos constituidos fundamentalmente por levaduras del género *Saccharomyces*. En vinos de grado alcohólico inferior al 13% aparecen además los géneros *Hansenula*, *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Rhodotorula* y *Cryptococcus*.

En base a esta dinámica de poblaciones durante la fermentación espontánea se pueden establecer 3 hechos fundamentales²¹:

- 1) Las especies de alto o medio poder fermentativo aumentan desde el comienzo del proceso hasta la fase estacionaria, reduciéndose al final de la fermentación.

- 2) La población de carácter oxidativo es particularmente elevada al comienzo de la fermentación, disminuyendo o incluso desapareciendo en las restantes fases.
- 3) En los vinos de ciertas zonas puede aparecer una etapa aeróbica terminada la fase fermentativa, en la que se desarrollan diversas levaduras sobre la superficie de los vinos.

1.5 Vinificación con levaduras nativas seleccionadas

En los países con marcada y reciente producción vitivinícola, tales como Bulgaria, Estados Unidos, Australia o Sudáfrica, donde no existía una flora levaduriforme natural estable para fermentaciones de mostos, hay una renuencia a confiar en la fermentación espontánea y por ello se inoculan los mostos con levaduras comerciales para asegurar el éxito de la fermentación, eliminando o inhibiendo previamente la flora no deseable por pasteurización o mediante la adición de anhídrido sulfuroso.

Esto se explica por la escasa tradición vitivinícola de estos países, lo cual provoca que no dispongan de una flora levaduriforme autóctona arraigada ideal para una fermentación espontánea favorable.

Hasta muy reciente, entre los enólogos europeos predominaba la idea de que la fermentación espontánea inducida por la flora autóctona conduce a que se obtenga vinos de mejor aroma y bouquet, apoyando la idea de que la posesión de una flora autóctona consolidada produce mejores caldos a través de una ancestral tradición vitivinícola. Actualmente, la tendencia es un poco diferente, ya que se ha demostrado que el uso de levaduras locales seleccionadas tiene ventajas preponderantes con respecto a la fermentación espontánea tradicional.

Cuando se añade al mosto un cultivo iniciador de levadura local seleccionada, cuya concentración es excesiva frente a las levaduras silvestres, se convierte la cepa añadida en el agente dominante durante la fermentación.

Cabe indicar que la levadura dominante es la que más aporta la mayoría de los aromas secundarios, aunque no cabe descartar la contribución de las levaduras silvestres al sabor y aroma de los vinos, en otras palabras, los producidos durante la fermentación.

Según la levadura utilizada en la fermentación del mosto, se producirán unos u otros compuestos que coadyuvarán a la calidad final del vino, y, por consiguiente, a los resultados de las evaluaciones sensoriales²³.

Cabe indicar que deben estar preparadas las levaduras nativas seleccionadas a usar en una determinada zona para fermentar en condiciones ambientales que se van a encontrar (tipo de mosto, prácticas enológicas, climatología, etc.)²².

Por lo antes referido, aunque existen levaduras secas activas comerciales (LSA) teóricamente adecuadas para realizar vinificaciones, resulta mucho más correcto utilizar cepas autóctonas locales seleccionadas²¹.

Están mejor aclimatadas las cepas locales a las condiciones geo-botánico-climatológicas de la zona productora en cuestión, y pueden implantarse como agente biológico más preponderante responsable de la fermentación alcohólica, inclusive en presencia de las levaduras silvestres que se encuentran en los mostos no estériles. Por otra parte, puede asegurarse el mantenimiento de las características propias típicas de los vinos de la zona, la utilización de levaduras locales seleccionadas aspecto muy importante a considerar por el bodeguero industrial que comercializa la mayoría de su producción en origen.

1.6 Ventajas de la utilización de levaduras nativas seleccionadas

La utilización de cultivos iniciadores de levaduras nativas seleccionadas en procesos de vinificación presenta básicamente cinco ventajas frente a la fermentación espontánea tradicional:

- 1) Mayor velocidad de fermentación.

En muchas ocasiones la flora silvestre presente en los mostos no es adecuada para iniciar la fermentación con rapidez.

El uso de ciertos productos fitosanitarios reduce considerablemente la población de levaduras presente en la uva, especialmente las levaduras fermentativas.

Utilizando un inóculo de levaduras nativas seleccionadas iniciadoras de la fermentación, se asegura la presencia de levaduras fermentativas adecuadas que realicen la fermentación del mosto a una velocidad aceptable.

2) Máximo consumo de los azúcares reductores.

Cuando los mostos presentan una elevada cantidad de azúcar (mayor de 200 g/L) o cuando se impone una cepa de levadura con insuficiente resistencia al etanol puede quedar en el vino una excesiva cantidad de azúcares. Este problema se corrige fácilmente utilizando levaduras nativas seleccionadas resistentes a altas concentraciones de etanol.

3) Mayor reproducibilidad en la calidad de los vinos.

Se puede incluso, mantener y asegurar una cierta calidad del vino de una campaña a otra muy distinta con respecto al estado fitosanitario de la uva, lo que es prácticamente imposible utilizando métodos tradicionales de vinificación.

4) Reducción de los problemas causados por levaduras extrañas silvestres.

La flora presente en los mostos puede ser muy diferente dentro de la misma zona vitivinícola e incluso dentro de la misma bodega, debido a factores como técnicas de vendimia, vinificación, temperatura y pluviosidad. Como efecto, en cualquier momento pueden surgir levaduras extrañas silvestres que deterioren la calidad de los vinos. Con el uso de inóculos de levaduras nativas seleccionadas se minimiza o desaparece este riesgo.

5) Mayor flexibilidad en el control de la calidad sensorial del vino.

Cabe referir que se puede definir la calidad y las características específicas de un determinado vino. Mediante la selección de cepas que produzcan menor

cantidad de los compuestos desagradables y mayor cantidad de los compuestos más deseados²¹.

1.7 Criterios de selección de levaduras nativas

Básicamente, las cepas nativas seleccionadas han de ser capaces de producir vinos de calidad.

Esta calidad ha de mantenerse para un mismo tipo de mosto y procedimiento de elaboración, con independencia del recipiente de procedencia del vino, evitando así los problemas frecuentemente causados por el crecimiento de otros microorganismos silvestres no deseados.

Existen ciertos criterios objetivos que permiten determinar si una levadura puede ser teóricamente adecuada para la producción de vinos de calidad con unas ciertas garantías de éxito. Estos criterios pueden variar según el tipo de vino que se pretenda elaborar y la opinión de los expertos consultados. A pesar de esto, existen ciertas especificaciones que deberían cumplir las cepas de levaduras nativas seleccionadas y en las que la mayoría de los expertos coinciden. Las características que deben reunir son las siguientes:

- 1) Poder fermentativo
- 2) Cinética fermentativa
- 3) Resistencia al estrés fermentativo en presencia de etanol
- 4) Efecto de la temperatura

1.7.1 Poder fermentativo

Se entiende por poder fermentativo o poder alcoholígeno la capacidad que tienen las levaduras para producir vinos de elevado grado alcohólico, por consiguiente, corresponde al máximo porcentaje de etanol que una levadura es capaz de producir al fermentar un mosto estéril con exceso de azúcares, graduación Baumé igual o superior a 12 °Bé (212 g/L de azúcar).

El alcohol etílico o etanol, de fórmula $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{OH}$ representa del 7 al 16% del volumen del vino y aún más para los especiales, elaborados con agregados de alcohol.

En los vinos de mesa, esta proporción ejerce gran influencia sobre la calidad, la conservación y el valor comercial. En general, cuanto más alcoholizado está el vino más cuerpo tiene y más rico es su extracto.

La proporción de alcohol del vino está relacionado de manera directa con el estado de madurez de la uva; los grados altos se alcanzan sólo en ciertos años favorables, en determinadas condiciones de cultivo y de exposición, pero sin duda también influyen de forma notable las levaduras que llevarán a cabo la fermentación del mosto.

La forma más sencilla para la determinación del poder fermentativo de una cepa de levadura es el seguimiento gravimétrico de la fermentación de un mosto estéril e inoculado con una cepa de levadura a estudiar, en un microvinificador sellado con válvula Müller. De esta forma, paralelamente se puede estudiar la cinética fermentativa^{24,25}.

Figura 2. Matraz con válvula Müller para la determinación del poder fermentativo por gravimetría.



Por consiguiente, el poder fermentativo, como primer criterio, facilita la elección después de realizada la prueba, solamente aquellas cepas que superen la graduación alcohólica previamente establecida y reducir así ampliamente el número de cepas en estudio.

1.7.1.1 Descripción del método

Aunque tiene un escaso valor taxonómico esta prueba, en general, para las levaduras vínicas sí lo tiene, y sobretodo es un procedimiento de una gran preponderancia y significado tecnológico. El poder fermentativo es la medida del porcentaje (v/v) de etanol que una cepa de levadura es capaz de producir.

Para la realización de esta prueba se dispone de matraces de 100 ml, que se esterilizan a 160 °C durante una hora.

Se prepara mosto de 24° Baumé, a partir de mosto de uva fresco concentrado.

Se reparte en los matraces estériles de 100 ml, a razón de 50 ml exactos por matraz.

Se han sembrado previamente las cepas a examen en agar PDA, y a partir de estos cultivos jóvenes se llevan a cabo las siembras en los matraces que contienen el mosto estéril.

Se cierra con una válvula Müller más ácido sulfúrico concentrado, tras la inoculación, que evita la entrada de oxígeno y permite la salida de CO₂, así como la retención de otros productos volátiles de la fermentación.

Terminadas las siembras, se pesa cada matraz, de forma diaria esta operación se repite para de esta forma medir por diferencia de peso el anhídrido carbónico formado hasta que se alcance un peso constante.

Calculando la diferencia entre la primera pesada y la última, y multiplicando esta diferencia por el factor 1,5, se obtiene un producto que es igual al poder fermentativo expresado en porcentaje de alcohol en volumen.

1.7.2 Cinética fermentativa

La cinética fermentativa es la velocidad de metabolización de azúcares con respecto al tiempo. En enología, es frecuente valorarla como variación de la densidad o como pérdida de CO₂ con respecto al tiempo. Permite el seguimiento de la evolución de la fermentación y la detección de comportamientos anormales. Varios son los criterios a tener en cuenta para determinar la correcta cinética fermentativa de una levadura:

- Rápido arranque de la fermentación: Garantiza la estabilidad de la materia prima y disminuye las posibilidades de ataques bacterianos u oxidaciones.
- Regularidad fermentativa y curva termodinámica de cada cepa de levadura: Una cinética progresiva garantiza la ausencia de explosiones calóricas. Esto evitará elevaciones excesivas de temperatura que puedan provocar mala calidad del vino e incluso paradas fermentativas. Además, permitirá reducir la necesidad de refrigeración.
- Ausencia de problemas de acabado: Garantiza que la cepa pueda terminar correctamente la fermentación sin que en el vino permanezcan azúcares residuales.
- Duración total del proceso.
- Respuesta al estrés fermentativo, que es provocado por la producción de etanol y CO₂, ausencia de micronutrientes, esteroides de membrana y ácidos grasos saturados²⁶.

1.7.3 Resistencia al estrés fermentativo en presencia de etanol

Supone una dificultad para el correcto crecimiento microbiológico el incremento de la concentración de etanol a medida que transcurre la fermentación. Por este motivo, una parada fermentativa supondría la presencia de azúcares residuales en el vino; y por consiguiente, los efectos negativos que esto con lleva. Pero la cantidad de alcohol que bloquea la fermentación depende de numerosos factores como son la cepa de levadura, la temperatura o la aireación.

El etanol ejerce una inhibición no competitiva en multitud de funciones. El efecto del etanol está tan generalizado en el caso de las levaduras que resulta complicado determinar de manera fisiológica cuál es el proceso cuya inhibición actúa como limitante del crecimiento y la fermentación, y se localiza a veces en algún punto clave de la glicólisis y en otras en el transporte de glucosa o alguna otra molécula orgánica que va a ser catabolizada enzimáticamente en el interior de la célula.

1.7.4 Efecto de la temperatura

Juega un rol preponderante la temperatura en la distribución ecológica de las especies de manera más intensa que cualquier otro factor físico. Afecta a todas las especies de levaduras vínicas tanto en exceso como por defecto.

Presenta todo microorganismo tres “temperaturas cardinales” que marcan tres diversas intensidades en su vitalidad. El microorganismo está vivo, a la temperatura mínima, pero no desarrolla con normalidad sus funciones de crecimiento y reproducción. No obstante, a la temperatura óptima el desarrollo de todas las funciones vitales es máximo. La velocidad de consumo de alimentos es enorme y la velocidad de multiplicación alcanza valores máximos, y coincide con las mejores concentraciones de nutrientes. Finalmente, la temperatura máxima es aquella en la que el microorganismo suspende de nuevo su proceso metabólico y; por consiguiente, ya no crece ni se reproduce, en otras palabras, queda inactivo pero vivo.

Después de ésta, se logra velozmente la temperatura letal a la que la especie sufre la muerte instantánea de todas sus células vegetativas.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material Biológico

Kilogramos de Uva (*Vitis vinífera L. var. Listan Prieto*)

Muestra sanguínea (Suero)

2. Reactivos Químicos

Aceite de inmersión

Ácido Sulfúrico

Agua destilada y estéril

Agua peptonada

Alcohol 70%

Azul de metileno

Caldo BHI (Brain Heart Infusion)

Caldo Urea

Cloranfenicol

Escala de McFarland

Lejía

Medio PDA

Ron de quemar

Sistema API 20 C AUX

Tinta china

3. Material de Vidrio

Asas de col

Asa de drigalsky

Frascos graduados de vidrio de 500 ml de tapa rosca

Láminas cubreobjetos

Láminas portaobjetos

Matraces Erlenmeyers de 100 ml, 250 ml, 500 ml y 1000 ml

Mecheros

Microvinificadores de vidrio

Morteros y mazos

Probetas

Pipetas graduadas de 10 ml

Placas Petri

Recipientes de vidrio con tapa de resina ajustable de capacidad de 1500 ml

Tubos de ensayo de 15 x 125 mm

Vasos precipitados de 50 ml, 100 ml y 500 ml

Viales de vidrio

4. Instrumentos y Equipos

Autoclave

Balanza analítica

Balanza de precisión

Cámara de Bioseguridad

Caja para incubación

Centrífuga

Densímetro en escala Baumé

Hornilla eléctrica

Horno

Incubadora

Micropipetas de 10 ul, 100 ul y 1000 ul

Microscopio

Refractómetro

Refrigeradores

Potenciómetro

Termómetro digital

Vórtex

METODOLOGÍA

1. Aislamiento de Levaduras

Primera Parte

Se trabajó con uva de la variedad Negra Criolla, proveniente de dos viñedos ubicados en el distrito de Sobraya-Pocollay y Piedra Blanca-Calana respectivamente.

Primero se realizó una toma de muestra en el lugar, para esto se cortó aproximadamente 3 kilos de uva de la variedad Negra Criolla, y se la procedió a llevar al laboratorio de manera aséptica, es decir, en bolsas ziploc de primer uso. Ver la Figura 17 de los Anexos.

Una vez en el laboratorio, se trituró la muestra con ayuda de un mortero y mazo de porcelana. Se estrujó toda la muestra de uva por porciones pequeñas, y se conservó el hollejo más el extracto (líquido) de la uva, traspasándolo a un recipiente estéril de vidrio²⁷. Ver la Figura 18 de los Anexos.

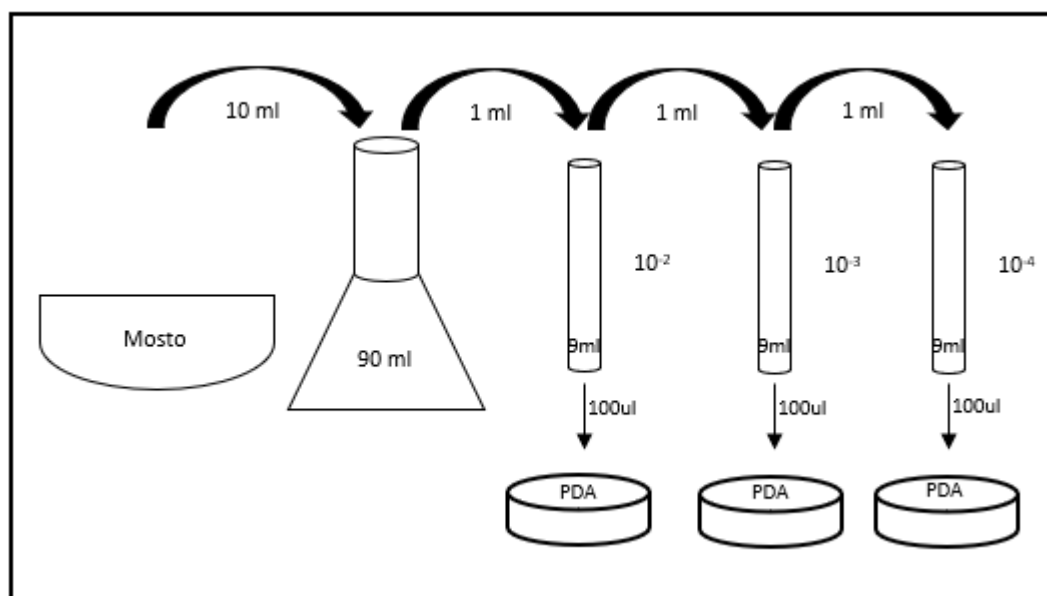
Al mosto obtenido se le determinó la concentración de azúcares mediante la medición de los °Brix con un refractómetro de mano, siendo la concentración de 24 °Brix.

Segunda Parte

Se procedió a realizar diluciones del líquido de la uva, traspasándolo a diluyentes²⁷.

Para esto se pesó previamente 5.325 gramos de agua peptonada y 5.85 gramos de medio PDA. La primera cantidad fue para un total de 3 matraces de 250 ml y 9 tubos de 15 x 125 mm. La segunda cantidad fue para un total de 9 placas Petri con medio de cultivo PDA adicionado con cloranfenicol. Ver la Figura 19 de los Anexos.

Figura 3. Procedimiento de diluciones seriadas.



Según la siguiente figura, se tomó con pipeta 10 ml del líquido de la uva y se lo traspasó a un matraz Erlenmeyer con 90 ml de agua peptonada. Luego a partir del matraz Erlenmeyer (primera dilución 10^{-1}) se tomó con pipeta 1 ml y se lo traspasó a un tubo de ensayo con 9 ml de agua peptonada (segunda dilución 10^{-2}). Del mismo modo se realizó para un segundo y tercer tubo de ensayo. Se tomó con pipeta 1 ml de la dilución 10^{-2} y se la traspasó a un segundo tubo de ensayo (tercera dilución 10^{-3}). Por último, se tomó con pipeta 1 ml de la dilución 10^{-3} y se la traspasó a un tercer tubo de ensayo (cuarta dilución 10^{-4}).

Luego de las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} respectivamente, se tomó 100 ul de cada tubo y se lo volcó a tres placas Petri rotuladas como 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} ²⁷.

Se realizó una siembra por diseminación con asa de drigalsky en las placas 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} ²⁷. Ver la Figura 20 de los Anexos.

Para realizar los aislamientos se utilizó un medio Agar Papa Dextrosa, con la siguiente composición: Caldo de papa 4 g, Dextrosa 20 g, Agar – Agar 15 g y agua destilada 1000 ml.

Tercera Parte

Luego de la observación de crecimiento a las 48 horas, se elaboró viales con medio PDA inclinado para realizar repiques de las cepas obtenidas. Los medios fueron esterilizados en autoclave y se tomó una asada de levaduras nativas y se traspasó a cada uno de los viales. Se hizo este procedimiento por cada levadura aislada (E_110^{-3} , E_110^{-2} , E_210^{-2} y E_210^{-3}). Se dejó en incubación los viales durante 48 horas²⁸. Ver la Figura 21 de los Anexos.

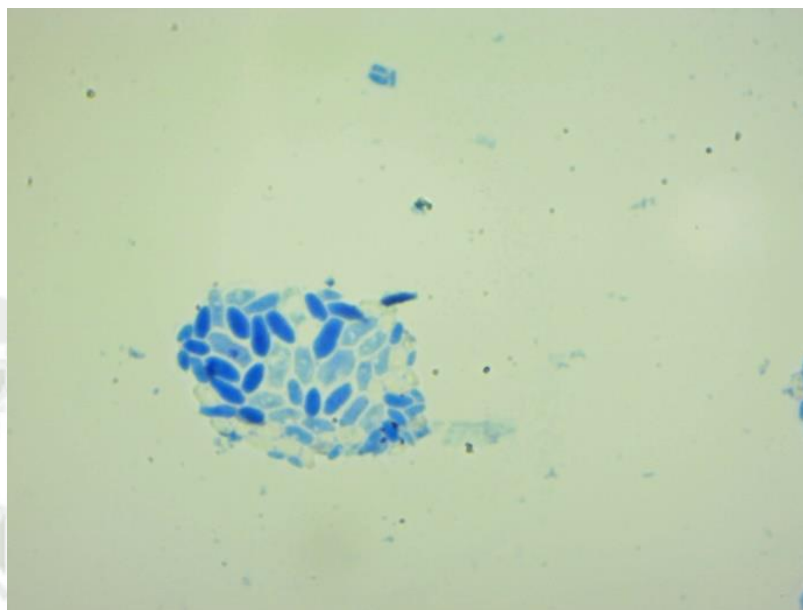
2. Identificación de Levaduras

Se realizó una combinación de pruebas morfológicas y bioquímicas para identificar levaduras, con el objetivo de observar la morfología de las levaduras, se realizó la coloración simple de azul de metileno, la coloración de tinta china, la prueba del tubo germinal y la prueba de la degradación de la urea.

La primera prueba se realizó para observar en la muestra la presencia y forma de las levaduras nativas. La segunda prueba se realizó para distinguir si las levaduras presentes contenían capsula alrededor de ellas. La tercera prueba demuestra la presencia de tubo germinal en las levaduras (detalle acerca de su reproducción). Y la cuarta prueba demuestra la capacidad que tiene la levadura para degradar la urea.

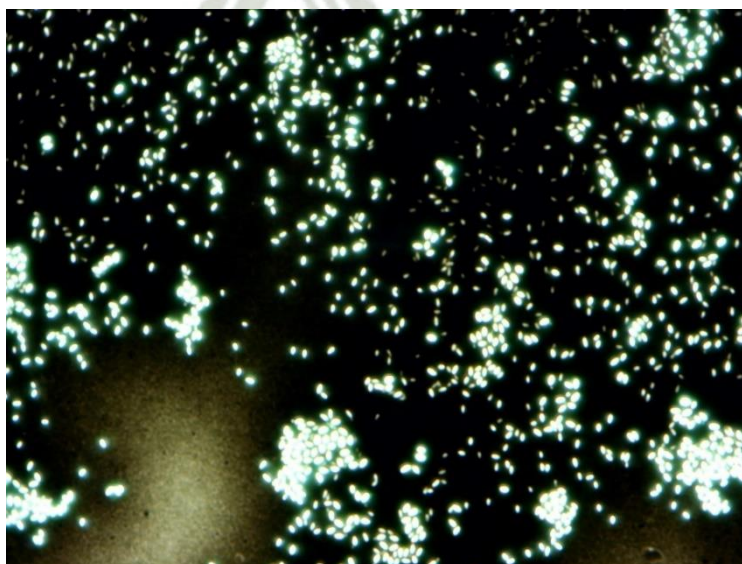
Para la coloración de azul de metileno, se colocó una gota de agua destilada en la lámina portaobjeto y luego se incorporó una asada de levaduras nativas a partir de la muestra del vial previamente rotulado. Se dibujó un rectángulo regularmente grande y se fijó la muestra suavemente con ayuda del mechero. Una vez seco, se agregó gotas de azul de metileno hasta cubrir la muestra y se dejó por un tiempo de 5 minutos. Se enjuagó con agua destilada y se observó bajo el microscopio a $40\times$ ²⁹. Ver la Figura 22 de los Anexos.

Figura 4. Coloración simple de azul de metileno 40x (Forma: Ovalada).



Para la coloración de tinta china, se tomó directamente una asada de levaduras nativas a partir de la muestra del vial previamente rotulado y se la colocó sobre la lámina portaobjetos, se agregó una pequeña cantidad (casi gota) de tinta china sobre la lámina portaobjetos, y se esparció en forma de casi rectángulo la muestra. Se ayudó añadiendo una gota de agua destilada a la muestra. Se observó bajo el microscopio a 40x ²⁹. Ver la Figura 23 de los Anexos.

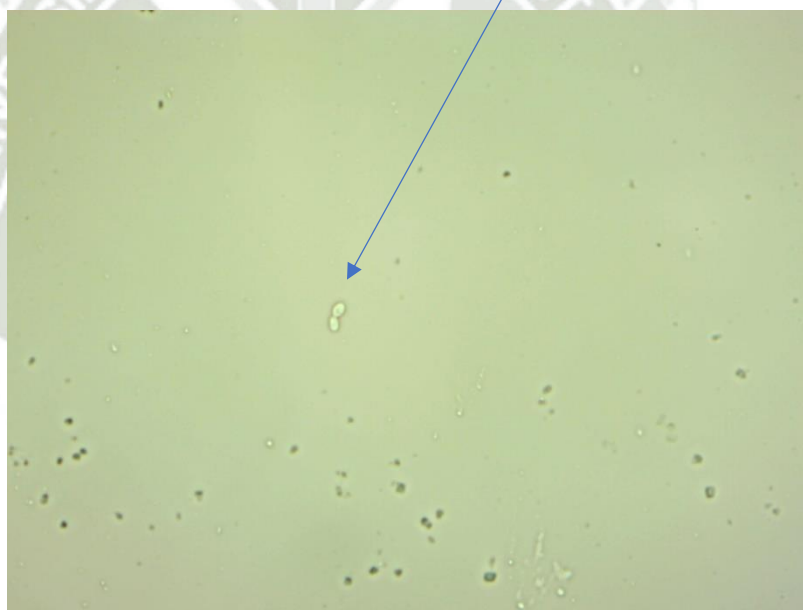
Figura 5. Coloración de tinta china 40x (Capsula alrededor de ellas).



Para la prueba del tubo germinal, se sacó un poco de sangre del brazo izquierdo para utilizar el suero luego de ser centrifugada la muestra sanguínea. Se sacó aproximadamente 5 ml de sangre y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos. Se traspasó el suero a otro tubo de ensayo para la prueba.

Luego se tomó una asada de cada levadura nativa aislada y se la traspasó a cuatro tubos de ensayo en total, que contenían el suero respectivamente. Al cabo de 30-45 minutos en que se dejó reposar, con una pipeta pasteur (4 para cada muestra), se tomó una gota del tubo con el suero y la levadura y se la colocó en una lámina portaobjeto, luego se cubrió con lámina cubreobjeto y se rotularon las muestras. Se observó a 40x bajo el microscopio²⁹. Ver la Figura 24 de los Anexos.

Figura 6. Presencia del tubo germinal 40x.



Para la prueba de la degradación de la urea, colocamos caldo urea en 4 tubos de ensayo y lo mandamos a esterilizar. Luego sembramos en 4 de ellos las 4 cepas $E_1 10^{-3}$, $E_1 10^{-2}$, $E_2 10^{-2}$ y $E_2 10^{-3}$ aisladas. Se dejó 48 horas en incubación hasta observar un anillo con cambio de color a púrpura por el indicador de pH rojo fenol que es un componente del caldo urea. Transcurrido el tiempo se registró los resultados^{29,30}. Ver la Figura 22 de los Anexos.

Figura 7. Prueba de la degradación de la urea (Formación de anillo púrpura).



3. Identificación de Especie de Levadura

Se realizó la identificación de cuatro levaduras nativas $E_1 10^{-3}$, $E_1 10^{-2}$, $E_2 10^{-2}$ y $E_2 10^{-3}$ con pruebas bioquímicas, primero con la prueba de fermentación de azúcares y en segundo lugar con el sistema API 20 C AUX.

Primera Parte: Fermentación de azúcares

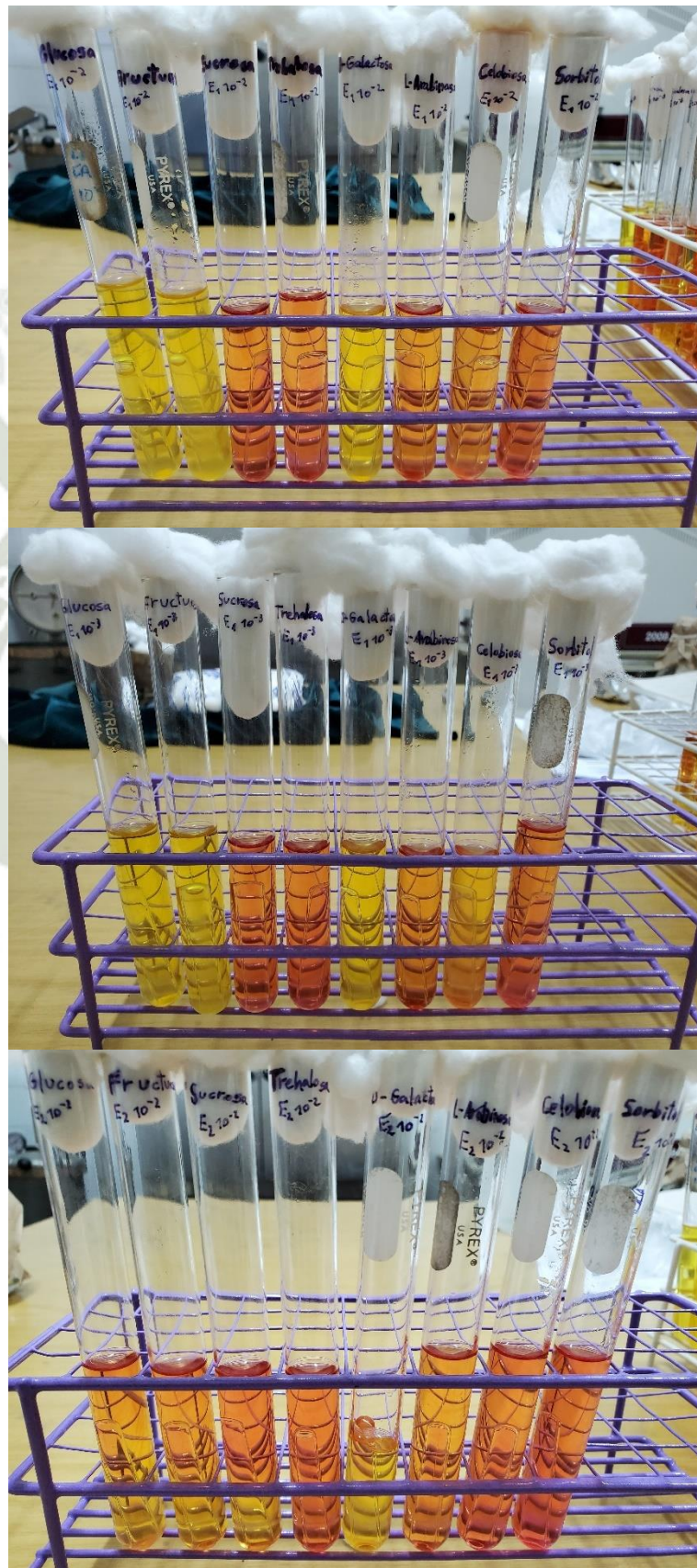
Se preparó una batería de 8 azúcares (8 tubos de ensayo), en total tres baterías para tres cepas nativas $E_1 10^{-3}$, $E_1 10^{-2}$ y $E_2 10^{-2}$. Se pesó 4.5 g de cada azúcar y se los agregó a cada tubo de ensayo respectivamente.

Cada tubo contenía los ingredientes del caldo rojo fenol, y se le adicionó campanas Durham a cada tubo luego de incorporarse los azúcares.

El orden de la lista de azúcares fue: Glucosa, Fructuosa, Sucrosa, Trehalosa, D-Galactosa, L-Arabinosa, Celobiosa y Sorbitol, estando este último de manera líquida e incorporándose 50 ul del mismo.

Una vez lista la batería de tubos (3 baterías para 3 cepas), se inoculó con las levaduras nativas^{30,31}. Ver la Figura 25 de los Anexos.

Figura 8. Tres baterías con tubos de ensayo de ocho azúcares.



Segunda Parte: Sistema API 20 C AUX

Se utilizó el sistema API 20 C AUX de Biomérieux. Este sistema consiste en la asimilación de 19 fuentes de carbono diferentes, está compuesto por una galería de 20 celdas, 19 de las cuales contienen respectivos sustratos carbonados deshidratados y la primera celda vacía para control negativo.

El procedimiento consistió en preparar primero una suspensión de levadura a estudiar (cultivos jóvenes) en 2 ml de solución de NaCl 0,85%. Esta suspensión se llevó a modo de alcanzar una concentración celular equivalente a 2 unidades turbidimétricas en la escala de McFarland.

Luego de esta suspensión se transfirieron 100 ul al medio C (provisto por el equipo) el cual poseía todos los componentes necesarios para el desarrollo de la levadura excepto la fuente de carbono y energía a ser ensayada. A su vez, de esta nueva suspensión se transfirieron aproximadamente 200 ul a cada celda o cúpula, y se colocó la galería dentro de una cámara húmeda (provisto por el equipo), para evitar la desecación de las muestras.

Estos cultivos se incubaron durante 48-72 horas a 27 °C aproximadamente.

Los resultados del examen API, al cabo de 48-72 horas, se expresaron como positivo (+) cuando en las celdas se observó turbidez por el desarrollo de la levadura y negativo (-) cuando el medio de cultivo permaneció completamente límpido sin señales de crecimiento.

Identificación. Los datos se volcaron en una clave numérica y se refirieron al programa API Web, concluyéndose en asignar un género y una especie a la levadura incógnita^{32,33}.

4. Ensayo de Cinética y Poder Fermentativo con Levaduras Nativas

Se evaluó la cinética y el poder fermentativo de las levaduras nativas aisladas.

Primera Parte

Primero se realizó la activación de las levaduras nativas y la levadura comercial.

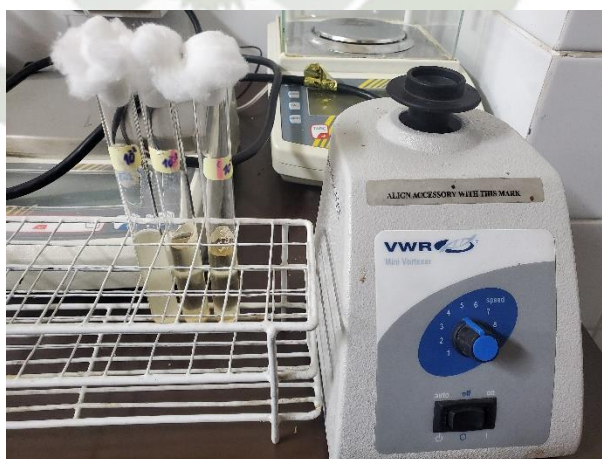
Para las levaduras nativas, se tomó una asada, a partir de uno de los viales, y se traspasó a un tubo con caldo BHI. Se dejó incubar durante 24 horas a 20 ± 3 °C.

Luego se tomó una asada del tubo con caldo BHI y se traspasó a otro vial con medio PDA más cloranfenicol durante 24-36 horas a 20 ± 3 °C.

Para la levadura comercial, en un tubo de ensayo se colocó agua peptonada, y se transfirió a éste una pequeña cantidad de levadura liofilizada comercial. Luego se agitó en el vórtex hasta que se enturbiara bien el tubo^{34,35}. Ver la Figura 26 de los Anexos.

Luego se traspasó 2 asadas de la levadura activada a un tubo con caldo BHI. Del mismo modo se traspasó 1 asada de la levadura activada en caldo BHI a un medio PDA sólido inclinado dentro de un vial. Se dejó en incubación durante 48 horas y se observó el resultado al término del tiempo.

Figura 9. Activación de las levaduras nativas y la levadura comercial.



Segunda Parte

Para iniciar el ensayo de cinética y poder fermentativo, previamente se realizó un procedimiento de desinfección de la uva, para que durante las curvas de fermentación sólo trabaje las levaduras de interés.

Se trabajó con bolsas ziploc y previamente se hizo esterilizar en el autoclave, matraces de 1000 ml con agua destilada, en total 4 litros de agua destilada.

Se agregó 50 ul de cloro a uno de los matraces de 1000 ml con el agua destilada, y seguidamente se incorporó el agua a una bolsa ziploc que contenía 1,700.0667 gramos de uva.

Se agitó constantemente la bolsa durante 30 minutos para asegurarnos de eliminar toda la flora levaduriforme y bacteriana que estuviera presente en la uva. Este procedimiento se repitió para dos bolsas más.

Luego del procedimiento de desinfección con cloro, se procedió a enjuagar tres veces, cada bolsa ziploc con las uvas. Cada enjuague se realizó con agua destilada estéril limpia. De los tres matraces con agua que quedaban, cada uno se vertió en una bolsa ziploc nueva para los enjuagues respectivos.

Cada enjuague se realizó durante 10 minutos, en constante movimiento la bolsa³⁶.

Una vez desinfectada y enjuagada los racimos de uva, se procedió a la segunda parte que fue aplastarlas o molerlas, en mortero con mazo de porcelana, para que el contenido ingrese en el sistema de microvinificadores de vidrio. Ver la Figura 27 de los Anexos.

Tercera Parte

Se empleó un sistema de microvinificadores de vidrio realizados en Erlenmeyers de 100 ml, adicionándose a la boca de cada uno de éstos unas ampollas de vidrio, las cuales fueron presionadas contra la boca de cada Erlenmeyer con válvula de Müller.

Los microvinificadores fueron en total 21 y fueron esterilizados en autoclave a 121 °C, 15 libras de presión por 15 minutos.

Para llevar a cabo el ensayo, se utilizó un mosto industrial de 24 °Brix. Luego se incorporó 45 ml de este mosto a cada uno de los microvinificadores, abriéndolos con cuidado. El contenido en azúcar del mosto se determinó por su índice de refracción medido con un refractómetro de mano.

Adicionalmente cada microvinificador fue inoculado con 5 ml de suspensión de la levadura de interés (E₁, E₂, S) con una concentración de 1.5×10^8 cél/ml, según el tubo de concentración 0.5 de la escala de McFarland.

Luego se presionó las válvulas con las ampollas contra la boca de los Erlenmeyers a modo de cerrarlos nuevamente. Al interior de cada ampolla se le adicionó un poco de ácido sulfúrico (500 ul), con el fin de evitar contaminación. Finalmente se pesaron los microvinificadores, se registró el peso inicial y se los llevó a cuarto estufa a 24 °C aproximadamente durante 13 días.

Durante este tiempo (13 días) se realizaron determinaciones gravimétricas diarias de los microvinificadores para evaluar la disminución de peso por pérdida de CO₂ y graficar luego las curvas de cinética fermentativa³⁷.

El ensayo de cinética fermentativa se llevó a cabo en dos oportunidades, la primera desde el 25/03/23 al 06/04/23 y la segunda desde el 14/04/23 al 26/04/23. Ver la Figura 28 de los Anexos.

Cálculo del Poder Fermentativo

Transcurridos los días de incubación cuando ya no se registró más descenso de peso en los microvinificadores, se realizó la estimación del poder fermentativo (como porcentaje de alcohol) mediante la siguiente fórmula³⁷:

$$(\text{Peso inicial} - \text{Peso final}) \times 1,5 = \% \text{ alcohol producido}$$

5. Ensayo de Vinificación a Escala de Laboratorio

Una vez identificadas las cepas nativas $E_1 10^{-3}$ *Kloeckera*, $E_1 10^{-2}$ *Kloeckera*, $E_2 10^{-2}$ *Saccharomyces cerevisiae* y $E_2 10^{-3}$ *Saccharomyces cerevisiae*, se realizó un ensayo de vinificación en recipientes graduados de 500 ml con tapa, con la finalidad de realizar comparaciones entre las cepas de levaduras nativas aisladas y la cepa comercial, en términos de su temperatura, pH y grado alcohólico; para lo cual con ellas se preparó y se agregó a los recipientes tres cultivos iniciadores.

Al ensayo de vinificación (recipientes graduados de 500 ml) se agregó tres cultivos iniciadores elaborados en tubos de ensayo, para los dos primeros cultivos iniciadores se eligió a las cepas nativas $E_1 10^{-3}$ y $E_2 10^{-2}$, y el tercer cultivo iniciador fue la cepa comercial.

Para esto primero se activó las levaduras nativas $E_1 10^{-3}$ y $E_2 10^{-2}$. Se tomó una asada de levadura nativa y se lo agregó a un tubo de ensayo con caldo BHI. Seguidamente se tomó una asada de la levadura nativa en el caldo BHI y se la agregó a un tubo de ensayo con agua estéril. El mismo procedimiento de activación se realizó para la levadura $E_2 10^{-2}$ y la levadura comercial.

El ensayo consistió en producir primero tres recipientes con mosto de uva, se adicionó 3 recipientes de vidrio que se rotularon como “muestra” y su respectiva “contramuestra”, que serían una pareja por cada cepa a ensayar (E_1 , E_2 y comercial).

Durante 9 días que se dio la fermentación, se midió en la “muestra”, los parámetros de temperatura con un termómetro digital, el pH con un potenciómetro, y el grado alcohólico con un densímetro en escala Baumé. Durante el procedimiento de la fermentación (9 días), llegó a cambiar ligeramente estos tres parámetros.

CAPÍTULO IV

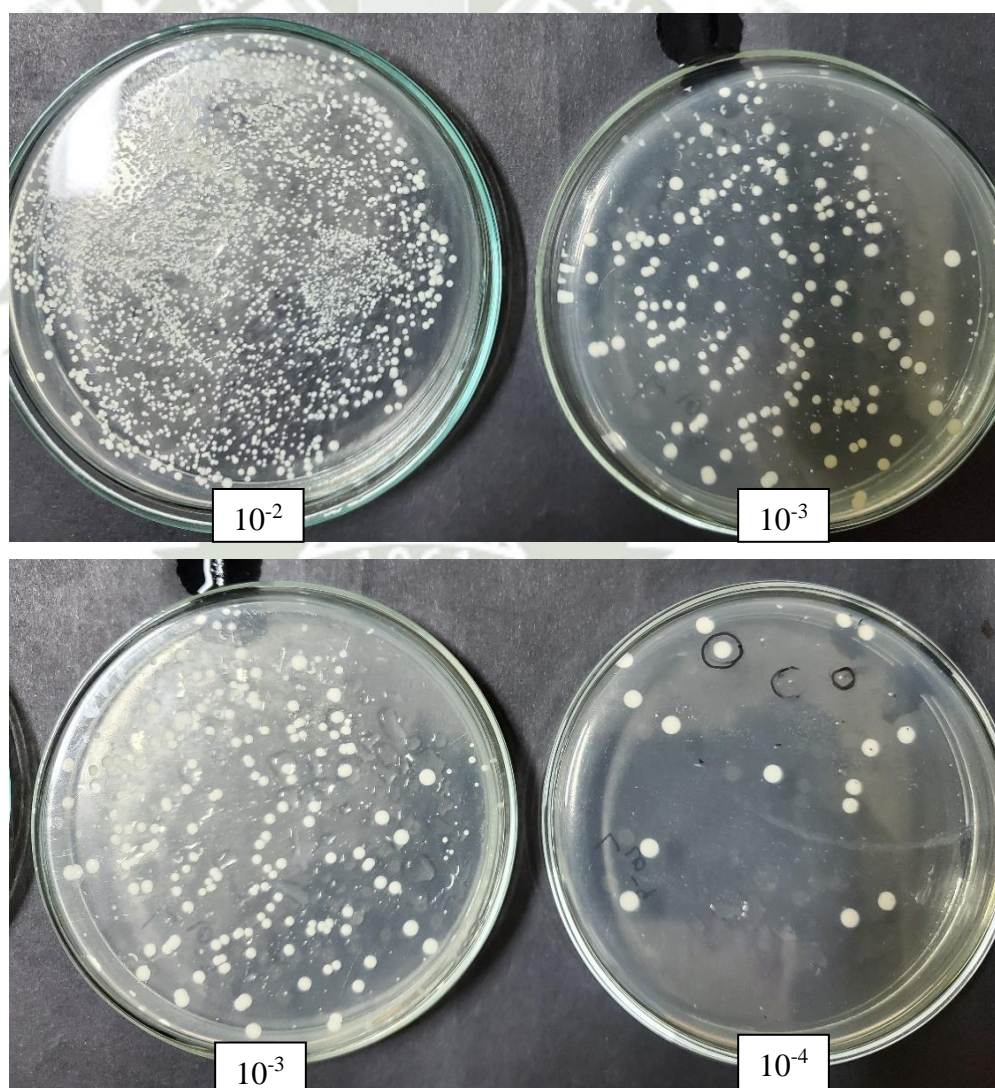
RESULTADOS Y DISCUSIONES

1. Aislamiento de Levaduras

Primera Parte

Luego de que se traspasaran 100 ul de las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} , a tres placas Petri, se denominó a las cepas obtenidas con la letra “E” por ser especie y el segundo número por ser el orden y tamaño de la colonia formada (grande/pequeña) más la dilución a la que pertenecía.

Figura 10. Diluciones en placas Petri.



A este tipo de siembra se le denominó Siembra por Diseminación con asa de Drigalsky.

Transcurrido el tiempo de incubación de las placas Petri (48 horas), se procedió primero a examinar macroscópicamente, las colonias desarrolladas.

El examen macroscópico mostró el aislamiento total de 4 colonias blanquecinas, cremosas y ovaladas, unas grandes y otras pequeñas.

Tabla 3. Aislamiento de cepas de levaduras nativas.

Colonias	Examen macroscópico	Variedad de uva	Ubicación del viñedo
$E_1 10^{-3}$	Grande, cremosa, ovalada, blanca	Negra Criolla	Sobraya
$E_1 10^{-2}$	Grande, cremosa, ovalada, blanca	Negra Criolla	Piedra Blanca
$E_2 10^{-2}$	Pequeña, cremosa, ovalada, blanca	Negra Criolla	Sobraya
$E_2 10^{-3}$	Pequeña, cremosa, ovalada, blanca	Negra Criolla	Piedra Blanca

Segunda Parte

Se realizó la conservación de las cepas $E_1 10^{-3}$, $E_1 10^{-2}$, $E_2 10^{-2}$ y $E_2 10^{-3}$ mediante repiques, a viales con medio sólido PDA inclinado mediante la técnica de agotamiento y estría. Ver la Figura 21 de los Anexos.

Los viales se mantuvieron en refrigeración a 4-5 °C.

Figura 11. Viales.



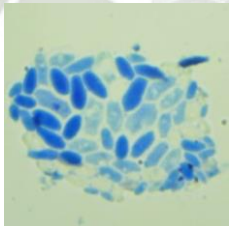
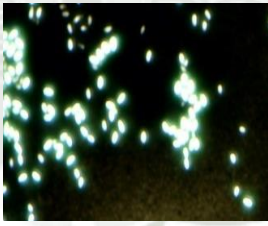


2. Identificación de Levaduras

Luego del examen macroscópico se realizó el examen microscópico con las muestras de los viales empleando pruebas morfológicas. Ver la Figura 22 de los Anexos.

En la Tabla 3 se muestran los resultados de las pruebas morfológicas.

Tabla 4. Pruebas morfológicas bajo microscopio.

Especie	Coloración azul de metileno	Coloración tinta china	Prueba del tubo germinal	Prueba de la degradación de la urea
$E_1 10^{-3}$	Sí tiene levaduras ++	Sí tiene capsula +++	Sí presenta tubo germinal	Positiva
$E_1 10^{-2}$	Sí tiene levaduras ++	Sí tiene capsula +++	Sí presenta tubo germinal	Positiva
$E_2 10^{-2}$	Sí tiene levaduras ++	Sí tiene capsula +++	Sí presenta tubo germinal	Positiva
$E_2 10^{-3}$	Sí tiene levaduras ++	Sí tiene capsula +++	Sí presenta tubo germinal	Positiva

3. Identificación de Especie de Levadura (Pruebas Bioquímicas)

Primero: Resultados de fermentación de azúcares

Se utilizó 8 azúcares: Glucosa, Fructuosa, Sucrosa, Trehalosa, D-Galactosa, L-Arabinosa, Celobiosa y Sorbitol, para tres cepas nativas E_110^{-3} , E_110^{-2} y E_210^{-2} . Al cabo de 48 horas se expresaron como (+) reacción positiva es decir cambio de color por consumo de azúcar y (-) reacción negativa es decir no hay cambio de color por no haber consumo de azúcar.

Tabla 5. Resultados de la prueba de fermentación de azúcares.

N°	Azúcares	E_110^{-3}	E_110^{-2}	E_210^{-2}
1	Glucosa	(+)	(+)	(+)
2	Fructuosa	(+)	(+)	(+)
3	Sucrosa	(-)	(-)	(-)
4	Trehalosa	(-)	(-)	(-)
5	D-Galactosa	(+)	(+)	(+)
6	L-Arabinosa	(-)	(-)	(-)
7	Celobiosa	(+)	(+)	(-)
8	Sorbitol	(-)	(-)	(-)

Segundo: Resultados del sistema API 20 C AUX de Biomérieux

Las levaduras se identificaron hasta género y especie por sus perfiles metabólicos con el sistema API Web.

Figura 12. Identificación de género y especie de la levadura nativa *Kloeckera* E₁10⁻³.

Kloeckera E₁10⁻³

Universidad Católica de Santa María - Arequipa **APIWEB™**

API 20 C AUX V5.0 [Impresora](#) [Exportar](#) [Nuevo test](#) [Modificar](#)

REFERENCIA: FECHA: 06/06/23
COMENTARIO:

PERFIL DUDOSO

Galería	API 20 C AUX V5.0
Perfil	2 1 4 0 2 0 0
Nota	

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
Kloeckera spp	99.9	0.5	GAL	0%		

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra							
Candida magnoliae	0.1	0.0	GAL	10%	CEL	0%	SAC	97%	RAF	75%

Pruebas complementarias(s)	37°C	TIAMINA		
Kloeckera apis	+	-		
Kloeckera apiculata	-	v		
Kloeckera japonica	-	+		

09:34
6/06/2023

Para la Figura 12, se observó el Taxón Significativo, resultando un 99.9% de Similitud para la especie *Kloeckera spp*.

Figura 13. Identificación de género y especie de la levadura nativa *Kloeckera* E₁10⁻².

Kloeckera E₁10⁻²

Universidad Católica de Santa María - Arequipa **APIWEB™**

API 20 C AUX V5.0 [Impresora](#) [Exportar](#) [Nuevo test](#) [Modificar](#)

REFERENCIA: FECHA: 06/06/23
COMENTARIO:

PERFIL DUDOSO

Galería	API 20 C AUX V5.0
Perfil	2 1 4 0 2 0 0
Nota	

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
Kloeckera spp	99.9	0.5	GAL	0%		

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra							
Candida magnoliae	0.1	0.0	GAL	10%	CEL	0%	SAC	97%	RAF	75%

Pruebas complementarias(s)	37°C	TIAMINA		
Kloeckera apis	+	-		
Kloeckera apiculata	-	v		
Kloeckera japonica	-	+		

09:35
6/06/2023

Para la Figura 13, se observó el Taxón Significativo, resultando un 99.9% de Similitud para la especie *Kloeckera spp*.

Figura 14. Identificación de género y especie de la levadura nativa *Saccharomyces cerevisiae* E₂10⁻².

Para la Figura 14, se observó el Taxón Significativo, resultando un 81.2% de Similitud para la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabla 6. Resultados de la composición de la galería API 20 C AUX.

N°	Azúcares	E ₁ 10 ⁻³ Kloeckera	E ₁ 10 ⁻² Kloeckera	E ₂ 10 ⁻² Saccharomyces cerevisiae
1	D-GLUcosa	(+)	(+)	(+)
2	GLYcerol	(-)	(-)	(-)
3	2-ceto-Gluconato cálcico	(+)	(+)	(-)
4	L-ARAbinosa	(-)	(-)	(-)
5	D-XYLosa	(-)	(-)	(-)
6	ADOnitol	(-)	(-)	(-)
7	XyLiTol	(-)	(-)	(-)
8	D-GALactosa	(+)	(+)	(+)
9	INOsitol	(-)	(-)	(-)
10	D-SORbitol	(-)	(-)	(-)

11	Metil- α D-Glucopiranosida	(-)	(-)	(-)
12	N-Acetil-Glucosamina	(-)	(-)	(-)
13	D-CELLobiosa	(+)	(+)	(-)
14	D-LACtosa	(-)	(-)	(-)
15	D-MALtosa	(-)	(-)	(-)
16	D-SACarosa	(-)	(-)	(+)
17	D-TREhalosa	(-)	(-)	(-)
18	D-MeLeZitosa	(-)	(-)	(-)
19	D-RAFinosa	(-)	(-)	(+)

En las Tablas 6 y 7, el software Apiweb es el que arroja los resultados respectivos de identificación de Especie de Levadura.

Tabla 7. Nombre de las cepas nativas identificadas según el sistema API 20 C AUX.

Identificación de género y especie	Dilución	Ubicación del viñedo	Características macroscópicas
<i>Kloeckera</i>	$E_1 10^{-3}$	Sobraya	Grande, cremosa, ovalada
<i>Kloeckera</i>	$E_1 10^{-2}$	Piedra Blanca	Grande, cremosa, ovalada
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$E_2 10^{-2}$	Sobraya	Pequeña, cremosa, ovalada
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$E_2 10^{-3}$	Piedra Blanca	Pequeña, cremosa, ovalada

4. Ensayo de Cinética y Poder Fermentativo con Levaduras Nativas

Una vez identificadas, se seleccionaron dos cepas nativas (*Kloeckera* E₁10⁻³ y *Saccharomyces cerevisiae* E₂10⁻²) y una cepa comercial (*Saccharomyces bayanus*) para realizar los ensayos de cinética y poder fermentativo.

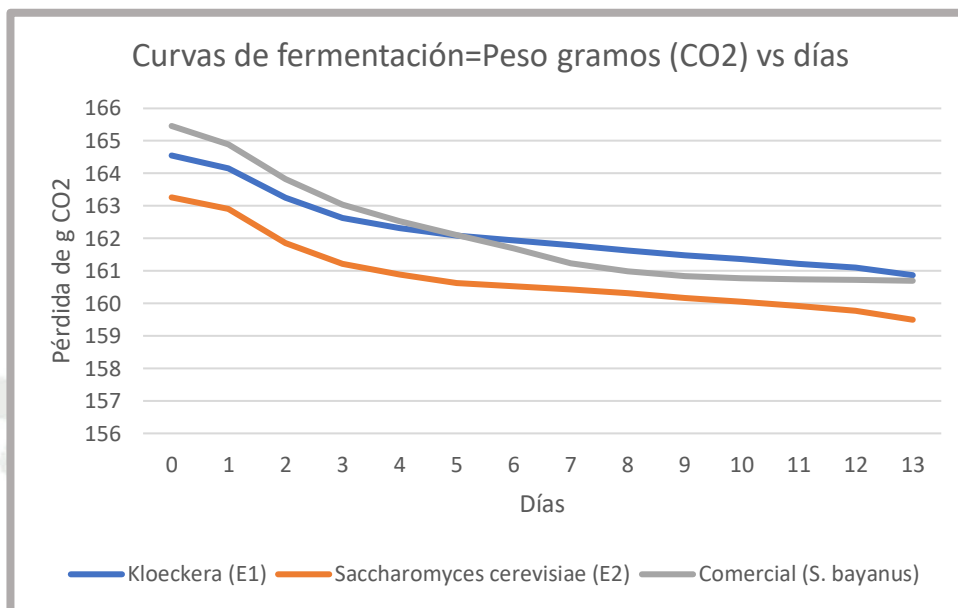
En el siguiente párrafo se observa la nomenclatura empleada para cada cepa aislada, en la cual se identificó con la letra “E” por ser especie y el segundo número por ser el orden y tamaño (grande/pequeña) en que fue aislada. Adicionalmente se denominó con la letra “S” a la levadura comercial. En adelante se va a denominar a las cepas E₁, E₂ y S con sus respectivos nombres de identificación.

Orden de las cepas nativas con sus respectivos microvinificadores:

Identificación	Origen de la cepa	Microvinificador
<i>Kloeckera</i> (E ₁)	Negra Criolla	Microvinificador del 1 al 7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (E ₂)	Negra Criolla	Microvinificador del 8 al 14
<i>Saccharomyces bayanus</i> (S)	Levadura seca activa comercial	Microvinificador del 15 al 21

Se estudiaron por duplicado las cinéticas fermentativas y el poder fermentativo de cada una de las cepas aisladas hasta los trece días de fermentación, en 21 microvinificadores. Para ello se evaluaron y graficaron las variaciones de peso (gr.) diarias frente al tiempo (días) transcurridos para hallar por diferencia la disminución del CO₂.

Figura 15. Primer ensayo (25/03/2023) de Cinética fermentativa de las cepas nativas *Kloeckera* y *Saccharomyces cerevisiae* versus cepa comercial *Saccharomyces bayanus*.



A partir de la Figura 15 (1° Ensayo), se muestra las variaciones de peso diarias (g) frente a 13 días de fermentación, obteniéndose la Tabla 8 con los datos de cinética fermentativa para las dos cepas nativas y la cepa comercial.

Tabla 8. Datos de Cinética Fermentativa de la Figura 15.

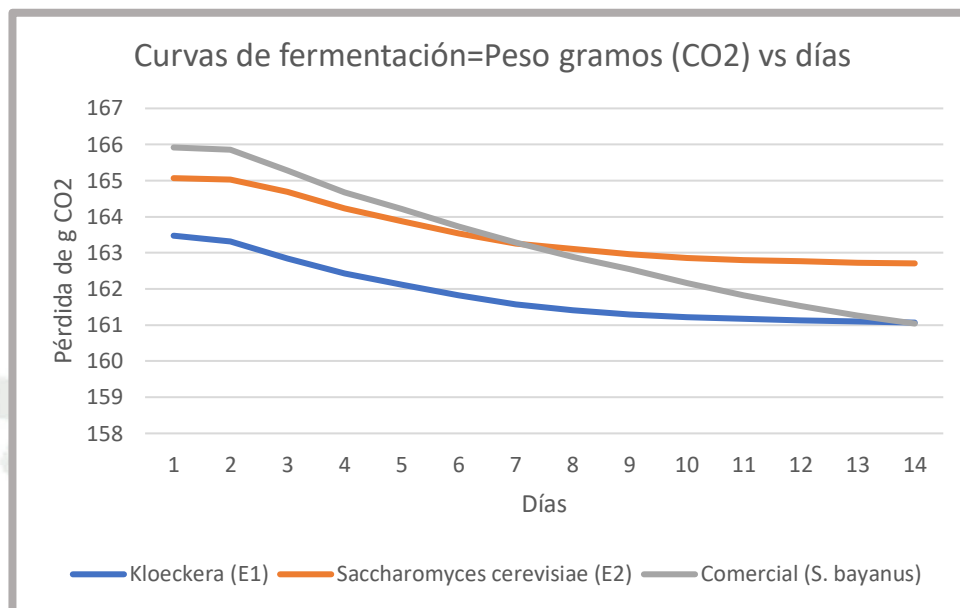
Día	<i>Kloeckera</i> (E1) (gCO ₂)	<i>S. cerevisiae</i> (E2) (gCO ₂)	Comercial (S) (gCO ₂)
0	164.551	163.262	165.459
1	164.160	162.910	164.896
2	163.251	161.850	163.822
3	162.626	161.214	163.033
4	162.312	160.881	162.531
5	162.080	160.621	162.107
6	161.931	160.520	161.688
7	161.788	160.423	161.235
8	161.630	160.316	160.983
9	161.487	160.170	160.832
10	161.370	160.051	160.773
11	161.221	159.921	160.744
12	161.106	159.773	160.717
13	160.868	159.496	160.696

La Tabla 9 muestra los Valores de Poder Fermentativo del 1° Ensayo, obtenidos aplicando la fórmula de Cálculo del Poder Fermentativo (Ver Página 50) empleando los Datos de Cinética Fermentativa de la Tabla 8.

Tabla 9. Valores de Poder fermentativo de la Figura 15.

Días	<i>Kloeckera</i> (E ₁)	<i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i> (E ₂)	Comercial (<i>S. bayanus</i>)
1	0.587	0.528	0.844
2	1.951	2.119	2.456
3	2.888	3.072	3.640
4	3.359	3.571	4.393
5	3.707	3.962	5.028
6	3.930	4.113	5.656
7	4.146	4.258	6.336
8	4.382	4.418	6.715
9	4.597	4.638	6.941
10	4.772	4.816	7.030
11	4.996	5.012	7.073
12	5.168	5.234	7.114
13	5.525	5.648	7.145

Figura 16. Segundo ensayo (14/04/2023) de Cinética fermentativa de las cepas nativas *Kloeckera* y *Saccharomyces cerevisiae* versus cepa comercial *Saccharomyces bayanus*.



A partir de la Figura 16 (2° Ensayo), se muestra las variaciones de peso diarias (g) frente a 13 días de fermentación, obteniéndose la Tabla 10 con los datos de cinética fermentativa para las dos cepas nativas y la cepa comercial.

Tabla 10. Datos de Cinética Fermentativa de la Figura 16.

Día	<i>Kloeckera</i> (E1) (gCO ₂)	<i>S. cerevisiae</i> (E2) (gCO ₂)	Comercial (s) (gCO ₂)
0	163.475	165.069	165.919
1	163.316	165.035	165.855
2	162.840	164.688	165.283
3	162.425	164.225	164.679
4	162.122	163.873	164.219
5	161.820	163.537	163.732
6	161.572	163.255	163.281
7	161.404	163.114	162.894
8	161.298	162.954	162.547
9	161.213	162.860	162.170
10	161.166	162.803	161.823
11	161.135	162.765	161.527
12	161.106	162.730	161.262
13	161.068	162.708	161.041

La Tabla 11 muestra los Valores de Poder Fermentativo del 2° Ensayo, obtenidos aplicando la fórmula de Cálculo del Poder Fermentativo (Ver Página 50) empleando los Datos de Cinética Fermentativa de la Tabla 10.

Tabla 11. Valores de Poder Fermentativo de la Figura 16.

Días	<i>Kloeckera</i> (E ₁)	<i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i> (E ₂)	Comercial (<i>S. bayanus</i>)
1	0.239	0.051	0.096
2	0.953	0.571	0.953
3	1.575	1.266	1.859
4	2.03	1.793	2.549
5	2.483	2.298	3.279
6	2.855	2.721	3.956
7	3.107	2.932	4.537
8	3.266	3.172	5.057
9	3.394	3.313	5.623
10	3.463	3.399	6.144
11	3.511	3.456	6.588
12	3.554	3.508	6.984
13	3.611	3.542	7.316

Análisis de la Figura 15 y 16

La comprobación de las pruebas de hipótesis estadísticas de los ensayos de cinética y poder fermentativo en el programa SPSS en la presente tesis, se elaboraron en base a las curvas de fermentación de la **Figura 15 y 16**, las cuales se desarrollaron en dos momentos, el primero parte desde el 25/03/23 al 06/04/23 y el segundo parte del 14/04/23 al 26/04/23. Las mediciones de las cepas nativas se comparan con las mediciones de la cepa comercial, por considerarse un mejor referente o estándar con el objetivo de hallar la cepa de mejor rendimiento con mayor parecido a la cepa comercial. En la Figura 15 y 16, las cepas nativas seleccionadas consiguen cinéticas fermentativas bastante regulares. Sin embargo, se pueden detectar ligeras diferencias en cuanto a su velocidad de fermentación, sobretodo hay disminución en las curvas del segundo gráfico.

En la Figura 15, ambas cepas *Kloeckera* y *Saccharomyces cerevisiae* (cepas nativas) presentan la misma particularidad, es decir, presentan una **correcta cinética fermentativa al presentar una fase de inicio rápida y una pronta estabilización en la fase de latencia**. De acuerdo a la tesis denominada “Estudio de la tolerancia a elevadas concentraciones de azúcar de *Saccharomyces cerevisiae* vónicas”, según Oteruelo (39), expone que: “Las cinéticas fermentativas elaboradas por la pérdida diaria de CO₂ muestran a distintos niveles de concentraciones de azúcares, variaciones en el tiempo dando lugar a distintas curvas de fermentación. Con esta técnica podremos realizar un seguimiento de todas las levaduras agrupando aquellas que mantengan una correcta cinética fermentativa, es decir se contempla en ellas un inicio rápido con una fase de latencia y una pronta estabilización para sugerirlas como posibles candidatas para su posterior elección”³⁹. Este concepto sustenta que en el presente trabajo la hipótesis promueva comparar los valores de pérdida de CO₂ de las cepas nativas con la cepa comercial a fin de saber si las cepas nativas igualan o son tan eficaces en su cinética fermentativa como la cepa comercial.

En segundo término, aplicando la fórmula del Poder fermentativo a los datos de las mediciones de la pérdida de CO₂ del primer y segundo ensayo de cinética fermentativa se obtuvieron las Tablas 8 y 10: Valores de Poder fermentativo de la Figura 15 y 16 respectivamente, destacando en la Tabla 8, el poder fermentativo de la cepa nativa

Saccharomyces cerevisiae E₂ (Figura 15) cuya graduación alcohólica es muy semejante a la de la cepa comercial, es decir, destaca la Figura 15 porque se observa un más alto rendimiento de alcohol producido.

Asimismo, según Bernardi (38), expone que: “Una correcta cinética de fermentación garantiza la ausencia de desprendimientos calóricos bruscos, en consecuencia, evitará elevaciones excesivas de temperatura que puedan provocar pérdidas aromáticas y disminución en la calidad del vino e incluso paradas fermentativas por muerte térmica de las levaduras. Además, permite reducir gastos innecesarios de energía en función de la refrigeración y garantizar que la cepa pueda finalizar correctamente la fermentación sin que en el vino permanezcan azúcares residuales”³⁸. En el presente trabajo las Tablas 7 y 9 contienen los datos obtenidos de cinética fermentativa que se reflejan en las curvas de fermentación de las Figuras 15 y 16, estos datos demuestran que se realizó una correcta cinética de fermentación.



Resultados estadísticos aplicando el programa SPSS

Ensayo de Cinética fermentativa y Poder fermentativo para la Figura 15

4.1. Cinética fermentativa para la cepa nativa *Kloeckera* vs *S. bayanus* comercial

Tabla 12. Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la cepa nativa *Kloeckera* vs *Saccharomyces bayanus* comercial.

	Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Perdida de CO ₂ de la cepa E1 vs <i>Saccharomyces</i>	,881	28	,004

Interpretación:

Al observarse en la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, se obtiene un valor de P (0,004) menor a 0,05, lo que nos indica que nuestros datos no tienen una distribución normal por lo que se empleará una **prueba de estadística no paramétrica**.

PLANTEAMIENTO DE LA HIPOTESIS

$H_0: \mu_{CO_2 \text{ Saccha}} = \mu_{CO_2 \text{ E1}} ; P > 0,05$

$H_i: \mu_{CO_2 \text{ Saccha}} \neq \mu_{CO_2 \text{ E1}} ; P < 0,05$

Tabla 13. Resumen de contrastes de hipótesis para la cepa nativa *Kloeckera* vs *Saccharomyces bayanus* comercial.

Resumen de contrastes de hipótesis				
	Hipótesis nula	Prueba	Sig. ^{a,b}	Decisión
1	La distribución de Perdida de CO ₂ de la CepaE1 vs <i>Saccharomyces</i> (cepa patrón) es la misma entre categorías de cepaE1vscepapatron.	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,427 ^c	Conserve la hipótesis nula.
a. El nivel de significación es de ,050.				
b. Se muestra la significancia asintótica.				
c. Se muestra la significación exacta para esta prueba.				

Interpretación:

Cuando se comparó los valores de pérdida de CO₂ producidos por la cepa *Kloeckera* y la cepa de *Saccharomyces bayanus* con el estadístico de la prueba de Mann-Whitney, se obtiene un valor P = 0,427, el mismo que es mayor a 0,05, por lo que **aceptamos la hipótesis nula**, lo que quiere decir que **no existe diferencias significativas** entre los valores de pérdida de CO₂ obtenidos por la cepa *Kloeckera* y la cepa comercial. La cepa *Kloeckera* iguala o es tan eficaz en su cinética fermentativa que la cepa comercial.

4.2. Cinética fermentativa para la cepa nativa *S. cerevisiae* vs *S. bayanus* comercial

Tabla 14. Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la cepa nativa *Saccharomyces cerevisiae* vs *Saccharomyces bayanus* comercial.

	Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Perdida de CO ₂ de la cepa E2 vs <i>Saccharomyces</i>	,886	28	,005

Interpretación:

Según la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, se obtiene un valor de P (0,005) menor a 0,05, lo que nos indica que nuestros datos no tienen una distribución normal por lo que se empleará una **prueba de estadística no paramétrica**.

PLANTEAMIENTO DE LA HIPOTESIS

$$H_0: \mu_{CO_2 \text{ Saccha}} = \mu_{CO_2 \text{ E2}} ; P > 0,05$$

$$H_i: \mu_{CO_2 \text{ Saccha}} \neq \mu_{CO_2 \text{ E2}} ; P < 0,05$$

Tabla 15. Resumen de contrastes de hipótesis para la cepa nativa *Saccharomyces cerevisiae* vs *Saccharomyces bayanus* comercial.

Resumen de contrastes de hipótesis				
	Hipótesis nula	Prueba	Sig. ^{a,b}	Decisión
1	La distribución de CO ₂ de la cepa E2 vs patron es la misma entre categorías de cepa E2 vs cepa patron.	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,007 ^c	Rechace la hipótesis nula.
a. El nivel de significación es de ,050.				
b. Se muestra la significancia asintótica.				
c. Se muestra la significación exacta para esta prueba.				

Interpretación:

Según la prueba de Mann-Whitney, cuando se comparó los valores de pérdida de CO₂ de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* vs la cepa *Saccharomyces bayanus*, el valor de P = 0,007, es menor que 0,05, por lo que rechazamos la hipótesis nula y **aceptamos la hipótesis alternativa**, lo que quiere decir que entre los valores de pérdida de CO₂ de la cepa comercial y la cepa *Saccharomyces cerevisiae*, **existen diferencias significativas**. La cinética fermentativa de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* no supera a la de la cepa comercial.

4.3. Poder Fermentativo para la cepa nativa *Kloeckera* vs *S. bayanus* comercial

Tabla 16. Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la cepa nativa *Kloeckera* vs *Saccharomyces bayanus* comercial.

	Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
% alcohol E1 vs <i>Saccharomyces</i>	,946	26	,185

Interpretación:

Al haberse obtenido en la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk el valor de $P = 0,185$, entonces decimos que los datos de porcentajes de alcohol tienen una distribución simétrica por lo que se empleará **una prueba estadística paramétrica.**

PLANTEAMIENTO DE LA HIPOTESIS

$$H_0: \mu_{\%alc\ Saccha} = \mu_{\%alc\ E1}; P > 0,05$$

$$H_1: \mu_{\%alc\ Saccha} \neq \mu_{\%alc\ E1}; P < 0,05$$

Tabla 17. Resumen de contrastes de hipótesis para la cepa nativa *Kloeckera* vs *Saccharomyces bayanus* comercial.

Estadísticas de grupo					
	CEPAALCOHOE1vsSAC CHA	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
% alcohol cepa E1 vs <i>Saccharomyces</i>	CEPAE1	13	3,84677	1,386885	,384653
	CEPA <i>Saccharomyces</i>	13	5,41315	2,044428	,567022

Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
% alcohol cepa E1 vs <i>Saccharomyces</i>	Se asumen varianzas iguales	2,417	,133	-2,286	24	,031	-1,566385	,685180	-2,980527	-,152242
	No se asumen varianzas iguales			-2,286	21,114	,033	-1,566385	,685180	-2,990825	-,141944

Interpretación:

Al haberse obtenido un valor de $P = 0,031$, entonces rechazamos la hipótesis nula por lo que **aceptamos la hipótesis alternativa** que nos dice que entre los valores de porcentajes de alcohol producidos por la cepa *Kloeckera* son diferentes (**o existe diferencias significativas**) a los valores de porcentajes de alcohol producidos por la cepa *Saccharomyces bayanus*. El poder fermentativo de la cepa comercial es mayor.

4.4. Poder Fermentativo para la cepa nativa *S. cerevisiae* vs *S. bayanus comercial*

Tabla 18. Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la cepa nativa *Saccharomyces cerevisiae* vs *Saccharomyces bayanus comercial*.

	Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
% alcohol E2 vs <i>Saccharomyces</i>	,942	26	,149

Interpretación:

Al haberse obtenido en la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk el valor de $P = 0,149$, entonces decimos que los valores de porcentajes de alcohol tienen una distribución simétrica por lo que se empleará **una prueba estadística paramétrica**.

PLANTEAMIENTO DE LA HIPOTESIS

$$H_0: \mu_{\%alc Saccha} = \mu_{\%alc E2}; P > 0,05$$

$$H_1: \mu_{\%alc Saccha} \neq \mu_{\%alc E2}; P < 0,05$$

Tabla 19. Resumen de contrastes de hipótesis para la cepa nativa *Saccharomyces cerevisiae* vs *Saccharomyces bayanus comercial*.

Estadísticas de grupo					
	CEPAALCOHE2vsSACCHA	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
% alcohol E2 vs <i>Saccharomyces</i>	CEPAE2	13	3,95300	1,390463	,385645
	CEPA <i>Saccharomyces</i>	13	5,41315	2,044428	,567022

Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
% alcohol E2 vs <i>Saccharomyces</i>	Se asumen varianzas iguales	2,583	,121	-2,129	24	,044	1,460154	,685738	2,875447	-,044860
	No se asumen varianzas iguales			-2,129	21,145	,045	1,460154	,685738	2,885629	-,034679

Interpretación:

Visto el valor de $P = 0,044$, entonces rechazamos la hipótesis nula por lo que **aceptamos la hipótesis alternativa** que nos dice que entre los valores de porcentajes de alcohol producidos por la cepa *Saccharomyces cerevisiae* versus la cepa comercial **existe diferencias significativas entre sus valores**. La cepa *Saccharomyces cerevisiae* presenta diferente poder fermentativo que la cepa comercial.

Ensayo de Cinética fermentativa y Poder fermentativo para la Figura 16

4.5. Cinética fermentativa para la cepa nativa *Kloeckera* vs *S. bayanus comercial*

Tabla 20. Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la cepa nativa *Kloeckera* vs *Saccharomyces bayanus comercial*.

	Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Perdida de CO ₂ de la cepa E1 vs <i>Saccharomyces</i>	,873	28	,003

Interpretación:

Visto el valor P(0,003) de la prueba de Shapiro-Wilk, que es menor a 0,05 se dice que los valores de pérdida de CO₂ no tienen una distribución normal por lo que se utilizará una **prueba estadística no paramétrica**.

PLANTEAMIENTO DE LA HIPOTESIS

$$H_0: \mu_{CO_2 \text{ Saccha}} = \mu_{CO_2 \text{ E1}} ; P > 0,05$$

$$H_i: \mu_{CO_2 \text{ Saccha}} \neq \mu_{CO_2 \text{ E1}} ; P < 0,05$$

Tabla 21. Resumen de contrastes de hipótesis para la cepa nativa *Kloeckera* vs *Saccharomyces bayanus comercial*.

Resumen de contrastes de hipótesis				
	Hipótesis nula	Prueba	Sig. ^{a,b}	Decisión
1	La distribución de Perdida de CO ₂ E1 vs <i>Saccharomyces</i> es la misma entre categorías de Cepa E1 y <i>Saccharomyces</i> .	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,016 ^c	Rechace la hipótesis nula.
a. El nivel de significación es de ,050.				
b. Se muestra la significancia asintótica.				
c. Se muestra la significación exacta para esta prueba.				

Interpretación:

Cuando se comparó los valores de pérdida de CO₂ producidos por la cepa *Kloeckera* y la cepa *Saccharomyces bayanus* con el estadístico de la prueba de Mann-Whitney, se obtiene un valor P = 0,016, el mismo que es menor a 0,05, por lo que **rechazamos la hipótesis nula**, lo que quiere decir que **existe diferencias significativas** entre los valores de pérdida de CO₂ obtenidos de la cepa *Kloeckera* y la cepa comercial.

4.6. Cinética fermentativa para la cepa nativa *S. cerevisiae* vs *S. bayanus comercial*

Tabla 22. Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la cepa nativa *Kloeckera* vs *Saccharomyces bayanus comercial*.

	Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
PerdidaCO2 de la cepa E2 vs <i>Saccharomyces</i>	,969	28	,548

Interpretación:

Según la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, se obtiene un valor de P (0,548) mayor a 0,05, lo que nos indica que nuestros datos tienen una distribución normal por lo que se empleará una **prueba de estadística paramétrica**.

PLANTEAMIENTO DE LA HIPOTESIS

$$H_0: \mu_{CO_2 \text{ Saccha}} = \mu_{CO_2 \text{ E2}} ; P > 0,05$$

$$H_i: \mu_{CO_2 \text{ Saccha}} \neq \mu_{CO_2 \text{ E2}} ; P < 0,05$$

Tabla 23. Resumen de contrastes de hipótesis para la cepa nativa *Kloeckera* vs *Saccharomyces bayanus comercial*.

Estadísticas de grupo					
	Cepa E2 y <i>Saccharomyces</i>	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
PerdidaCO2 E2 vs <i>Saccharomyces</i>	cepaE2	14	163,543822571	,8784344322	,2347714773
	<i>Saccharomyces</i>	14	163,302308493	1,6834148395	,4499115407

Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
PerdidaCO2 E2 vs <i>Saccharomyces</i>	Se asumen varianzas iguales	7,217	,012	,476	26	,638	,2415140786	,5074820597	-,8016302348	1,2846583919
	No se asumen varianzas iguales			,476	19,591	,639	,2415140786	,5074820597	-,8184937202	1,3015218774

Interpretación:

Al haberse obtenido un valor de P (0,638) el cual es mayor de 0,05; entonces **aceptamos la hipótesis nula** que nos dice que **no existe diferencias significativas** entre los valores de pérdida de CO₂ de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* versus la cepa comercial.

4.7. Poder Fermentativo para la cepa nativa *Kloeckera* vs *S. bayanus comercial*

Tabla 24. Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la cepa nativa *Kloeckera* vs *Saccharomyces bayanus comercial*.

	Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
% alcohol E1 vs <i>Saccharomyces</i>	,961	26	,409

Interpretación:

Al haberse obtenido en la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk el valor de $P = 0,409$, el cual es mayor a $0,05$, entonces decimos que los valores de porcentajes de alcohol tienen una distribución simétrica por lo que se empleará **una prueba estadística paramétrica**.

PLANTEAMIENTO DE LA HIPOTESIS

$$H_0: \mu_{\%alc\ Saccha} = \mu_{\%alc\ E1}; P > 0,05$$

$$H_1: \mu_{\%alc\ Saccha} \neq \mu_{\%alc\ E1}; P < 0,05$$

Tabla 25. Resumen de contrastes de hipótesis para la cepa nativa *Kloeckera* vs *Saccharomyces bayanus comercial*.

Estadísticas de grupo					
	CEPAALCOHE1ySACCHA	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
% alcohol E1 vs <i>Saccharomyces</i>	CEPAE1	13	2,61854	1,102069	,305659
	CEPA <i>Saccharomyces</i>	13	4,22623	2,350629	,651947

Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
% alcohol E1 vs <i>Saccharomyces</i>	Se asumen varianzas iguales	8,207	,009	-2,233	24	,035	-	,720043	-	-,121596
	No se asumen varianzas iguales			-2,233	17,03	,039	-	,720043	-	-,088753
					2		1,607692		3,126632	

Interpretación:

Al haberse obtenido un valor de $P = 0,035$, entonces rechazamos la hipótesis nula por lo que **aceptamos la hipótesis alternativa** que nos dice que entre los valores de porcentaje de alcohol producidos por la cepa *Kloeckera* **existe diferencias significativas** con respecto a los valores de porcentajes de alcohol producidos por la cepa *Saccharomyces bayanus*.

4.8. Poder Fermentativo para la cepa nativa *S. cerevisiae* vs *S. bayanus comercial*

Tabla 26. Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la cepa nativa *Saccharomyces cerevisiae* vs *Saccharomyces bayanus comercial*.

	Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
% alcohol de la cepa E2 vs <i>Saccharomyces</i>	,960	26	,389

Interpretación:

Como se tiene según la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk el valor de $P = 0,389$, entonces decimos que los valores de porcentajes de alcohol tienen una distribución simétrica ya que el valor es mayor a 0,05, por lo que se empleará una **prueba estadística paramétrica**.

PLANTEAMIENTO DE LA HIPOTESIS

$H_0: \mu_{\%alc Saccha} = \mu_{\%alc E2} ; P > 0,05$

$H_1: \mu_{\%alc Saccha} \neq \mu_{\%alc E2} ; P < 0,05$

Tabla 27. Resumen de contrastes de hipótesis para la cepa nativa *Saccharomyces cerevisiae* vs *Saccharomyces bayanus comercial*.

Estadísticas de grupo					
	CEPAALCOHE2ySACCHA	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
% alcohol E2 vs <i>Saccharomyces</i>	CEPAE2	13	2,46323	1,188012	,329495
	CEPA <i>Saccharomyces</i>	13	4,22623	2,350629	,651947

Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
% alcohol E2 vs <i>Saccharomyces</i>	Se asumen varianzas iguales	6,869	,015	-2,413	24	,024	-1,763000	,730481	-3,270638	-,255362
	No se asumen varianzas iguales			-2,413	17,75	,027	-1,763000	,730481	-3,299203	-,226797

Interpretación:

Visto el valor de $P = 0,024$, entonces rechazamos la hipótesis nula por lo que **aceptamos la hipótesis alternativa** que nos dice que entre los valores de porcentajes de alcohol producidos por la cepa *Saccharomyces cerevisiae* versus la cepa *Saccharomyces bayanus* (cepa comercial) **existe diferencias significativas** entre sus valores.

5. Resultados del Ensayo de Vinificación a Escala de Laboratorio

Tabla 28. Tabla promedio del Parámetro de Temperatura.

<i>Kloeckera</i> (E ₁)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (E ₂)	Comercial (<i>S. bayanus</i>)
25,7	25,6	26,1
25,1	25,1	25,1
23,7	23,9	23,9
24,7	24,7	24,7
25,4	25,3	25,4
24,9	25,1	25,3
23,1	23,4	24,0
24,9	25,1	25,4
24,7	25,2	25,1
24,69	24,82	25

Resultados registrados con un termómetro digital durante 9 días de fermentación.

Tabla 29. Tabla promedio del Parámetro de pH.

<i>Kloeckera</i> (E ₁)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (E ₂)	Comercial (<i>S. bayanus</i>)
3,5	3,62	3,55
3,47	3,61	3,54
3,47	3,63	3,56
3,46	3,62	3,55
3,46	3,6	3,54
3,43	3,57	3,43
3,47	3,6	3,41
3,46	3,48	3,35
3,47	3,41	3,36
3,47	3,57	3,48

Resultados registrados con un potenciómetro durante 9 días de fermentación.

Tabla 30. Tabla promedio del Parámetro de Grado Alcohólico.

<i>Kloeckera</i> (E ₁)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (E ₂)	Comercial (<i>S. bayanus</i>)
13	14	13
13	14	13
13	14	13
13	14	13
13	13	13
13	13	13
13	13	11
13	12	10
13	11	7
13	13,11	11,78

Resultados registrados con un densímetro en escala Baumé durante 9 días de fermentación.

5.1. Evaluación de Temperatura para la cepa nativa *Kloeckera* vs *S. bayanus* comercial

Tabla 31. Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la cepa nativa *Kloeckera* vs *Saccharomyces bayanus* comercial.

	Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
T° de la cepa E1 y T° de <i>Saccharomyces</i>	,939	18	,279

Interpretación:

Como se puede observar en la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, se obtienen un valor de P (0,279) que es mayor a 0,05, entonces decimos que nuestros datos tienen una distribución normal por lo que se empleará una **prueba de estadística paramétrica**.

PLANTEAMIENTO DE LA HIPOTESIS

H₀: $\mu_{\text{temp Saccha}} = \mu_{\text{temp E1}} ; P > 0,05$

H₁: $\mu_{\text{temp Saccha}} \neq \mu_{\text{temp E1}} ; P < 0,05$

Tabla 32. Resumen de contrastes de hipótesis para la cepa nativa *Kloeckera* vs *Saccharomyces bayanus* comercial.

Estadísticas de grupo					
	CEPA E1 vs <i>Saccharomyces</i>	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
T° de la cepa E1 y T° de <i>Saccharomyces</i>	cepa E1	9	24,6889	,81309	,27103
	<i>Saccharomyces</i>	9	25,0000	,70178	,23393

Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
T° de la cepa E1 y T° de <i>Saccharomyces</i>	Se asumen varianzas iguales	,030	,864	-,869	16	,398	-,31111	,35802	-1,07008	,44786
	No se asumen varianzas iguales			-,869	15,665	,398	-,31111	,35802	-1,07140	,44918

Interpretación:

Visto el valor de P = 0,398, el cual es mayor de 0,05, entonces **asumimos la hipótesis nula**, es decir que al comparar los valores de temperatura generada durante el proceso de vinificación de la cepa *Kloeckera* con la cepa *Saccharomyces bayanus*, podemos ver que **no existe diferencias significativas** entre los valores por lo que asumimos que las condiciones de temperatura son las mismas.

5.2. Evaluación de Temperatura para la cepa nativa *S. cerevisiae* vs *S. bayanus comercial*

Tabla 33. Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la cepa nativa *Saccharomyces cerevisiae* vs *Saccharomyces bayanus comercial*.

	Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
T° de la cepa E2 y T° de <i>Saccharomyces</i>	,901	18	,059

Interpretación:

Como se tiene según la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk el valor de $P = 0,059$, entonces decimos que los valores de temperatura evaluados tienen una distribución simétrica ya que el valor es mayor a 0,05, por lo que se empleará una **prueba estadística paramétrica**.

PLANTEAMIENTO DE LA HIPOTESIS

$H_0: \mu_{temp\ Saccha} = \mu_{temp\ E2}; P > 0,05$

$H_1: \mu_{temp\ Saccha} \neq \mu_{temp\ E2}; P < 0,05$

Tabla 34. Resumen de contrastes de hipótesis para la cepa nativa *Saccharomyces cerevisiae* vs *Saccharomyces bayanus comercial*.

Estadísticas de grupo					
	CEPAE2vsSaccharomyces	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
T° de la cepa E2 y T° de <i>Saccharomyces</i>	cepa E2	9	24,8222	,71550	,23850
	<i>Saccharomyces</i>	9	25,0000	,70178	,23393

Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
T° de la cepa E2 y T° de <i>Saccharomyces</i>	Se asumen varianzas iguales	,006	,941	-,532	16	,602	-,17778	,33407	-,88598	,53043
	No se asumen varianzas iguales			-,532	15,994	,602	-,17778	,33407	-,88600	,53045

Interpretación:

Considerando que el valor de $P = 0,602$ es que se **asume la hipótesis nula**, es decir que al comparar los valores de temperatura durante el proceso de vinificación de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* con la cepa *Saccharomyces bayanus*, podemos ver que **no existe diferencias significativas** entre los valores por lo que asumimos que las condiciones de temperatura son las mismas.

5.3. pH para la cepa nativa *Kloeckera* vs *S. bayanus* comercial

Tabla 35. Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la cepa nativa *Kloeckera* vs *Saccharomyces bayanus* comercial.

	Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
pH de la cepa E1 vs <i>Saccharomyces</i>	,929	18	,183

Interpretación:

Como se puede observar en la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk se visualiza un valor de P(0,183) mayor a 0,05, entonces decimos que nuestros datos tienen una distribución normal por lo que se empleará una **prueba de estadística paramétrica**.

PLANTEAMIENTO DE LA HIPOTESIS

$$H_0: \mu_{pH \text{ Saccha}} = \mu_{pH \text{ E1}} ; P > 0,05$$

$$H_1: \mu_{pH \text{ Saccha}} \neq \mu_{pH \text{ E1}} ; P < 0,05$$

Tabla 36. Resumen de contrastes de hipótesis para la cepa nativa *Kloeckera* vs *Saccharomyces bayanus* comercial.

Estadísticas de grupo					
		N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
pH de la cepa E1 vs <i>Saccharomyces</i>	CEPAE1vs <i>Saccharomyces</i>				
	cepa E1	9	3,4656	,01810	,00603
	<i>Saccharomyces</i>	9	3,4767	,08803	,02934

Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
pH de la cepa E1 vs <i>Saccharomyces</i>	Se asumen varianzas iguales	47,957	,000	-,371	16	,716	-,01111	,02996	-,07462	,05240
	No se asumen varianzas iguales			-,371	8,675	,720	-,01111	,02996	-,07927	,05705

Interpretación:

Siendo el valor de $P = 0,716$ es que **asumimos la hipótesis nula**, es decir que al comparar los valores de pH durante el proceso de vinificación de la cepa *Kloeckera* con la cepa *Saccharomyces bayanus*, podemos ver **que no existe diferencias significativas** entre los valores por lo que asumimos que los valores de pH en ambos procesos son iguales.

5.4. pH para la cepa nativa *S. cerevisiae* vs *S. bayanus* comercial

Tabla 37. Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la cepa nativa *Saccharomyces cerevisiae* vs *Saccharomyces bayanus* comercial.

	Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
pH de la cepa E2 vs <i>Saccharomyces</i>	,878	18	,025

Interpretación:

Al observar en la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk un valor de $P(0,025)$ el cual es menor a 0,05, entonces decimos que nuestros datos no tienen una distribución normal por lo que se empleará una prueba **de estadística no paramétrica**.

PLANTEAMIENTO DE LA HIPOTESIS

$$H_0: \mu_{pH \text{ Saccha}} = \mu_{pH \text{ E2}} ; P > 0,05$$

$$H_1: \mu_{pH \text{ Saccha}} \neq \mu_{pH \text{ E2}} ; P < 0,05$$

Tabla 38. Resumen de contrastes de hipótesis para la cepa nativa *Saccharomyces cerevisiae* vs *Saccharomyces bayanus* comercial.

Resumen de contrastes de hipótesis				
	Hipótesis nula	Prueba	Sig. ^{a,b}	Decisión
1	La distribución de los pH E2 y <i>Saccharomyces</i> es la misma entre categorías de CEPAE2 vs <i>Saccharomyces</i> .	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,008 ^c	Rechace la hipótesis nula.
a. El nivel de significación es de ,050.				
b. Se muestra la significancia asintótica.				
c. Se muestra la significación exacta para esta prueba.				

Interpretación:

Teniendo en cuenta que el valor de $P = 0,008$ es que rechazamos la hipótesis nula y **asumimos la hipótesis alternativa**, es decir que al comparar los valores de pH durante el proceso de vinificación de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* con la cepa *Saccharomyces bayanus*, podemos ver que **existe diferencias significativas** entre los valores por lo que asumimos que los valores de pH en ambos procesos son diferentes.

5.5. Grado alcohólico (Baumé) para la cepa nativa *Kloeckera* vs *S. bayanus* comercial

Tabla 39. Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la cepa nativa *Kloeckera* vs *Saccharomyces bayanus* comercial.

	Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Grado alcohólico de la cepa E1 vs <i>Saccharomyces</i>	,462	18	,000

Interpretación:

Al observar en la prueba de normalidad el valor de P (0,000) que es menor a 0,05, entonces decimos que nuestros datos no tienen una distribución normal por lo que se empleará una **prueba de estadística no paramétrica**.

PLANTEAMIENTO DE LA HIPOTESIS

$H_0: \mu^{\text{alc Saccha}} = \mu^{\text{alc E1}} ; P > 0,05$

$H_1: \mu^{\text{alc Saccha}} \neq \mu^{\text{alc E1}} ; P < 0,05$

Tabla 40. Resumen de contrastes de hipótesis para la cepa nativa *Kloeckera* vs *Saccharomyces bayanus* comercial.

Resumen de contrastes de hipótesis				
	Hipótesis nula	Prueba	Sig. ^{a,b}	Decisión
1	La distribución de grado alcohólico E1 vs <i>Saccharomyces</i> es la misma entre categorías de CEPAE1 vs <i>Saccharomyces</i> .	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,258 ^c	Conserve la hipótesis nula.
a. El nivel de significación es de ,050.				
b. Se muestra la significancia asintótica.				
c. Se muestra la significación exacta para esta prueba.				

Interpretación:

Considerando el valor de P = 0,258 es que se **asume la hipótesis nula**, es decir que al comparar los valores de grado alcohólico durante el proceso de vinificación de la cepa *Kloeckera* con la cepa *Saccharomyces bayanus*, podemos ver que **no existe diferencias significativas** entre los valores por lo que asumimos que el grado alcohólico en ambos procesos son similares.

5.6. Grado alcohólico (Baumé) para la cepa nativa *S. cerevisiae* vs *S. bayanus* comercial

Tabla 41. Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk para la cepa nativa *Saccharomyces cerevisiae* vs *Saccharomyces bayanus* comercial.

	Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Grado alcohólico de la cepa E2 vs <i>Saccharomyces</i>	,746	18	,000

Interpretación:

Como se observa en la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk se tiene un valor de $P(0,000)$ menor a $0,05$, entonces decimos que nuestros datos no tienen una distribución normal por lo que se empleará una prueba de **estadística no paramétrica**.

PLANTEAMIENTO DE LA HIPOTESIS

$$H_0: \mu^{\text{alc Saccha}} = \mu^{\text{alc E2}} ; P > 0,05$$

$$H_1: \mu^{\text{alc Saccha}} \neq \mu^{\text{alc E2}} ; P < 0,05$$

Tabla 42. Resumen de contrastes de hipótesis para la cepa nativa *Saccharomyces cerevisiae* vs *Saccharomyces bayanus* comercial.

Resumen de contrastes de hipótesis				
	Hipótesis nula	Prueba	Sig. ^{a,b}	Decisión
1	La distribución de grado alcohólico E2 vs <i>Saccharomyces</i> es la misma entre categorías de CEPAE2vs <i>Saccharomyces</i> .	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,094 ^c	Conserve la hipótesis nula.
a. El nivel de significación es de ,050.				
b. Se muestra la significancia asintótica.				
c. Se muestra la significación exacta para esta prueba.				

Interpretación:

Visto el valor de $P = 0,094$ es que **asumimos la hipótesis nula**, es decir que al comparar los valores de grado alcohólico durante el proceso de vinificación de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* con la cepa *Saccharomyces bayanus*, notamos que **no existe diferencias significativas** entre los valores, por lo que el grado alcohólico registrado con la cepa *Saccharomyces cerevisiae* es similar al registrado por la cepa *Saccharomyces bayanus*.

CONCLUSIONES

PRIMERA. Se ha comprobado que sí se puede aislar e identificar cepas nativas del mosto de uva negra criolla con capacidad de ser utilizadas como cultivo iniciador en el proceso de vinificación; con óptima velocidad de metabolización de azúcares (cinética fermentativa), presentar alta tolerancia al etanol (poder fermentativo), y pH y grado alcohólico en condiciones iguales de temperatura para ser elegida comparándola con una levadura comercial.

SEGUNDA. Las características bioquímicas de las levaduras presentes en el proceso de vinificación son: La prueba de fermentación de azúcares que dio positivo para la cepa nativa *Kloeckera* por consumo de los azúcares Glucosa, Fructuosa, D-Galactosa y Celobiosa. Y la cepa nativa *Saccharomyces cerevisiae* que dio positivo por el consumo de los azúcares Glucosa, Fructuosa y D-Galactosa.

Asimismo, según la prueba bioquímica API 20 C AUX dio positivo para la cepa nativa *Kloeckera* por consumo de los azúcares D-GLUcosa, 2-ceto-Gluconato cálcico, D-GALactosa y D-CELLobiosa. Y la cepa nativa *Saccharomyces cerevisiae* dio positivo por el consumo de los azúcares D-GLUcosa, D-GALactosa, D-SACarosa y D-RAFinosa.

TERCERA. Se ha comprobado de acuerdo a la Figura 15 que la cepa *Kloeckera* iguala o es tan eficaz en su cinética fermentativa como la cepa comercial *Saccharomyces bayanus*.

Y según la Figura 16, de fecha posterior no existe diferencias significativas entre los valores de pérdida de CO₂ de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* versus la cepa comercial *Saccharomyces bayanus*.

CUARTA. Se ha demostrado de acuerdo a la Figura 15 que la cepa *Saccharomyces cerevisiae* no presenta el mismo poder fermentativo que la cepa comercial *Saccharomyces bayanus*.

A continuación, según la Figura 16, se comprueba que los porcentajes de alcohol producidos por la cepa nativa *Kloeckera* y por la cepa nativa *Saccharomyces cerevisiae* son de menor porcentaje de alcohol y que contrastados con la cepa comercial, existe diferencias significativas con el porcentaje de alcohol producido por la cepa comercial.

QUINTA. Se ha comprobado que al comparar los valores de temperatura generados durante el proceso de vinificación de las cepas nativas *Kloeckera* y *Saccharomyces cerevisiae* en contraste con la cepa comercial podemos ver que no existe diferencias significativas entre los valores por lo que asumimos que las condiciones de temperatura son las mismas.

SEXTA. Se ha comprobado que al comparar los valores de pH generados durante el proceso de vinificación de la cepa *Kloeckera* con la cepa comercial *S. bayanus* se asume que los valores de pH en ambos procesos son iguales.

Asimismo, se ha comprobado que al comparar los valores de pH generados durante el proceso de vinificación de la cepa nativa *Saccharomyces cerevisiae* con la cepa comercial *S. bayanus* existe diferencias entre los valores de pH siendo el valor de la cepa nativa *Saccharomyces cerevisiae* menos ácido que el de la cepa comercial.

SÉPTIMA. Se ha comprobado que al comparar los valores de grado alcohólico durante el proceso de vinificación de las cepas nativas *Kloeckera* y *Saccharomyces cerevisiae* en contraste con la cepa comercial *S. bayanus*, el grado alcohólico de ambas cepas nativas es similar al de la cepa comercial.

RECOMENDACIONES

Generar nuevas líneas de investigación para estudios de identificación molecular de las cepas nativas y que se las incluya en los procesos de vinificación^{4,40,41,42,43,44}.

Probar las cepas nativas frente a otros productos alcohólicos, como, por ejemplo, tequila, cerveza, etc., estando las cepas nativas previamente conservadas en viales o preservadas por liofilización^{45,46,47,48,49,50}.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Puij Pujol, A. Selección de Levaduras Autóctonas como herramienta para la producción de vinos singulares y de terroir, Área de Biotecnología de INCAVI. 2016.
2. Torija, M.J., Beltran, G., Novo, M., Hierro, N., Poblet, M., Rozés, N., Guillamón, J.M. y Mas, A. Selección de Levaduras, Tecnología del Vino. 2002.
3. Fleet, G.H. Growth of Yeasts during Wine Fermentations, Journal of Wine Research. 1990; Vol. 1, No. 3, pp. 211-223.
4. Hierro, N., González, A., Mas, A. and Guillamón, J.M. Diversity and evolution of non-Saccharomyces yeast populations during wine fermentation: effect of grape ripeness and cold maceration, Federation of European Microbiological Societies. 2005.
5. Fleet, G.H. Yeast interactions and wine flavour, International Journal of Food Microbiology. 2003.
6. Querol, A., Barrio, E., Huerta, T. and Ramon, D. Dry yeast strain for use in fermentation of Alicante wine: Selection and DNA patterns, Journal of Food Science. 2006, 57(1):183-185.
7. Boulton, R.B., Singleton, V.L., Bisson, L.F. and Kunkee R.E. Principles and practices of winemaking, The Chapman & Hall Enology Library, New York. 1996.
8. Bauer, F.F. and Pretorius, I.S. Yeast stress response and fermentation efficiency: How to survive the making of wine – a review, S. Afr. J. Enol, Vitic. 2000; Vol. 21.
9. Balmaseda, A. Levaduras en la Fermentación del Vino, Enología.
10. Aprender. ¿Qué son las levaduras y por qué hacen posible el vino?
11. Barnett, J.A., Payne, R.W. and Yarrow, D. Yeasts: Characteristics and identification, Third Edition. 2000.
12. Mesas, J.M. y Alegre, M.T. El papel de los microorganismos en la elaboración del vino, Cienc. Tecnol. Aliment. 1999; Vol. 2, No. 4, pp. 174-183.

13. Bartowsky, E. Microbiology of winemaking, In Focus, Microbiology Australia. 2017.
14. Alba Lois, L. y Segal Kischinevzky, C. Las levaduras oportunistas: ¿patógenos emergentes de la boca?, UNAM.
15. Boulton, R.B., Singleton, V.L., Bisson, L.F. y Kunkee, R.E. Teoría y práctica de la elaboración del vino, Editorial Acribia S.A. Zaragoza. 1995.
16. Epifanio Fernández, S.I. Tesis Doctoral Influencia de la tecnología de vinificación en la microbiología y el desarrollo de la fermentación alcohólica, Universidad de la Rioja. 2005.
17. Combina, M., Mercado, L., Borgo, P., Elia, A., Jofré, V., Ganga, A., Martinez, C. and Catania, C. Yeasts associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina, Journal of Applied Microbiology. 2005.
18. García García, M. Selección de levaduras y desarrollo de nuevos procesos biotecnológicos para la mejora de los vinos de la D.O. “Vinos de Madrid”, Universidad Autónoma de Madrid. 2018.
19. Ocón Sáenz, M.E. Diversidad de levaduras no-Saccharomyces en diferentes ecosistemas vitivinícolas, Universidad de La Rioja. 2015.
20. Álvarez Pérez, J.M. Aislamiento y caracterización genética y enológica de levaduras vínicas autóctonas de uva Prieto Picudo y caracterización aromática de sus vinos (DO “Tierra de León”), Universidad de León. 2011.
21. Regodón Mateos, J.A. Tesis Doctoral Obtención y Caracterización de Cepas Autóctonas de Levaduras para la Elaboración Estandarizada de Vinos de Calidad, Universidad de Extremadura.
22. Artigas, F. y Machado, V. Aislamiento, Selección e Identificación de Levaduras Nativas con Propiedades Enológicas en Uvas Tannat, Universidad ORT Uruguay. 2017.
23. Garre García, E. Caracterización y mejora de la resistencia de las levaduras vínicas a la deshidratación en la producción de levadura seca activa, Universitat de Valencia. 2008.
24. Suárez Lepe, J.A. e Íñigo Leal, B. Microbiología Enológica Fundamentos de Vinificación, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 2º Edición. 1992.

25. Arévalo Villena, M. Selección de Cultivos Iniciadores y su Empleo en Enología, Universidad de Castilla-La Mancha.
26. Franch Usó, P. Comportamiento enológico de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* procedentes de una parcela de D.O. Rueda, Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias, Grado en Enología, Universidad de Valladolid, Julio 2018.
27. Miranda Castilleja, D.E., Ortiz Barrera, E., Arvizu-Medrano, S.M., Ramiro-Pacheco, J., Aldrete-Tápia, J.A. y Martínez-Peniche, R.Á. Aislamiento, Selección e Identificación de Levaduras *Saccharomyces* spp. Nativas de Viñedos en Querétaro, México, *Agrociencia* 49:759-773. 2015.
28. García López, M.D. y Uruburu Fernández, F. La conservación de cepas microbianas, Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Universitat de Valencia. 46100 Burjassot (Valencia).
29. Martí Solé, M.C., Alonso Espadalé, R. y Constans Aubert, A. NTP 488: Calidad de aire interior: identificación de hongos, Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales España.
30. HiMedia Laboratories Pvt. Limited. The HiMedia Manual for Microbiology Laboratory Practice, A-406, Bhaveshwar Plaza, L B S Marg, Mumbai 400086, India.
31. Jave Márquez, M. Prácticas de Microbiología II, Universidad Católica de Santa María. 2014.
32. BioMérieux. Desarrollo del método API 20 C AUX.
33. BioMérieux. Sistema de identificación de levaduras, API 20 C AUX. 2010.
34. Maurivin. Procedimiento recomendado para rehidratar la levadura para vino seca y activa de Maurivin.
35. Maurivin PDM. Información del Producto, ABBiotek. 2017.
36. Ministerio de Salud. Lavado y Desinfección Frutas y Verduras, Dirección General de Salud Ambiental e Inocuidad Alimentaria.
37. Sanz Cervera, S.A. Prácticas de Microbiología, Universidad de la Rioja. 2011.

38. Bernardi, A.M. Selección de Levaduras Vínicas Provenientes de la Provincia de Mendoza, Universidad Nacional de Cuyo – Facultad de Ciencias Agrarias, Mendoza. 2013.
39. Oteruelo, B. Estudio de la tolerancia a elevadas concentraciones de azúcar de *Saccharomyces cerevisiae* vónicas, Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias, Grado en Enología; Universidad de Valladolid, Julio 2018.
40. Esteve-Zarzoso, B., Hierro, N., Mas, A. and Guillamón, J.M. A new simplified AFLP method for wine yeast strain typing, *Food Science and Technology*. 2010.
41. Bisson, L.F. and Joseph, L. *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, Springer Berlin Heidelberg. 2009.
42. Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donéche, B. and Lonvaud, A. *Handbook of Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinifications*, Second Edition. 2006.
43. Pretorius, I.S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking, *Yeast*. 2000.
44. Torija, M.J., Rozés, N., Poblet, M., Guillamón, J.M. and Mas, A. Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: Comparison between two different wine-producing areas over a periodo of three years, *Antonie van Leeuwenhoek*. 2001.
45. Zabukovec, P., Cadez, N. and Cus, F. Isolation and Identification of Indigenous Wine Yeasts and Their Use in Alcoholic Fermentation, *Food Technology and Biotechnology*. 2020.
46. Kurtzman, C.P., Fell, J.W. and Boekhout, T. *The Yeasts, A Taxonomic Study*, Fifth Edition. 2011.
47. Barcenilla Moraleda, J.M. Influencia de las levaduras en los procesos de fermentación y conservación de vinos blancos sobre polifenoles, polialcoholes y azúcares, Universidad Complutense de Madrid. 1992.
48. Gutiérrez Fernández de Piérola, J. El papel de la selección de levaduras en la elaboración del vino, Universidad de Salamanca. 2018.
49. Viramontes Álvarez, R.I. y Pérez Leal, R. Levaduras vónicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, México. 2014.

50. Torija Martínez, M.J. Ecología de Levaduras: Selección y Adaptación a Fermentaciones Vínicas, Universitat Rovira I Virgili. 2002.



Anexo 1. HiMedia Manual for Microbiology Laboratory Practice (pp. 426, 332 y 333)

pp. 426

Tabla 43. Urea Broth Base (Base de caldo de urea).

El caldo de urea se recomienda para la identificación de bacterias en función de la utilización de urea, específicamente para la diferenciación de especies de *Proteus* de especies de *Salmonella* y *Shigella*.

Composición:

<i>Ingredientes</i>	<i>Gramos/Litro</i>	<i>Gramos/Litro</i>
Fosfato monopotásico	9.10	9.10
Fosfato dipotásico	9.50	9.50
Extracto de levadura	0.10	0.10
Rojo fenol	0.01	0.01
Urea	-	20.00

pH final (a 25°C) 6.8 ± 0.2

Fórmula ajustada, estandarizada para adaptarse a los parámetros de rendimiento.

pp. 332

Tabla 44. Phenol red agar media (Medio de agar rojo fenol).

Los medios de agar rojo fenol se utilizan para estudiar la fermentación de diversos carbohidratos por cultivos puros de microorganismos.

Composición:

Ingredientes Gramo/Litro	Base de agar rojo fenol	Agar rojo fenol dextrosa	Agar rojo fenol maltosa	Agar rojo fenol lactosa	Agar rojo fenol sacarosa	Agar rojo fenol manitol
Peptona de proteosa	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Extracto de carne de res	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Cloruro de sodio	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Dextrosa	-	10.00	-	-	-	-
Maltosa	-	-	10.00	-	-	-
Lactosa	-	-	-	10.00	-	-
Sacarosa	-	-	-	-	10.00	-
Manitol	-	-	-	-	-	10.00
Rojo fenol	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
Agar	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00

pH final (a 25 °C) 7.4 ± 0.2

Fórmula ajustada y estandarizada para adaptarse a los parámetros de rendimiento

pp. 333

Tabla 45. Phenol red broth media (Medio de caldo rojo fenol).

Los medios de caldo rojo fenol se utilizan para la determinación de la fermentación de carbohidratos en la diferenciación de microorganismos.

Composición del medio de caldo rojo fenol:

Ingredientes Gramo/Litro	Base	Adonitol	Arabinosa	Dextrosa	Dulcitol	Galactosa	Inositol	Lactosa	Malto sa
Peptona de proteosa	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Extracto de carne de res	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Cloruro de sodio	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Adonitol	-	5.00	-	-	-	-	-	-	-
Arabinosa	-	-	5.00	-	-	-	-	-	-
Dextrosa	-	-	-	5.00	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	5.00	-	-	-	-
Galactosa	-	-	-	-	-	5.00	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	5.00	-	-
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	5.00	-
Maltosa	-	-	-	-	-	-	-	-	5.00
Rojo fenol	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018

Ingredientes Gramo/Litro	Manitol	Rafinosa	Ramnosa	Salicina	Sorbitol	Almidón	Sacarosa	Trehalosa	Xilosa
Peptona de proteosa	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Extracto de carne de res	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Cloruro de sodio	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Manitol	5.00	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinosa	-	5.00	-	-	-	-	-	-	-
Ramnosa	-	-	5.00	-	-	-	-	-	-
Salicina	-	-	-	5.00	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	5.00	-	-	-	-
Almidón	-	-	-	-	-	5.00	-	-	-
Sacarosa	-	-	-	-	-	-	5.00	-	-
Trehalosa	-	-	-	-	-	-	-	5.00	-
Xilosa	-	-	-	-	-	-	-	-	5.00
Rojo fenol	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018

pH final (a 25 °C) 7.4 ± 0.2

Fórmula ajustada y estandarizada para adaptarse a los parámetros de rendimiento



Figura 17. Recolección de la muestra.



Figura 18. Trituración de la muestra (estrujado).

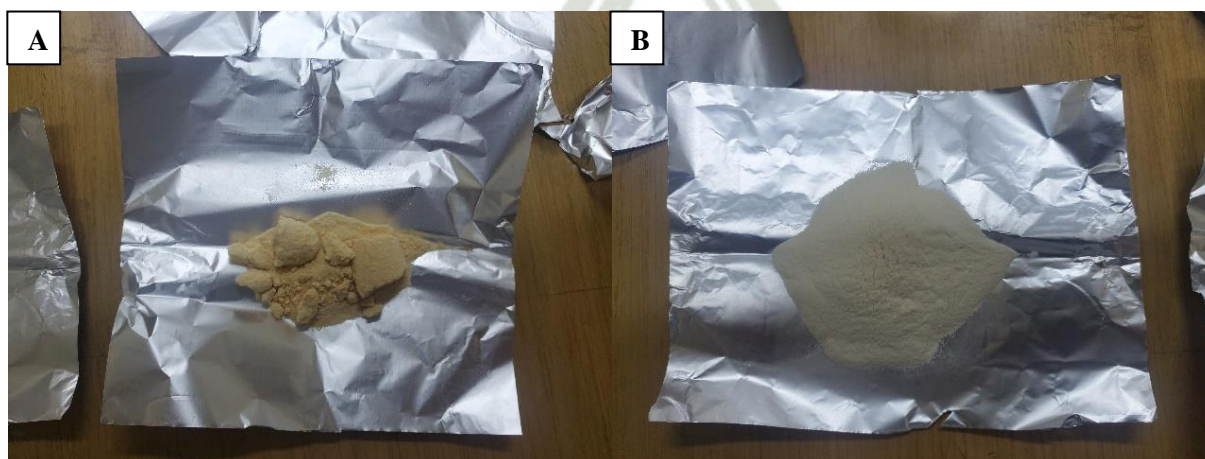


Figura 19. Preparación de material (diluyentes).

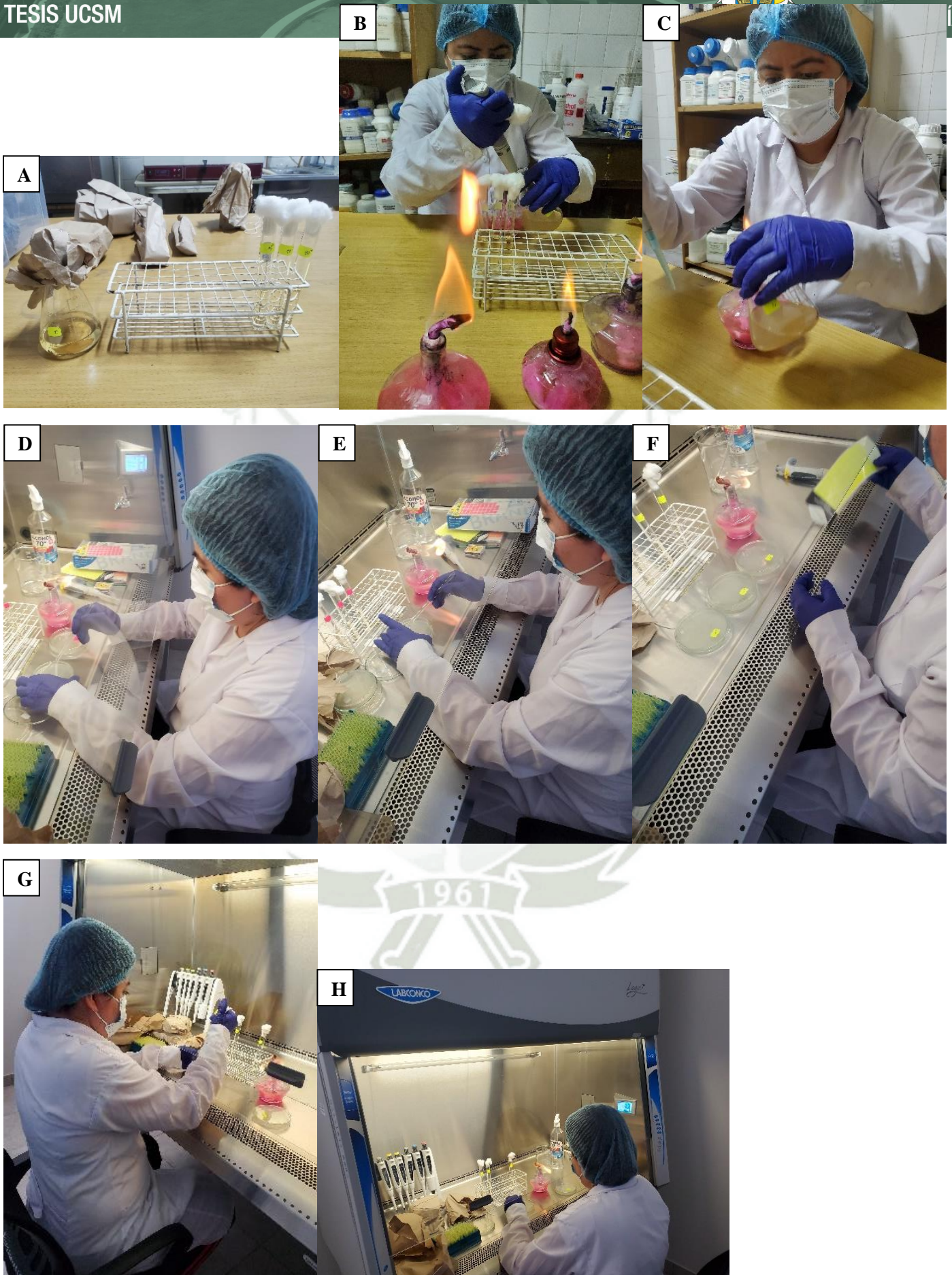


Figura 20. Siembra por diseminación de las placas 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} .

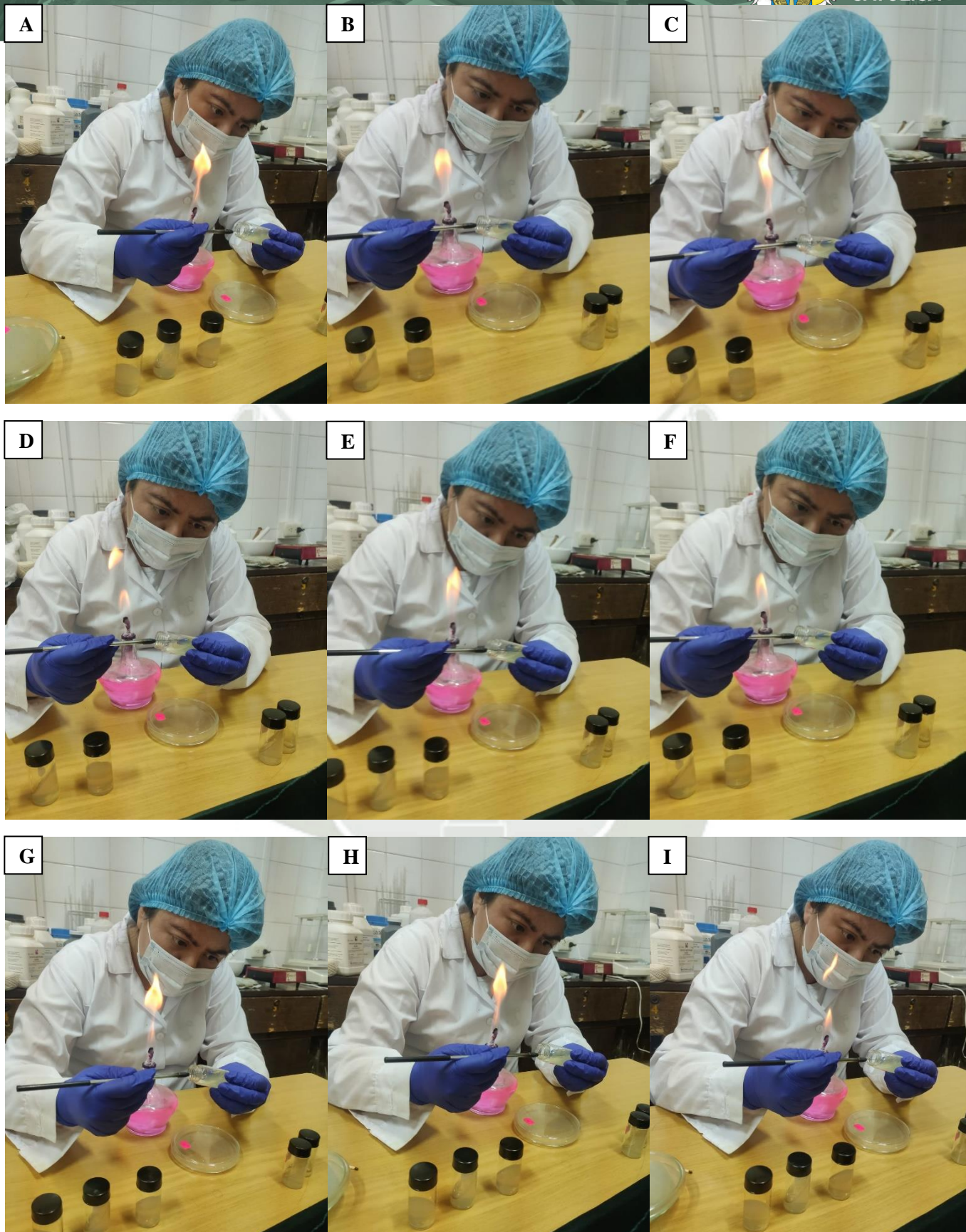


Figura 21. Traspase de las levaduras nativas a viales con medio PDA inclinado.

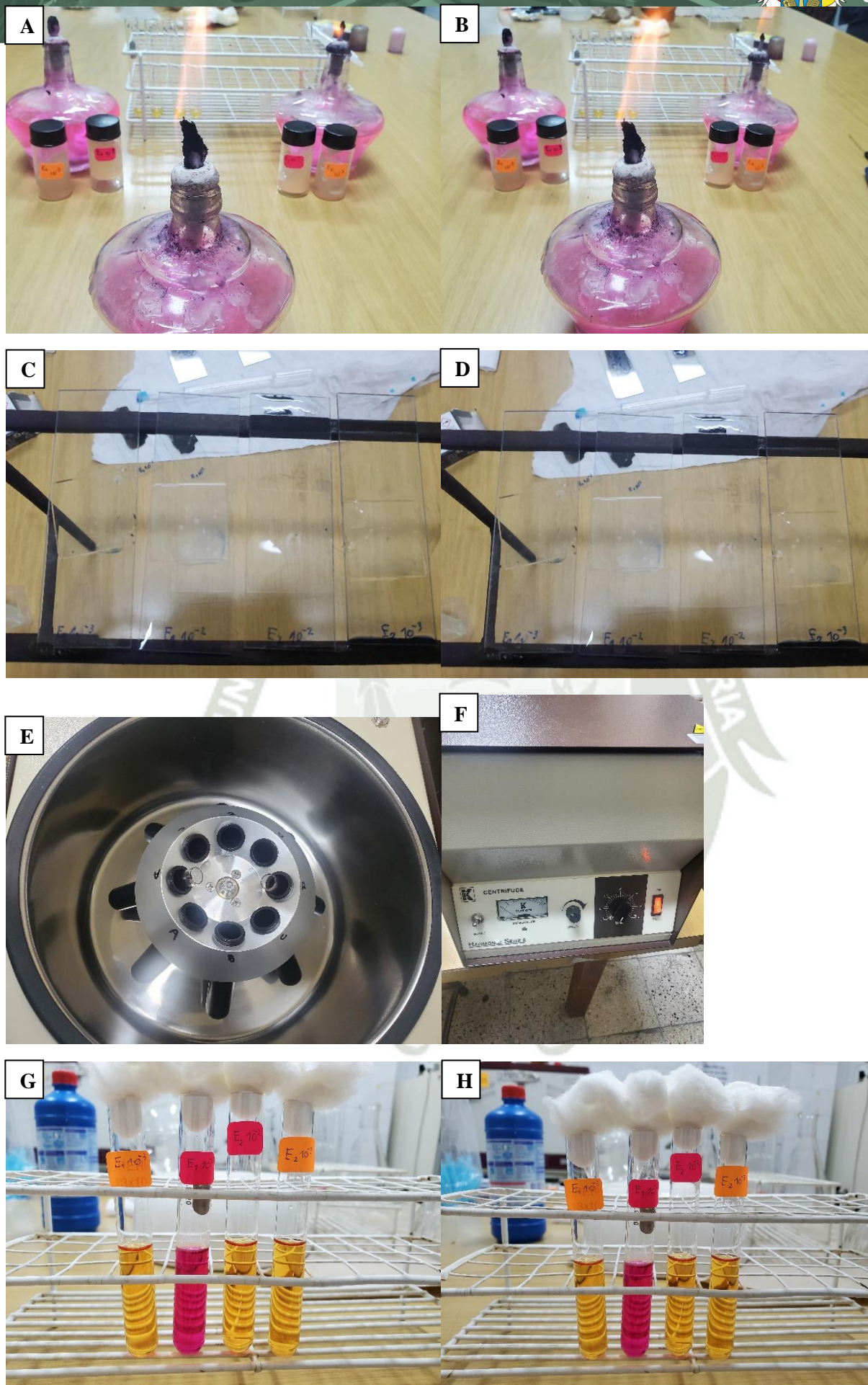


Figura 22. Pruebas morfológicas a las levaduras nativas.

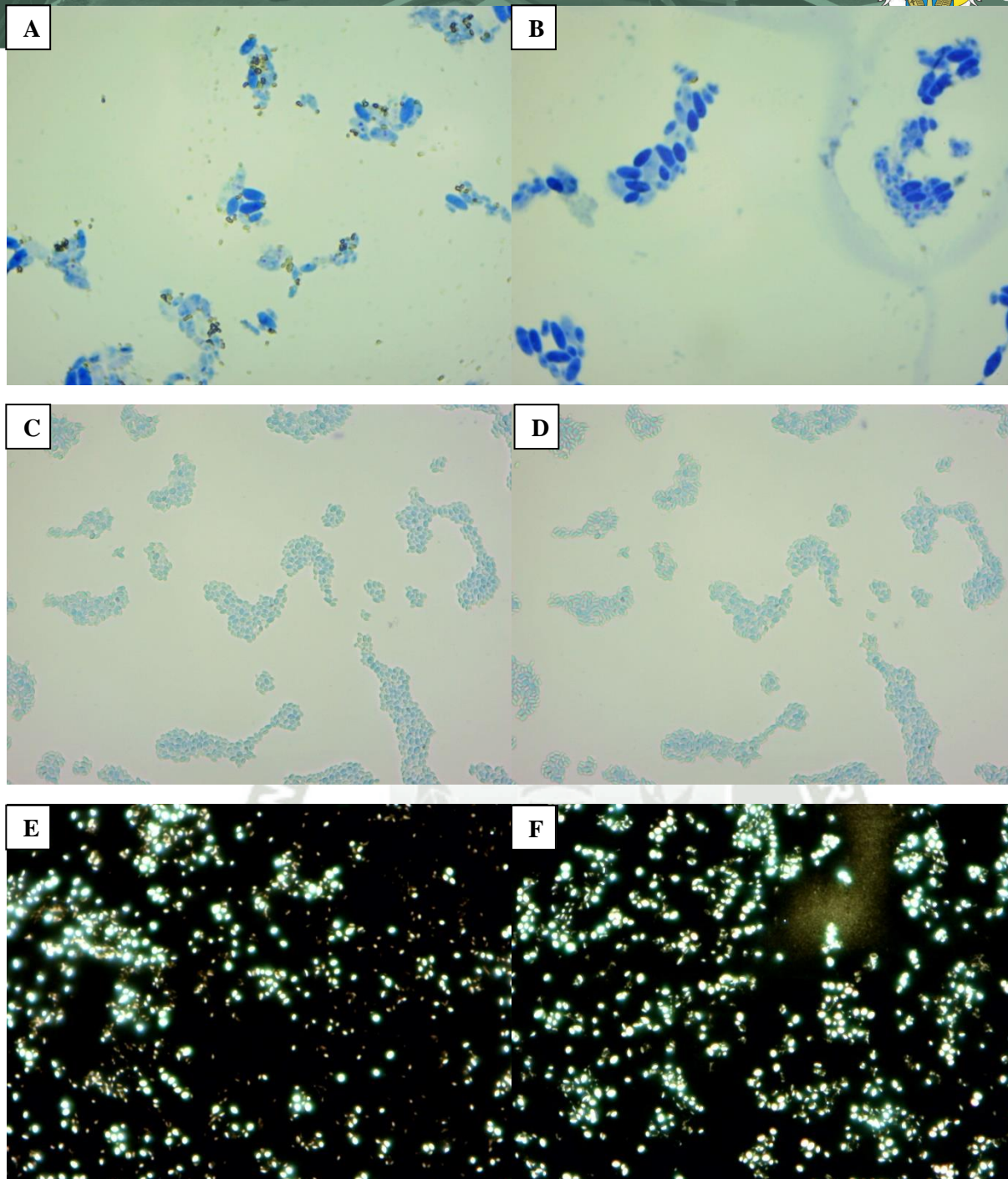


Figura 23. Observación de levaduras nativas bajo microscopio 40x con coloración simple de azul de metileno y tinta china.

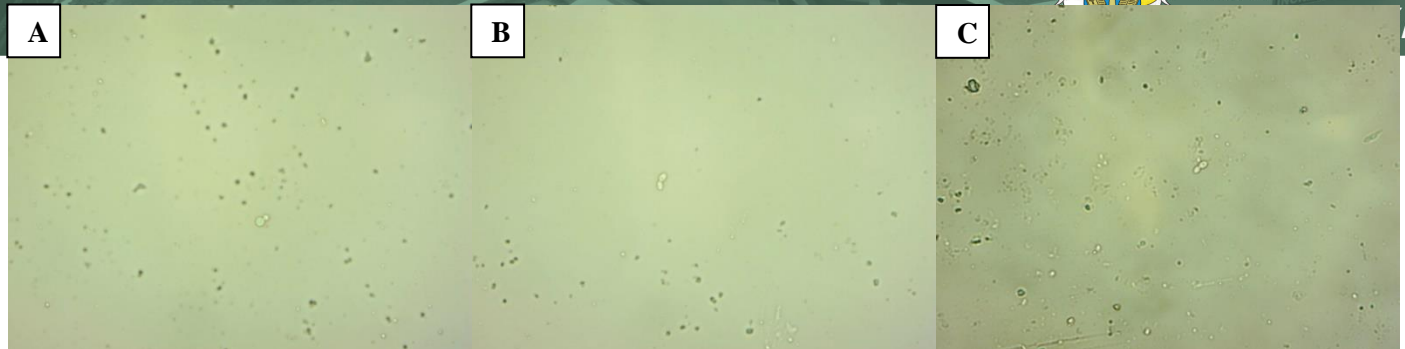


Figura 24. Observación del tubo germinal 40x de las levaduras nativas.

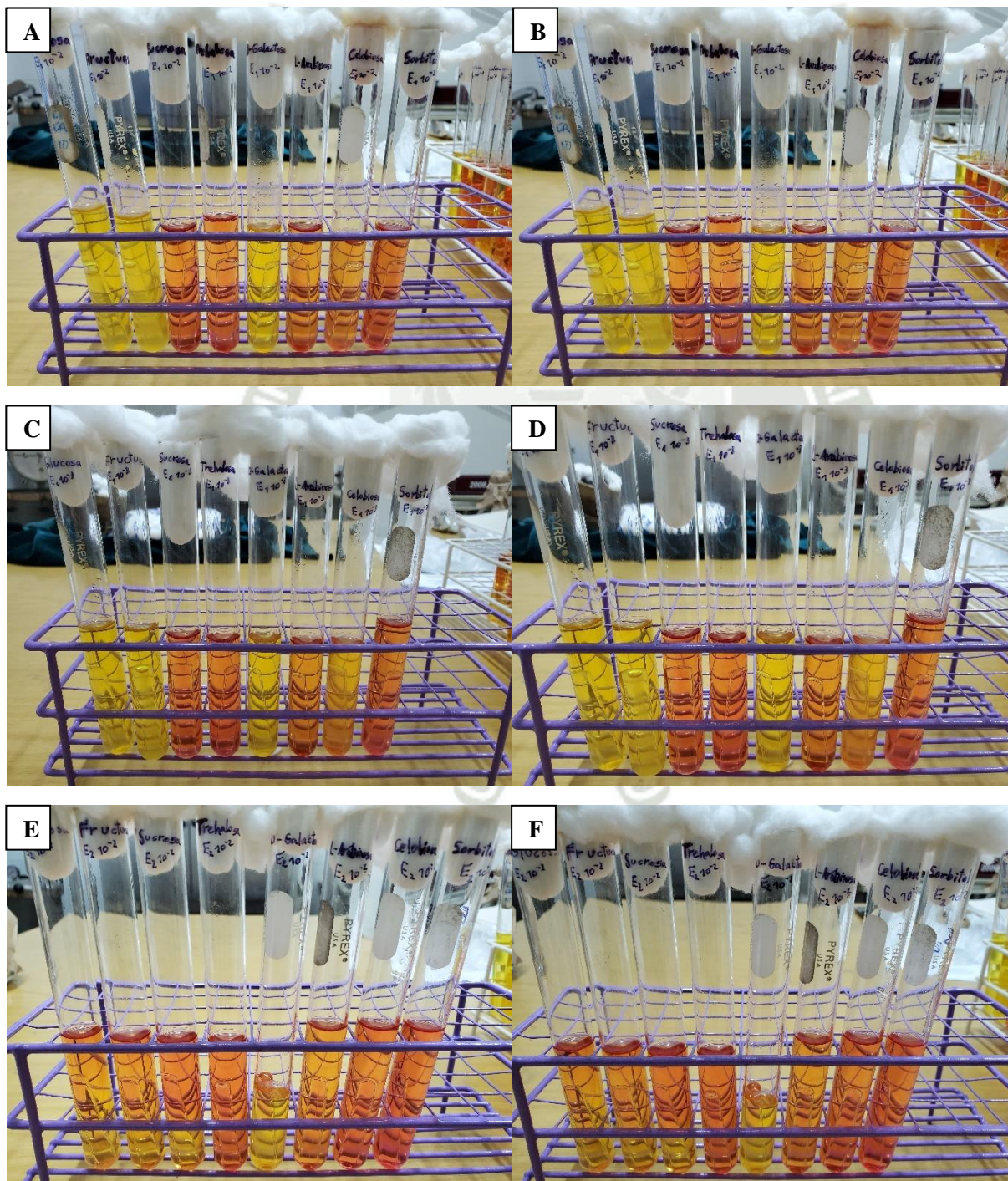


Figura 25. Fermentación de azúcares.

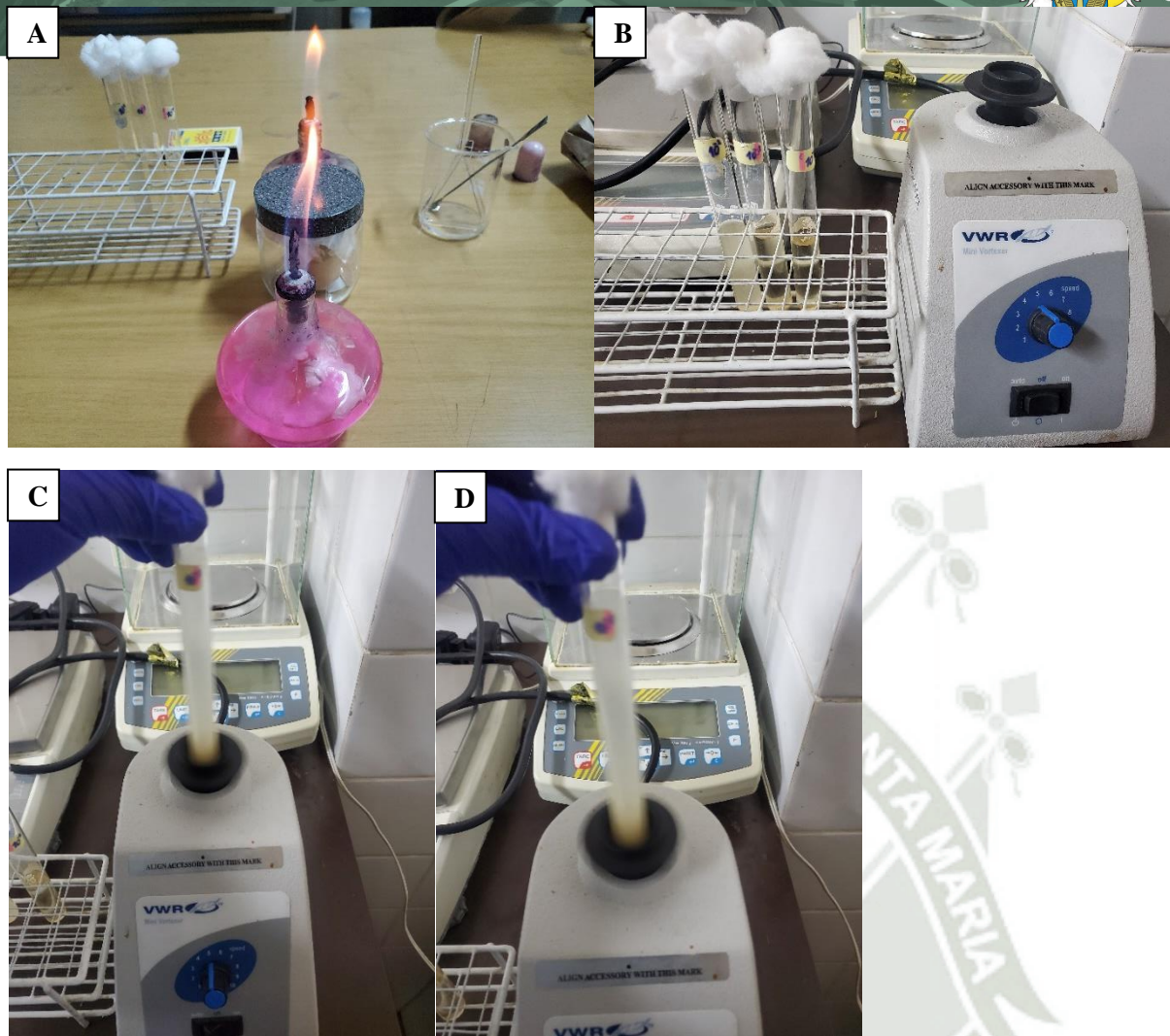


Figura 26. Activación de cepas nativas y cepa comercial.

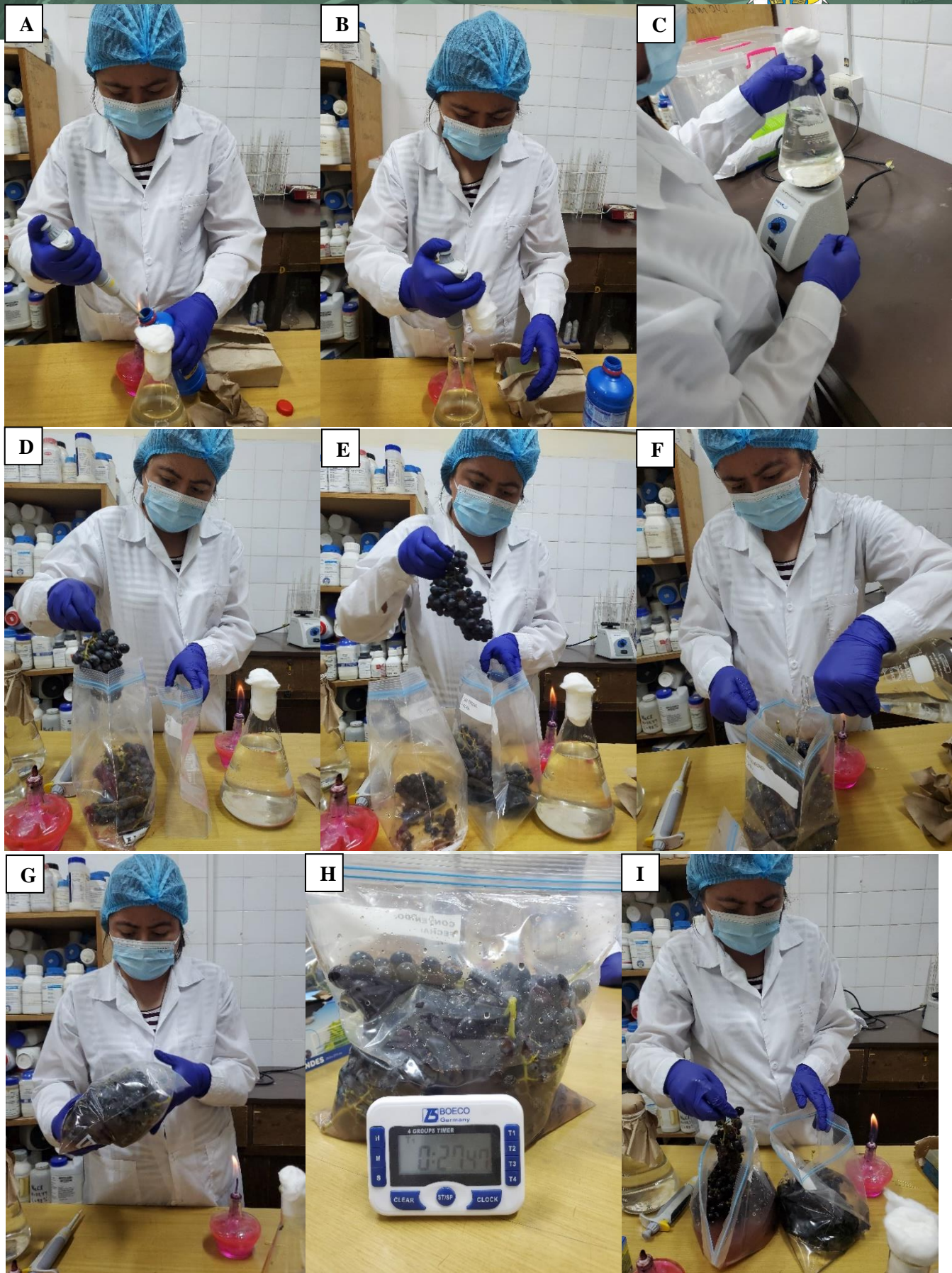


Figura 27. Procedimiento de desinfección de los racimos de uva para posteriormente usarlos en el sistema de microvinificadores.

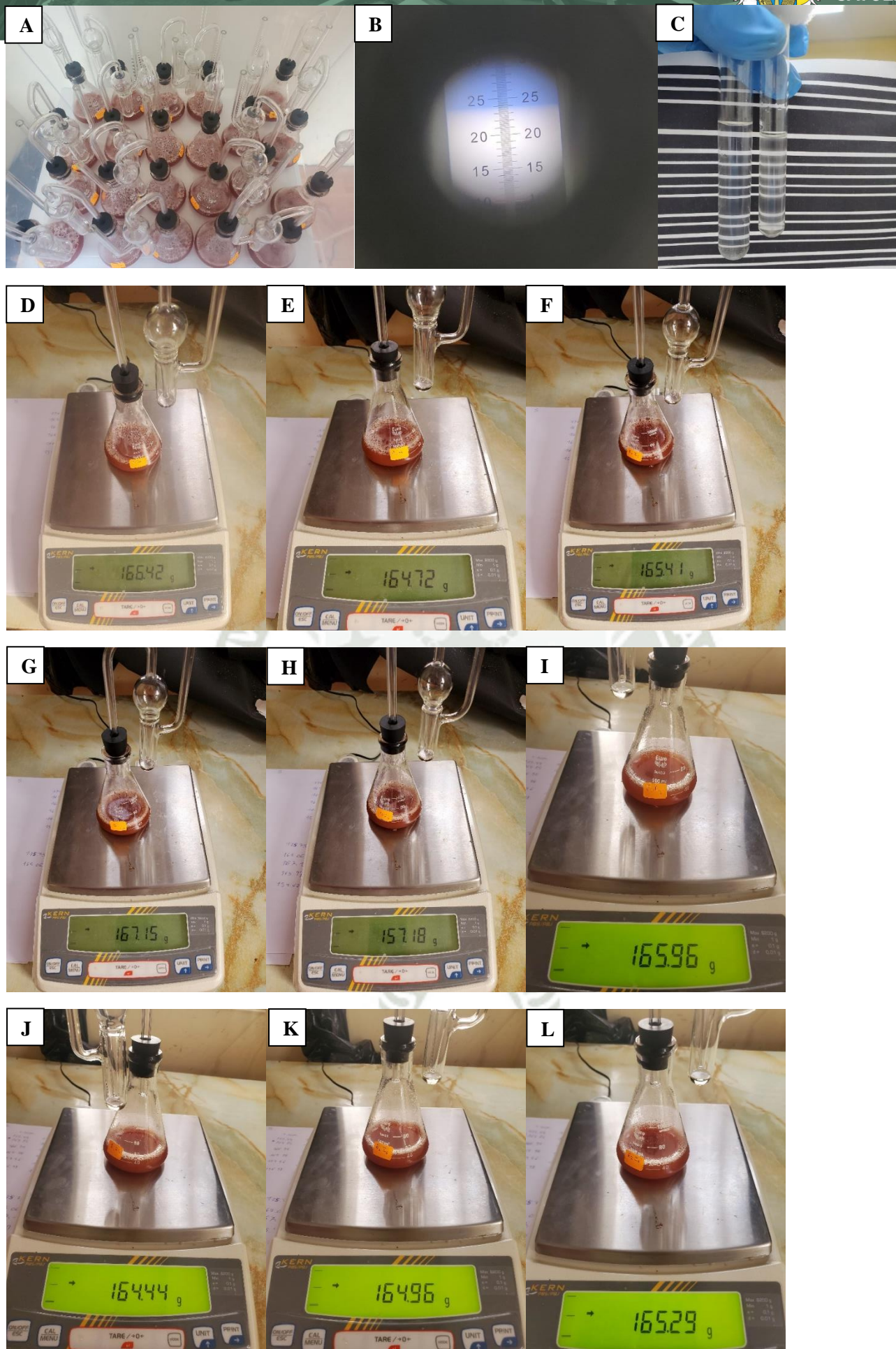


Figura 28. Llenado del sistema de microvinificadores y control gravimétrico durante 13 días.