



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**SELECCIÓN DE CEPAS NATIVAS DE *SACCHAROMYCES* SPP. PARA SU
EMPLEO EN LA INDUSTRIA VITIVINÍCOLA DEL ESTADO DE
QUERÉTARO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA:

MARCO ANTONIO VERDUZCO TORNEL

DIRECTOR DE TESIS

DRA. MARICARMEN QUIRASCO BARUCH



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Ruíz Terán Francisco
VOCAL: Quirasco Baruch Maricarmen
SECRETARIO: Díaz Gutiérrez Karla Mercedes
1er. SUPLENTE: Mina Cetina Aleida
2° SUPLENTE: Juárez Arroyo Elsi Ideli

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 312. CONJUNTO E. FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ESTA TESIS FUE FINANCIADA POR EL PROYECTO PAIP-FQ CON LA CLAVE 5000-9102

ESTE PROYECTO FUE APOYADO POR EL COLEGIO DE PROFESORES DE LA FACULTAD DE QUÍMICA Y LA SECCIÓN 024 DE AAPAUNAM MEDIANTE LA CÁTEDRA “M. EN C. BISERKA SVESHTAROVA PEKARKOVA”

ASESOR DEL TEMA:

Dra. MARICARMEN QUIRASCO BARUCH

SUPERVISOR TÉCNICO:

M.C. CINDY ADRIANA ESTRADA HERNÁNDEZ

SUSTENTANTE:

MARCO ANTONIO VERDUZCO TORNEL

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Al Colegio de Profesores de la Facultad de Química y la Sección 024 de AAPAUNAM, por su invaluable apoyo en el desarrollo del proyecto mediante la beca otorgada “cátedra M. En C. Biserka Sveshtarova Pekarkova” durante el período de octubre de 2018 a marzo de 2019.

Índice de Figuras	5
Índice de Tablas	7
Resumen	10
1. Introducción	12
2. Antecedentes	
2.1 Clasificación del vino y antecedentes históricos	15
2.2 Importancia del cultivo y datos asociados a la producción y consumo de vino	17
2.3 Situación del cultivo de la vid y producción en México y Querétaro	19
2.4 <i>Vitis</i> spp.	
2.4.1 Clasificación y distribución geográfica	20
2.4.2 Condiciones que afectan el desarrollo de la vid	21
2.4.3 Descripción anatómica	24
2.4.4 Fisiología de la vid	27
2.5 Composición química de la uva y el vino	29
2.6 Proceso de elaboración de vino	
2.6.1 Vendimia	37
2.6.2 Evaluación de la calidad de la vendimia	38
2.6.3 Selección y separación de material indeseable	38
2.6.4 Despalillado y estrujado	38
2.6.5 Operaciones comunes para vinificaciones en blanco y tinto	39
2.6.6 Vinificación en tinto	41
2.6.7 Estabilización	43
2.6.8 Clarificación	44
2.6.9 Maduración y añejamiento	45
2.6.10 Embotellado	46

2.6.11 Calidad del vino	47
2.7 Levaduras	
2.7.1 Levaduras involucradas en la producción de vino	48
2.7.2 El género <i>Saccharomyces</i>	49
2.7.3 Desarrollo de la fermentación	50
2.7.4 Características deseadas en una levadura de interés enológico	51
2.8 Bioquímica de la fermentación alcohólica	
2.8.1 Factores que inciden en el desarrollo de la fermentación	54
2.9 Métodos de identificación de levaduras	
2.9.1 Métodos basados en características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas	54
2.9.2 Métodos moleculares para la identificación de levaduras	55
3. Justificación	57
4. Hipótesis	57
5. Objetivo	57
6. Estrategia Experimental	58
7. Materiales y Métodos	58
8. Resultados y Discusión	72
9. Conclusiones	111
10. Perspectivas	112
11. Referencias	113
12. Anexos	118

Índice de Figuras

Figura 1. Principales productores de uva a nivel mundial	18
Figura 2. Principales productores de vino a nivel mundial	18
Figura 3. Influencia de la temperatura en el desarrollo de la uva y en la aparición de compuestos para variedades Kyoho y Cabernet sauvignon	22
Figura 4. Distribución del sistema radicular de la vid	25
Figura 5. Parte aérea de la vid	25
Figura 6. Esquema de un racimo típico desarrollado en una vid	26
Figura 7. Morfología de la baya	27
Figura 8. Ciclo reproductivo de la vid	29
Figura 9. Estructura de una procianidina o tanino condensado	35
Figura 10. Proceso de elaboración de vinos tintos, rosados y blancos	37
Figura 11. Reacción de oxidación del SO ₂ en presencia de oxígeno	39
Figura 12. Extracción de antocianinas y taninos en función del tiempo de maceración	42
Figura 13. Desarrollo de levaduras durante la fermentación	51
Figura 14. Estructura del ADN ribosomal	55
Figura 15. Seguimiento del peso de cada fermentación en función del tiempo de fermentación	74
Figura 16. Desarrollo masivo de levaduras en YPDA con ampicilina ([100 μ g/mL]), fermentación 7	76
Figura 17. Desarrollo de colonias aisladas. Primer resiembra en YPDA con ampicilina ([100 μ g/mL]). Inóculo proveniente de la caja I, fermentación 1	77
Figura 18. Desarrollo de colonia aislada en YPDA con ampicilina ([100 μ g/mL]). Inóculo proveniente de la colonia 69	77
Figura 19. Desarrollo de segundo pase en agar lisina.	78
Figura 20. Desarrollo de segundo pase de levadura <i>Saccharomyces</i> spp. (control) inoculada en agar lisina	79

Figura 21. Observaciones microscópicas de desarrollo en agar lisina de colonias 23, 3 y 9, aumento 100 x	81
Figura 22. Caldo YPD inoculado con colonia a analizar, incubado por 24 horas. Colonia 30, control y 23 (de izquierda a derecha)	84
Figura 23. Gel de agarosa 1%. Se observan de izquierda a derecha: marcador <i>O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder, ready to use</i> (Fermentas), control negativo, control positivo (<i>Metschnikowia pulcherrima</i>), muestra 23, muestra 30 y muestra 31 y marcador <i>O'GeneRuler 50 bp DNA Ladder, ready to use</i> (Fermentas)	88
Figura 24. Árbol de agrupamiento, inferido usando el método Neighbor-Joining	92
Figura 25. Cinética de crecimiento para levadura control con base en las determinaciones de DO realizadas cada 6 horas	96
Figura 26. Cinética de crecimiento para levadura control con base en las determinaciones de UFC/mL realizadas cada 6 horas	96
Figura 27. Ln(UFC/mL) en función de Ln(DO)	97
Figura 28. Relación lineal entre Ln(UFC/mL) y Ln(DO).	98
Figura 29. Avance de la fermentación. Fermentación 23, lote I	103
Figura 30. Avance de la fermentación. Fermentación 23, lote II	104
Figura 31. Avance de la fermentación. Fermentación 30, lote I	104
Figura 32. Avance de la fermentación. Fermentación 30, lote II	105
Figura 33. Avance de la fermentación. Fermentación 31, lote I	105
Figura 34. Avance de la fermentación. Fermentación 31, lote II	106

Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación de vinos por color y las condiciones de vinificación de cada vino	15
Tabla 2. Compuestos polifenólicos presentes en la uva y el vino	33
Tabla 3. Compuestos en el mosto y los productos obtenidos de éstos por el metabolismo de las levaduras	53
Tabla 4. Registro del total de uva recibida, uva despalillada y rendimiento de uva	72
Tabla 5. Caracterización de mosto seleccionado previa fermentación natural	71
Tabla 6. Contenido de azúcar y grado de maduración de las uvas	73
Tabla 7. Temperatura de cada fermentación y temperatura ambiental durante la fermentación natural	74
Tabla 8. Cuenta de mohos y levaduras al alcanzar peso constante en las fermentaciones	75
Tabla 9. Caracterización de mosto fermentado tras fermentación natural	76
Tabla 10. Resultados de tinción simple con safranina de primeras colonias seleccionadas como posibles <i>Saccharomyces</i>	79
Tabla 11. Tinción Gram colonias seleccionadas como posibles <i>Saccharomyces</i>	81

Tabla 12. Resultados de tinción Gram de algunas colonias seleccionadas como posibles <i>Saccharomyces</i> provenientes de PDA con cloranfenicol ([50 µg/mL])	82
Tabla 13. Resultados de crecimiento en agar WL para colonias seleccionadas	83
Tabla 14. Pruebas de etanol. Evaluación de la sobrevivencia de las levaduras evaluando crecimiento en YPDA tras adiciones crecientes de etanol	84
Tabla 15. Tinción Gram para colonias supervivientes a 14% v/v etanol	85
Tabla 16. Desarrollo de colonias supervivientes a 14% v/v etanol en agar WL	86
Tabla 17. Resultados de análisis espectrofotométrico realizado a muestras con ADN extraído de las cepas 23, 30 y 31	87
Tabla 18. Resultados de purificación de las bandas cortadas del primer gel de agarosa para cada muestra (23, 30 y 31)	89
Tabla 19. Resultados de purificación de las bandas cortadas del segundo gel de agarosa para cada muestra (23, 30 y 31)	90
Tabla 20. Resultados de la mezcla de ambas purificaciones para cada muestra (23, 30 y 31)	90
Tabla 21. Resultados tras análisis por BLAST de las secuencias correspondientes a los aislados 23, 30 y 31	91
Tabla 22. Valores promedio de cuenta en placa y D.O. cada 6 horas en la fermentación	96
Tabla 23. Resultados obtenidos de °Bx y acidez total titulable de los lotes de uvas seleccionados	99

Tabla 24. Contenido de azúcar y grado de maduración de las uvas	99
Tabla 25. Contenido de glucosa y fructosa en uva pre fermentación	100
Tabla 26. Volumen de jugo generado post prensado	101
Tabla 27. Contenido de glucosa y fructosa en jugo de uva pre-fermentación	101
Tabla 28. Valores de D.O. del pre inóculo de cada levadura y la cuenta asociada a dicho valor	103
Tabla 29. °Bx, acidez total y % adsorción de antocianinas para cada una de las cepas probadas.	107
Tabla 30. Contenido de etanol, glucosa y fructosa para cada una de las cepas probadas.	108
Tabla 31. Rendimiento producto-biomasa con respecto al etanol ($Y_{p/X}$), eficiencia fermentativa y la conversión azúcar:etanol al final de la fermentación	109

Resumen

Querétaro es el segundo productor de vinos en México, pero los vinos de la región presentan problemas en calidad y sabor del vino, asociado al uso de levaduras comerciales o al desarrollo de fermentaciones naturales que no responden adecuadamente a los problemas de la región. Uno de dichos problemas es que el clima de la región provoca en la uva una baja concentración de antocianinas, lo que afecta el color, sabor y capacidad antioxidante del vino (Miranda-Castilleja, *et al.*, 2014). El uso de levaduras convencionales puede reducir aún más el contenido de antocianinas debido a que éstas pueden adsorberse en la pared celular de las levaduras y, de esta forma, reducir aún más el contenido de antocianinas en el producto terminado, sin considerar la pérdida en la tipicidad del vino producido (Morata, *et al.*, 2003; Jackson, 2014).

El objetivo del presente proyecto fue aislar levaduras con potencial enológico pertenecientes al género *Saccharomyces*, a partir de uvas variedad Cabernet Sauvignon cosechadas en el municipio de El Marqués, Querétaro.

Las cepas fueron aisladas durante la fermentación natural de mostos sulfitados (70 mg SO₂/L mosto) de uva tinta madura, realizando cinco pases en medio nutritivo selectivo (YPDA con ampicilina [100 µg/mL] y PDA con cloranfenicol [50 µg/mL]) e inoculando las levaduras aisladas en agar lisina y agar WL para su identificación como probables *Saccharomyces* spp. (González, 2015). Las levaduras aisladas fueron después identificadas mediante la amplificación y secuenciación del dominio D1/D2 del ADNr 26S (Fernández-Espinar, *et al.*, 2005). Posteriormente, se evaluó su tolerancia al etanol hasta concentraciones de 14% v/v. De un total de 69 levaduras aisladas, una fue identificada como *Saccharomyces cerevisiae* y dos como *Saccharomyces paradoxus*. Las tres levaduras toleraron concentraciones de 70 mg SO₂/L mosto y hasta de 14% v/v etanol.

Posteriormente, se realizaron pruebas de microvinificación para cada levadura aislada. Los vinos producidos por las tres levaduras presentan un contenido menor a 0.2 g de fructosa y glucosa por litro de vino. En el caso del vino producido por las levaduras identificadas

como *S. cerevisiae* a y *S. paradoxus* c, la acidez total está comprendida en un intervalo de 8.8 a 9.2 g/L ácido tartárico, considerado adecuado para un vino comercial; asimismo, el contenido alcohólico fue de 12.56% v/v etanol y 13.25% v/v, respectivamente. En cuanto al vino producido por la levadura identificada como *S. paradoxus* b, presentó una acidez total de 10.4 g/L ácido tartárico, superior a la esperada para un vino comercial; en cuanto al contenido alcohólico, se obtuvo una graduación alcohólica de 12.98% v/v etanol.

Las levaduras *S. paradoxus* b y c, presentaron el mayor rendimiento producto-biomasa ($Y_{p/X}$) con respecto a etanol ($10^{-6.40}$ y $10^{-6.54}$, respectivamente) y eficiencia fermentativa (89.27% y 89.89%, respectivamente). Con respecto a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, presentó un rendimiento producto-biomasa ($Y_{p/X}$) con respecto a etanol de $10^{-7.15}$ y una eficiencia fermentativa de 87.59%. En cuanto a la concentración de antocianinas adsorbidas en la superficie de la pared celular, a pesar de que no se encontró diferencia significativa ($p \leq 5\%$) entre las tres levaduras evaluadas, la que presenta una menor adsorción es la levadura identificada como *Saccharomyces cerevisiae*. Los anteriores resultados se pueden interpretar como un bajo impacto en el contenido fenólico total del vino.

El presente trabajo permitió revelar el potencial enológico de las levaduras nativas del estado de Querétaro. Con base en los resultados obtenidos, se recomendaría el uso de la levadura *S. cerevisiae* en la industria, debido a que muestra un adecuado rendimiento producto-biomasa con respecto a etanol ($Y_{p/X}$), eficiencia fermentativa y, sobre todo, el menor impacto en el contenido fenólico total de un vino tinto de entre las tres levaduras evaluadas.

Introducción

El vino es una bebida obtenida de la fermentación alcohólica total o parcial del mosto de uva, llevada a cabo por levaduras. La calidad del vino depende de la variedad de uva empleada, las condiciones medioambientales durante el desarrollo de la uva, de las prácticas agrícolas, el proceso de vinificación y la levadura empleada (Jackson, 2014).

El proceso de elaboración de vino tinto consiste en diversas operaciones unitarias, pero el presente trabajo se enfocará en la fermentación alcohólica, etapa en la cual se produce etanol y se sintetizan compuestos relacionados con el perfil sensorial del vino. Al inicio de la fermentación, participan varios géneros de levaduras propias de la superficie de la uva; sin embargo, éstas se verán gradualmente inhibidas debido a condiciones cada vez menos favorables en el mosto de uva, como el gradual aumento en la concentración de etanol o la adición de SO₂ al mosto de uva; *Sacharomyces* spp. es el género que predominará en la operación y que aportará etanol y diversos compuestos relacionados con el perfil sensorial del vino (o también tipicidad del vino) (Universidad California Davis, 2018).

Una forma de iniciar la fermentación es con levaduras aisladas de la superficie de las uvas empleadas para elaborar el vino. Esto favorece la tipicidad del vino, garantiza una calidad constante fermentación tras fermentación (Jackson, 2014) y, en el caso de México, responde a necesidades individuales de los productores, además de que reduce la dependencia de levaduras importadas para iniciar la fermentación (Miranda-Castilleja *et al.*, 2015).

En la producción de vino tinto, las antocianinas (compuestos polifenólicos) juegan un papel importante, pues aportan color y otras propiedades deseables en el vino. El contenido de antocianinas en el vino depende de factores como el clima y el tipo de levadura empleada. En el caso de Querétaro, el clima no favorece una óptima maduración fenólica, situación a la cual se añade el uso de levaduras que no necesariamente responden adecuadamente a este problema, pues las levaduras son capaces de adsorber diversos compuestos fenólicos (entre ellos, antocianinas) debido a la composición de su pared celular (debido

principalmente a la presencia de manoproteínas) y, así, reducir aún más el contenido de antocianinas en el vino terminado (Jackson, 2014).

El aislamiento y la identificación de levaduras puede hacerse por medio de múltiples técnicas. El aislamiento de levaduras se hace convencionalmente mediante la inoculación de la muestra ambiental en un medio nutritivo y selectivo. Posteriormente, se evalúan características morfo y fisiológicas lo que, generalmente, implica muchos recursos y tiempo, sin garantizar una identificación óptima (Miranda-Castilleja *et al.*, 2015; Franco-Díaz, 2018).

En cambio, los métodos moleculares permiten una identificación rápida, precisa y fácil hasta nivel de especie de muchas levaduras de relevancia en la industria de los alimentos. La metodología de identificación por análisis de secuencias de regiones del ADN consiste en la amplificación y secuenciación de una región específica del ADN. Generalmente, se recurre a la amplificación del dominio D1/D2 del ADNr 26 S. Tras la amplificación, se obtiene un amplicón de 600 pb común a todas las levaduras pero con diferencias entre especies de hasta una sola base, lo que permite la discriminación incluso entre levaduras altamente relacionadas (Orberá-Ratón, 2004).

En el presente trabajo, se aislaron levaduras de la superficie de uvas variedad Cabernet Sauvignon provenientes de la región de El Marqués, Querétaro y se identificaron por medio de pruebas morfo-fisiológicas. Asimismo, las levaduras aisladas e identificadas como “probables *Saccharomyces* spp.” se analizaron mediante la amplificación y secuenciación del dominio D1/D2 del ADNr 26S y su posterior comparación con secuencias de referencia.

Posteriormente, con las levaduras identificadas ya como *Saccharomyces* spp., se establecieron procesos de micro vinificación con la misma variedad de uva para evaluar el rendimiento producto-biomasa ($Y_{p/X}$), el contenido de etanol por cromatografía de gases, el contenido de glucosa y fructosa del vino obtenido por cromatografía de líquidos y las antocianinas adsorbidas en la superficie de las levaduras. Asimismo, se determinaron °Bx y acidez total fija del mosto pre y post fermentación.

El resultado de la investigación servirá como base para evaluar las características sensoriales del vino producido por las levaduras aisladas, con el fin de proveer a la industria queretana con levaduras nativas que permitan un vino único y con una calidad constante.

2. Antecedentes

2.1 Clasificación del vino y antecedentes históricos

El vino es la bebida alcohólica obtenida de la fermentación total o parcial de uva fresca, estrujada o no, o del jugo o “mosto” de uva (*Vitis vinifera*) de una cepa definida con un contenido mínimo de alcohol de 8.5% v/v. (Organización Internacional de la Viña y el Vino, 2019). Existen distintas formas de clasificar a los vinos, entre las que se encuentran:

- Por el color del vino: de manera general, en blancos, rosados y tintos, esto en función de la cepa de uva empleada para elaborar el vino (García-Cazorla y Xirau-Vayreda, 2000) y las condiciones de vinificación, como se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de vinos por color y las condiciones de vinificación de cada vino

Uva	Tipo de vinificación	Maceración	Vino obtenido
Blanca	Vinificación en blanco	Sin maceración o maceración corta	Vino blanco de blancos
Tinta			Vino blanco de tintos
			Vino gris
			Vino rosado
	Vinificación en tinto	Maceración media y sangrado de la cuba	Clarete
			Vino de café
		Maceración larga	Vino tinto

(Modificado de Chávaro-Ortíz, 2014).

- Por el contenido de azúcar residual tras la fermentación en:
 - secos: entre 4 g/L-9g/L de azúcar y una acidez total tal que la diferencia no sea menor 2 g/L (g ácido tartárico/L) con respecto al contenido de azúcares.

- semi-secos: máx. 12 g/L-18 g/L de azúcar y una acidez total tal que la diferencia no sea menor 2 g/L (g ácido tartárico/L) con respecto al contenido de azúcares.
- semi-dulces: máx. 45 g/L de azúcar y con una acidez total como la descrita anteriormente.
- dulces: mín. 45 g/L de azúcar y con una acidez total como la descrita anteriormente.
- Por el contenido alcohólico que presentan en vino o vino de licor (15 % v/v-24% v/v etanol).
- Por el contenido de CO₂:
 - Tranquilo: máx. 4 g/L de CO₂ a 20 °C.
 - De aguja: entre 3 g/L a 5 g/L de CO₂ a 20 °C.
- Clasificaciones especiales: se refiere a vinos obtenidos mediante procesos especiales distintos a los de la vinificación convencional, como lo son los vinos bajo velo, vinos de licor, vinos espumosos y vinos gasificados.

(Organización Internacional de la Viña y el Vino, 2019).

Se sabe que el vino se produce desde hace más de 6,000 años, a través de evidencia arqueológica que data de los años 5,400-5,000 a.C., encontrada en la región que corresponde hoy a Irán. La identificación de vino en vasijas de cerámica se efectuó por la presencia de tartrato de calcio y residuos de resina de terebinto (empleada como conservador y saborizante en vinos), los cuales sólo pudieron haber provenido de la elaboración de vino.

De manera general, se reconoce la zona del Cáucaso (región comprendida por el actual Azerbaiyán, Georgia, Turquía e Irán) como la región en donde se inició la domesticación de la vid (*Vitis vinifera*) y la elaboración de vino. Posteriormente, este conocimiento migró hacia Palestina, Siria, Egipto y Mesopotamia. A partir de aquí fue que el vino se extendió

por todo el mediterráneo hacia Grecia y Roma, para posteriormente extenderse por toda Europa (Diamandis *et al.*, 1997; Jackson, 2014).

Con la conquista de América en el siglo XVI, el cultivo de la vid y el vino fueron introducidos rápidamente a México, ya que los españoles requerían un suministro constante de la bebida, el cual no podía cubrirse únicamente con los vinos españoles, razón por la cual se planta la vid en distintas regiones de México, entre ellas Querétaro; sin embargo, en 1595 fue prohibida la producción de vino en América, lo que retrasó el avance de la industria en México. En 1597, Lorenzo García solicita una merced (o cesión de tierras) a la Corona para producir vino en el valle de Parras en Coahuila, la cual le fue concedida, quedando establecida así la primer vitivinícola del continente americano (hoy en día, con el nombre “Casa Madero”).

La industria queretana resintió la prohibición real de 1595, dejando la producción de vino en una posición muy poco favorecida hasta el siglo XX. En 1970, surgen pequeñas bodegas vitivinícolas en el estado dando un nuevo impulso a la industria que se encontró en pleno crecimiento hasta la década de los años ochenta cuando, ante la liberalización del mercado nacional debido a la deuda pública, muchas vitivinícolas fueron incapaces de competir con los vinos extranjeros y quebraron. Recientemente, se ha dado un nuevo impulso a la industria vitivinícola nacional, lo que ha logrado consolidar más de 300 vinos nacionales de calidad (Martínez, 2015).

2.2 Importancia del cultivo y datos asociados a la producción y consumo de vino

Con base a los datos de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV), en el 2014 se produjeron 75 millones de toneladas de uva en una superficie de 7.6 millones de hectáreas a nivel mundial, lo que coloca al cultivo de la vid como uno de los frutos con mayor producción en el mundo junto con la naranja, plátano, manzana y tomate (Jackson, 2014). Los principales productores de uva a nivel mundial son China con 13 millones de toneladas métricas, Italia con 7 millones de toneladas métricas, Francia con 6 millones de toneladas métricas, España con 6 millones de toneladas métricas y Estados Unidos con 7

millones de toneladas métricas (Figura 1). En América destaca, por supuesto, Estados Unidos de América, Argentina con 2 millones de toneladas métricas, Chile con 2 millones de toneladas métricas y México con 300 mil toneladas métricas (OIV, 2019).

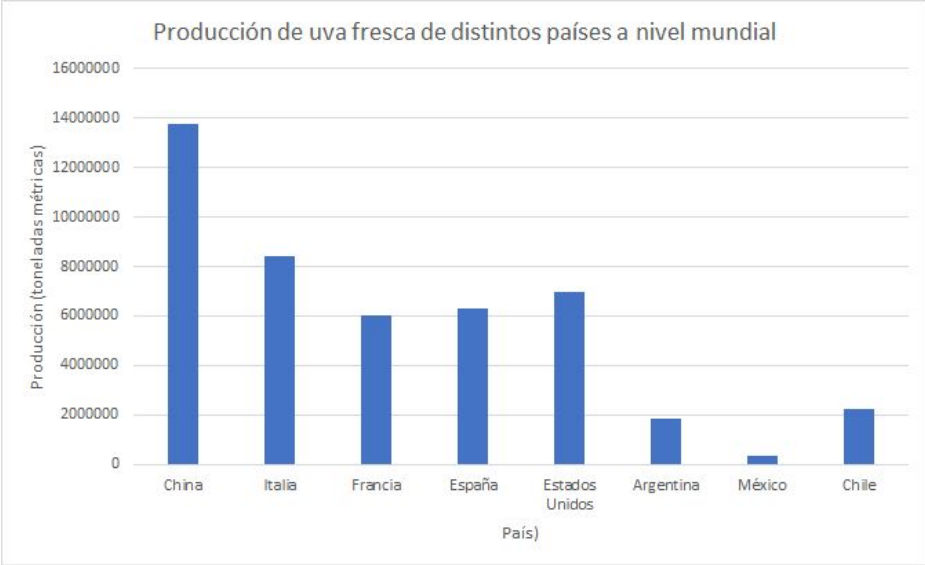


Figura 1. Principales productores de uva a nivel mundial (OIV, 2019).

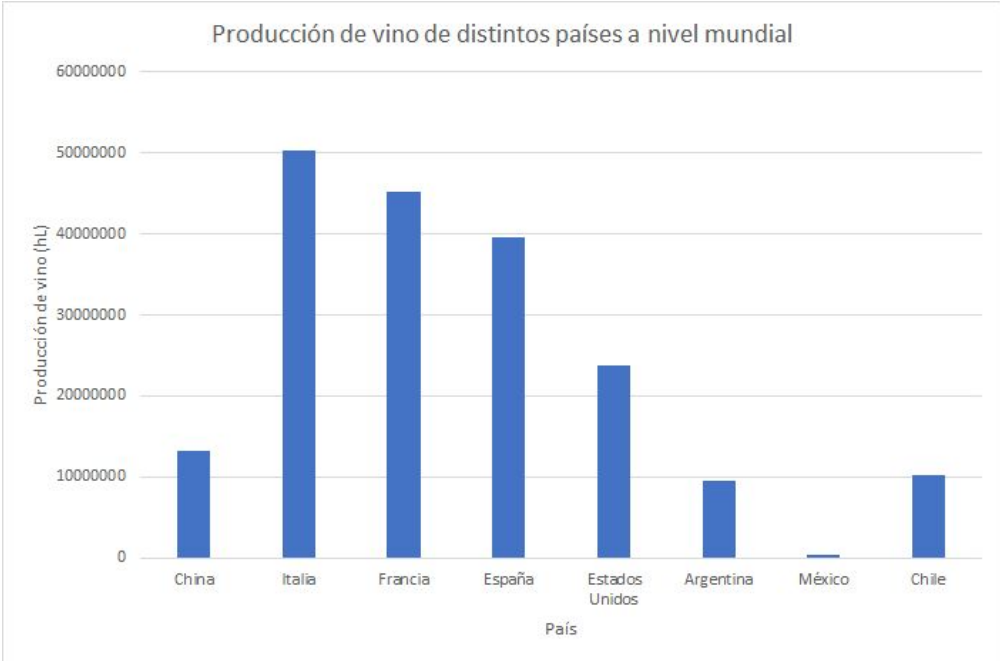


Figura 2. Principales productores de vino a nivel mundial (OIV, 2019).

Dentro de la producción mundial de uvas, cerca del 66% se transforma en vino, 32% se consume en fresco y el restante 2% se emplea para la producción de pasas (Jackson, 2014).

En cuanto a producción de vino, Italia es el principal productor, seguido de Francia, España, Estados Unidos y China (Figura 2) (OIV, 2019). En relación con el consumo per cápita de vino, se ha observado una tendencia a la baja en el consumo en algunos países (sobre todo en la región europea) pero la tendencia de consumo en general, a nivel mundial, muestra cifras ligeramente a la alza y estables desde el año 2010, con un consumo anual de cerca de 240 millones de hectolitros. Algunas de las causas propuestas para la reducción del consumo per cápita en algunos países es el cambio hacia un consumo menos habitual de vino por un consumo sólo en ocasiones especiales de vinos con mejores características sensoriales aunque, en el caso de los países europeos, se puede asociar también a un aumento en el consumo de diversos destilados (Jackson, 2014; OIV, 2019).

2.3 Situación del cultivo de la vid y producción de vino en México y Querétaro

En México, las principales regiones productoras de uva son Baja California, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Guanajuato, Zacatecas, Aguascalientes, Querétaro y San Luis Potosí. De la producción nacional del 2017, el 82% se destinó a consumo en fresco, 3% a uva pasa y 15% a su industrialización (Consejo Mexicano Vitivinícola, 2019).

En la región de Querétaro se cuenta con 259 hectáreas dedicadas al cultivo de la vid y, actualmente, el estado es segundo lugar nacional en volumen de producción y primer lugar como exportador nacional de fermentados de uva (Borboa, 2018).

Con base en datos del Consejo Mexicano Vitivinícola (por sus siglas, CMV), desde el año 2002 ha existido un incremento sostenido en el consumo de vino en el país, pasando de 250 mL per cápita en ese año a 960 mL per cápita en el 2017, siendo el vino tinto el más consumido en el país. En cuanto al mercado nacional, cerca del 70% del vino disponible corresponde a vinos extranjeros con una participación discreta del vino nacional, lo que se

asocia a una reducida producción en la región, pues con ésta sólo se cubre el 30% de la demanda nacional.

Actualmente, existe un impulso constante a la industria vitivinícola nacional que se traduce en la consolidación de vinos de calidad con prestigio internacional (Consejo Mexicano Vitivinícola, 2019).

2.4 *Vitis* spp.

2.4.1 Clasificación y distribución geográfica

La familia *Vitaceae* posee más de 15 géneros botánicos, entre ellos *Vitis*. En este último se incluyen dos subgéneros: *Euvtis* (con 38 cromosomas) y *Muscadinia* (40 cromosomas). A su vez, *Euvtis* se encuentra subdividido en 11 series, estando *Vitis vinifera* en la undécimo primera (Hidalgo, 2003; Chávaro-Ortíz, 2014). Las variedades silvestres de la *Vitis vinifera* se desarrollaron en zonas con clima templado ubicadas en el hemisferio norte (sobre las isothermas de 10 °C y 20 °C) pero, al extenderse la vid por todo el planeta, esta pudo adaptarse también a condiciones climáticas similares en el hemisferio sur (Sudamérica, Australia, Nueva Zelanda y Sudáfrica, específicamente); sin embargo, el género *Vitis* se encuentra ampliamente distribuido en el mundo, existiendo especies como *Vitis labrusca*, *Vitis riparia*, *Vitis californica* y *Vitis berlandieri*, entre otras, cuya área de desarrollo va desde el sur de Estados Unidos y Norte de México hasta regiones de Asia. La principal función de estas especies (principalmente las americanas) en la actualidad, es la de fungir como porta injertos para las variedades europeas, ya que estas especies americanas resisten el ataque de ciertos nemátodos y también filoxera (Diamandis *et al.*, 1997; Chávaro-Ortíz, 2014; Jackson, 2014). Es importante mencionar que estas especies americanas eran ya empleadas por los nativos americanos antes de la conquista española, elaborando bebidas en combinación con miel y otros frutos o utilizando a los mismos frutos como colorantes (Fundación de Investigaciones Sociales, 2018). En Norte América, se llevaron a cabo múltiples hibridaciones entre especies locales de *Vitis* sp. e incluso con variedades de *Vitis vinifera* europeas. Algunas de estas cruas entre variedades americanas y europeas dieron

como resultado variedades capaces de resistir a filoxera y además que conservaban sus características para ser empleadas en la vinificación; a pesar de que estas variedades no fueron aceptadas en Europa, su uso fue ampliamente aceptado en América, dando origen así a una nueva y vasta cantidad de vinos (Diamandis, *et al.*, 1997).

Dentro del subgénero *Muscadinia*, se engloban algunas especies como *Vitis rotundifolia* o *Vitis popenoei* (Diamandis, *et al.* 1997; Jackson, 2014) cuya distribución está localizada en el sur de Estados Unidos y Noreste de México.

Actualmente, existe una gran cantidad de variedades de uva empleadas en la elaboración de vinos, siendo tal vez las más representativas y conocidas dentro de las variedades blancas Chardonnay y Sauvignon Blanc, mientras que en uvas tintas se pueden mencionar Pinot noir, Cabernet sauvignon, Merlot y Syrah, entre muchas otras (Jackson, 2014).

2.4.2 Condiciones que afectan el desarrollo de la vid

La vid se desarrolla en condiciones climáticas similares a las de las regiones en donde se desarrolló inicialmente, es decir, regiones con una temperatura media de 10 °C y 20 °C con un clima mediterráneo, situadas entre las latitudes 50° norte y 40° sur, con una altitud que no supere los 800 a 900 metros sobre el nivel del mar; sin embargo, algunas variedades también son cultivadas en regiones más cálidas e incluso regiones subtropicales con variaciones en las prácticas de cosecha o en el proceso para compensar los efectos del clima (Hidalgo, 2003; Jackson, 2014).

El desarrollo de la vid depende de un conjunto de condiciones y prácticas denominado como “terroir” que abarca el clima, el suelo, la variedad de uva empleada y las prácticas agrícolas (Girard, 2004).

El suelo se reconoce como uno de los factores que menor impacto directo tienen sobre la uva y la calidad del vino; sin embargo, es importante caracterizar y evaluar parámetros de relevancia del suelo como lo es la textura, la disponibilidad de nutrientes, la capacidad de retención de agua, el pH, profundidad y la retención de calor. Es importante mencionar que

la uniformidad de estos criterios en el suelo del viñedo es vital para garantizar la calidad del vino y una maduración uniforme de la uva.

Con respecto a la topografía del terreno, mucha de la evidencia disponible es circunstancial; sin embargo, sí se ha observado evidencia relativa a la altitud, latitud e inclinación del viñedo. Lo anterior tiene un impacto en la temperatura del viñedo, el grado de exposición a la luz solar y, por tanto, influye en la maduración de las uvas y en la modificación de las características iniciales del suelo (Jackson, 2014).

La influencia atmosférica es quizá una de los factores con mayor relevancia en el desarrollo de la vid y la uva. En este grupo se incluye :

- Acumulación de calor: hace referencia a los meses del año con una temperatura superior a 10 °C.
- Temperatura: influye en el desarrollo de los brotes o en la aclimatación a temperaturas bajas previa dormancia, en el desarrollo de las flores, etc. De manera general, temperaturas por encima de los 25 °C favorecen una acumulación de carbohidratos en la uva y una reducción en la acidez de la uva, ocurriendo lo opuesto a temperaturas menores a 25 °C. Lo anterior es de relevancia pues el sabor, el color, la estabilidad y el potencial de añejamiento dependen fuertemente del contenido de azúcares y ácidos en la uva. Con respecto a las antocianinas, compuestos polifenólicos abundantes en uvas tintas, se reconoce que temperaturas diurnas de entre 20-25 °C y nocturnas de entre 10-15 °C favorecen la síntesis de antocianinas en el fruto; en el caso de la variedad de Cabernet sauvignon (de interés en el presente trabajo), se sabe que la máxima acumulación de antocianinas se presenta a temperaturas de entre 23-25 °C (Figura 3).

(Jackson, 2014).

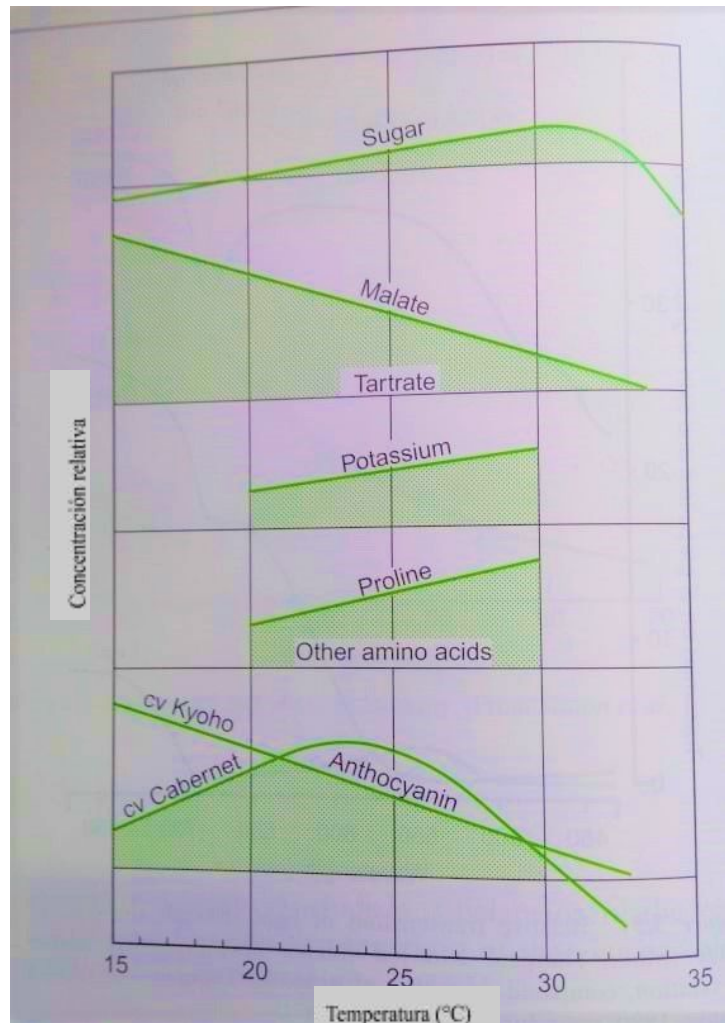


Figura 3. Influencia de la temperatura en el desarrollo de la uva y en la aparición de compuestos para variedades Kyoho y Cabernet sauvignon. (Modificado de Jackson, 2014).

Como se expuso previamente, para la síntesis de antocianinas se reconoce que días cálidos (20-25 °C) y noches frías (10-15 °C) favorecen una óptima síntesis de estos compuestos; sin embargo, la exposición solar juega un rol importante en la temperatura a la que puede estar expuesta la vid pues, al no emplear toda la luz solar que recibe, mucho del exceso de radiación absorbida se libera en forma de calor. En condiciones en las cuales las hojas se encuentren ubicadas adecuadamente en el espacio, se favorezca el flujo del aire y se cuente

con un sistema de irrigación adecuado, la temperatura en la vid no superará más de 5 °C con respecto a la temperatura del aire; en cambio, si no hay suficiente aireación y no existe una adecuada irrigación, la temperatura en la vid puede ser tan alta como 40 °C (Jackson, 2014).

En la región queretana correspondiente a el municipio de El Marqués, donde se producen las uvas variedad Cabernet sauvignon de interés en el presente trabajo, se presenta una temperatura media anual de 17.3 °C con temperaturas superiores a los 30 °C y menores a los 12 °C en distintos días a lo largo de todo el año (Instituto Nacional de Geografía y Estadística, 2017). Lo anterior asociado con la información expuesta en los párrafos anteriores, se puede relacionar con una baja síntesis de antocianinas en las uvas producidas en la región.

Como se ha apreciado en los párrafos anteriores, es evidente que las prácticas agrícolas son un complemento de suma importancia que permite garantizar la calidad del vino. Éstas prácticas se refieren a la poda, irrigación, fertilización, control de enfermedades, criterios de colecta, replicación y manejo del crecimiento de la vid.

(Jackson, 2014).

2.4.3 Descripción anatómica

La vid cultivada para la producción de vino se puede dividir en dos partes: una parte radical y una parte aérea. La parte radical corresponde a las variedades americanas del género *Vitis* mientras que la parte aérea corresponde a *Vitis vinifera* de alguna variedad definida (Grupo de Investigación en Viticultura, 2018).

La parte radical (Figura 4) tiene como función principal ser el soporte de la planta, permite la absorción de agua y minerales así como el almacenamiento de distintas sustancias.

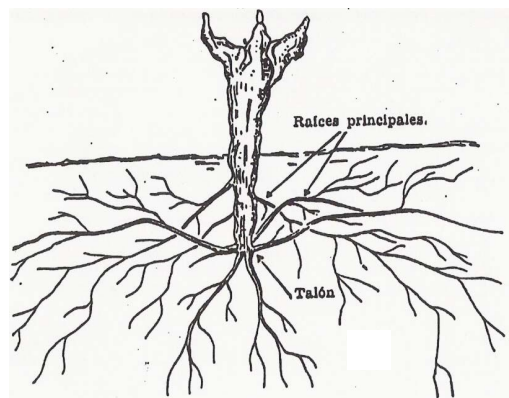


Figura 4. Distribución del sistema radicular de la vid (Grupo de Investigación en Viticultura, 2018).

La parte aérea (Figura 5) se puede describir como una planta trepadora leñosa, polígama (con flores hemafroditas y con flores unisexuadas tanto masculinas como femeninas), hemafrodita y rara vez dioica (ausencia de flores masculinas y femeninas en tallos y troncos por separado). Sus partes principales son el tronco, los brazos o ramas y los brotes (también denominados “pámpanos”) (Chávaro-Ortíz, 2014; Grupo de Investigación en Viticultura, 2018).

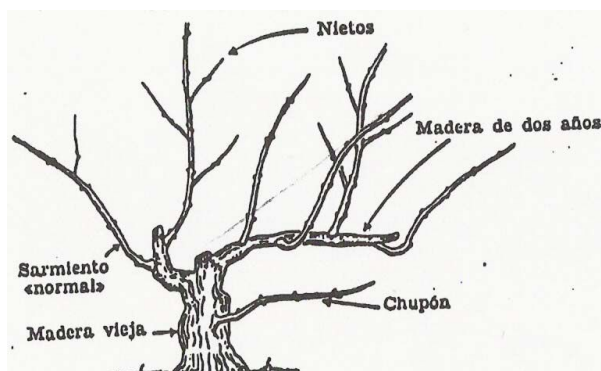


Figura 5. Parte aérea de la vid (Grupo de Investigación en Viticultura, 2018).

La inflorescencia o racimo de la vid es un órgano dispuesto de manera opuesta a la hoja. Una vid sana desarrolla de uno a tres racimos por pámpano fértil. El racimo se compone de un tallo principal denominado pedúnculo hasta la primera ramificación, lo que genera los

hombros o alas. El eje principal o raquis en conjunto con las alas se siguen ramificando hasta producir las últimas estructuras llamadas pedicelos, los cuales portan la flor en su extremo terminal. Todo el conjunto de ramificaciones es conocido como raspón o escobajo (Figura 6) (Grupo de Investigación en Viticultura, 2018).

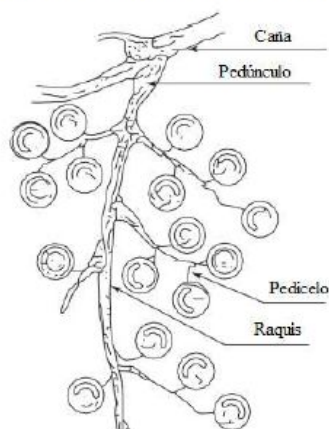


Figura 6. Esquema de un racimo típico desarrollado en una vid (Grupo de Investigación en Viticultura, 2018).

Cada racimo originará de 50-100 flores en racimos pequeños o hasta 1,000 o 1,500 flores en racimos grandes. Se denomina “racima” a los racimos desarrollados a partir de yemas prontas, los cuales no alcanzan un desarrollo completo (Grupo de Investigación en Viticultura, 2018).

La flor de las variedades domesticadas son hermafroditas y se componen de un cáliz de cinco pétalos, corola o caliptra que protege los órganos sexuales, androceo (estambres que contienen el polen) y el gineceo (ovario con dos carpelos y dos óvulos por carpelo) (Grupo de Investigación en Viticultura, 2018).

El fruto es una baya esférica u ovalada de 12 a 188 mm de diámetro (Figura 7). El fruto consta de tres partes fácilmente diferenciables:

- Pericarpo u hollejo: parte más externa de la uva que brinda protección. Es elástica, cutinizada y presenta una capa cerosa externa denominada pruina, sobre la cual se

fijan las levaduras ambientales a la uva. Su color depende de la fase de desarrollo del fruto: verde en la fase herbácea y desde el envero de color amarillo en variedades blancas o rosado violáceo en variedades tintas. Es en esta capa donde residen las antocianinas y flavonoides encargadas del color en variedades tintas, así como ácidos orgánicos en menor proporción.

- Mesocarpo o pulpa: representa la mayor parte del fruto y presenta una coloración nula o discreta. Rica en agua, carbohidratos, ácidos y especies involucradas en el aroma. Se encuentra recorrida por haces conductores.
- Endocarpo o pepitas: las semillas (hasta cuatro por baya) se encuentran rodeadas por el endocarpo. Ricas en lípidos y taninos.

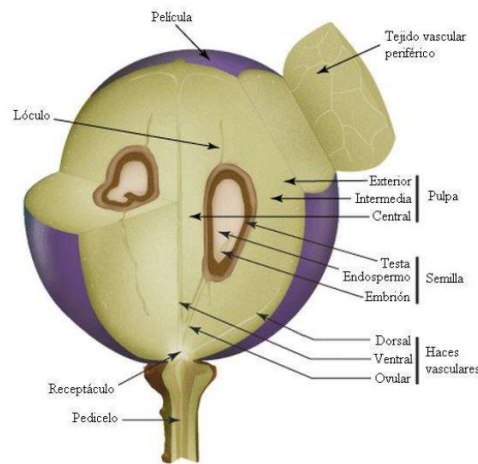


Figura 7. Morfología de la baya (Grupo de Investigación en Viticultura, 2018).

2.4.4 Fisiología de la vid

La vid presenta un ciclo vegetativo de desarrollo interanual o anual, si se encuentra en condiciones climáticas mediterráneas. El primero consta de cuatro periodos: el primero de crecimiento para adquirir su forma adulta la cual dura menos de tres años; el segundo es cuando la planta ha alcanzado su fase adulta y comienza una producción creciente durante 10 años; la tercera etapa se caracteriza por una producción más estable y; finalmente, la

cuarta etapa se caracteriza por una reducción en la producción por la entrada de la planta en decaimiento.

Dentro del ciclo vegetativo anual se pueden distinguir distintas etapas:

- Lloro: al incrementar la temperatura del suelo, el sistema radical comienza a distribuir líquidos en la vid. Esta etapa se puede evidenciar mediante la salida de savia por las heridas ocasionadas por la poda.
- Desborre: las yemas comienzan a desarrollarse.
- Crecimiento de brotes: el brote se desarrolla a lo largo en función del agua disponible y a lo ancho, igual que lo hacen la madera de dos años o más antigua.
- Agostamiento: consiste en la lignificación del brote, lo que brinda el carácter perenne a la vid (la protege de temperaturas de hasta $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$). Las hojas caen y el metabolismo entra en un período de letargo.

(Winker, *et al.*, 1974).

El ciclo reproductivo de la vid comprende las siguientes etapas:

- Iniciación floral: formación de las flores sobre las cuales se desarrollarán los frutos. Comienza con un desarrollo en pequeños grupos de flores para dar paso al desarrollo completo y diferenciado de la inflorescencia.
- Floración, polinización, fecundación y cuajado: comienza con la pérdida de la caliptra en las flores dejando expuesto así los órganos sexuales de la flor. El proceso completo puede llevar de tres a cinco días en una misma planta. El grano de polen cae sobre el estigma y, si ocurre la fecundación, se desarrollará el fruto (cuajado).
- Desarrollo y maduración: comienza la división celular, con un período completo de maduración entre 40 y 50 días. Esta etapa presenta un comportamiento doble sigmoideal (Figura 8). La baya comenzará a aumentar de tamaño y su composición cambia, en cuanto a carbohidratos y ácidos.

Durante la maduración, se acumulan en proporción casi igual la glucosa y la fructosa, mientras que la acidez se reduce considerablemente en cuanto a ácido málico. El clima influye en los patrones de aparición o degradación de estos componentes. Tras algunas semanas, algunos frutos podrán caer al no haberse dado una fecundación exitosa o por aborto del embrión (Jackson, 2014).

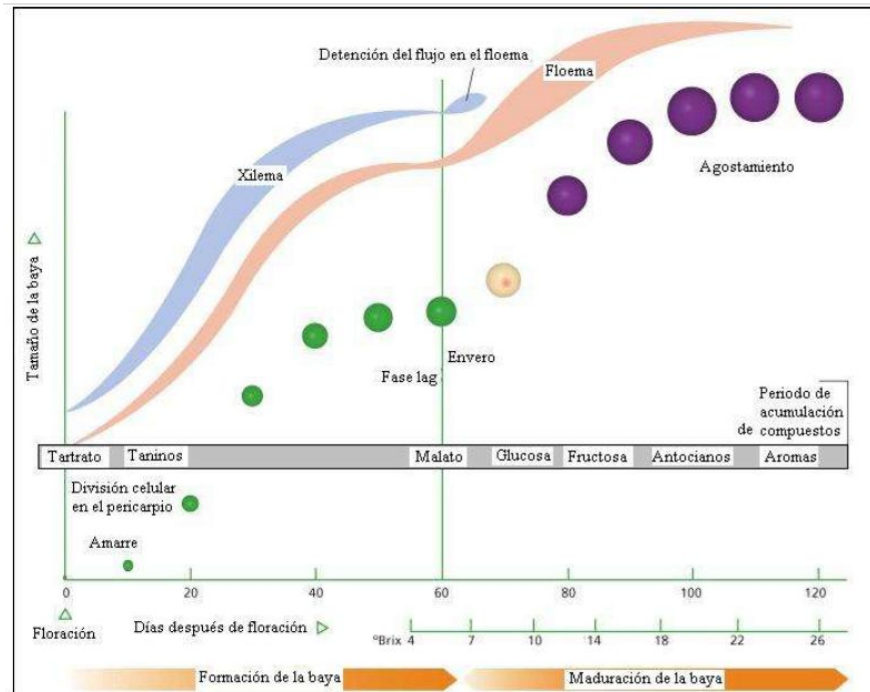


Figura 8. Ciclo reproductivo de la vid (Chávaro-Ortíz, 2014).

2.5 Composición química de la uva y el vino

La cantidad de compuestos involucrados en el perfil sensorial del vino identificados han aumentado drásticamente en los últimos años, esto asociado principalmente a distintas técnicas analíticas como la cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés), la espectrometría de masas, espectroscopia infrarroja, resonancia magnética nuclear, entre otras.

Más de 1,000 moléculas han sido identificadas, con concentraciones que van desde 10^{-6} hasta 10^{-1} mg/L. De manera individual tienen un bajo o nulo impacto en la percepción humana, sin embargo, al actuar en conjunto presentan un impacto significativo (Diamandis *et al.*, 1997; Jackson, 2014).

Dentro de este amplio universo de moléculas, la mayoría de aquellas que tienen un impacto en la percepción sensorial provienen del metabolismo de las levaduras más que de la propia uva (Diamandis *et al.*, 1997; Chávaro-Ortíz, 2014; Jackson, 2014); sin embargo, no por esto los compuestos propios de la uva son irrelevantes pues aportan características típicas de la variedad empleada. Un vino contiene en promedio de 0.8-1.0 g/L de moléculas volátiles, de las cuáles el 50% corresponde a diversos alcoholes producidos en la fermentación y el resto se divide en lactonas, compuestos carbonílicos, fenoles, terpenos, compuestos azufrados y nitrogenados diversos que contribuyen al vino con aromas característicos. Por otra parte, los compuestos involucrados en el sabor y percepción bucal del vino se encuentran en concentraciones superiores a 0.1 g/L como lo son el agua, el etanol, ácidos fijos (tartárico, málico y láctico), glicerol y carbohidratos (Diamandis *et al.*, 1997; Jackson, 2014).

El agua es el principal componente de la uva y, por tanto, del vino. Es de vital importancia en la adquisición de las características del vino pues es indispensable en el crecimiento de la vid, el desarrollo de la fermentación y en la maduración del vino. Asimismo, sólo aquellos compuestos parcial o totalmente solubles en agua juegan un papel importante en el vino (Diamandis *et al.*, 1997; Jackson, 2014).

Los principales carbohidratos presentes en la uva son la glucosa y la fructosa, los cuales se encuentran en concentraciones casi iguales. La sacarosa y otros carbohidratos se encuentran en menor concentración dentro de las variedades de *Vitis vinifera*. El contenido de carbohidratos dependerá de la madurez, variedad, salud de la fruta y especie, alcanzando concentraciones de 20% m/v o superiores en la madurez óptima (Hidalgo, 2003; Jackson, 2014). Dentro de la fermentación, *Saccharomyces cerevisiae* emplea como fuente de carbono a la glucosa, la fructosa y la sacarosa; de esta forma, en vinos secos (con un

contenido menor a 1.5 g/L de carbohidratos) los principales carbohidratos residuales corresponden a pentosas como arabinosa, ramnosa y xilosa. La importancia de los carbohidratos radica en ser (como se mencionó previamente) la fuente de carbono para las levaduras en la fermentación para así dar paso a la aparición de etanol, alcoholes superiores (alcoholes con tres o más átomos de carbono), ésteres de ácidos grasos, ácidos orgánicos y distintos compuestos carbonílicos que impactan en el perfil sensorial del vino (Diamandis *et al.*, 1997; Hidalgo, 2003).

Los polisacáridos presentes en el vino se componen principalmente de pectinas, gomas y sustancias relacionadas, procedentes principalmente de la uva. Éstos son parcialmente solubles en soluciones acuosas y son extraídos tras el estrujado y prensado. Éstos, en combinación con etanol del medio, pueden precipitar y se hace necesario el tratamiento del vino mediante enzimas o tratamientos mecánicos para removerlos del vino terminado (Diamandis *et al.*, 1997; Jackson, 2014).

El etanol es, sin duda alguna, el compuesto más importante producido durante la fermentación. En condiciones estándar y de manera general, se obtiene un contenido de 10-13% v/v al final de la fermentación dependiendo de la levadura empleada, la temperatura de fermentación y el contenido de carbohidratos y nitrógeno (Hidalgo, 2003; Jackson, 2014). El etanol es crucial tanto en el proceso como en el producto terminado: en el proceso, conforme su concentración incrementa, va limitando el desarrollo de gran cantidad de microorganismos permitiendo a *Saccharomyces* spp. dominar en la fermentación, facilita la solubilización de compuestos fenólicos, otros compuestos apolares y compuestos provenientes de la maduración en roble, además de que participa en la aparición y estabilidad de diversos ésteres al combinarse (junto con otros alcoholes) con compuestos carbonílicos; asimismo, el etanol combinado con el pH del vino y la adición de SO₂ al inicio de la vinificación permiten que el vino se conserve por años en ausencia de oxígeno (Diamandis *et al.*, 1997; Jackson, 2014).

El metanol es un componente minoritario en el vino y no supone un riesgo a la salud cuando se siguen prácticas de elaboración estándar. Este alcohol proviene de la acción

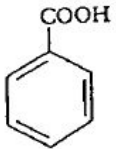
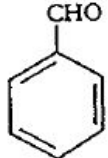
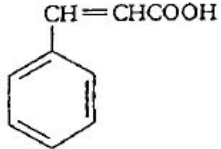
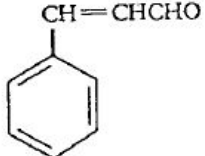
enzimática sobre grupos metoxilo de pectinas presentes en el mosto de uva, lo que libera metanol al medio acuoso; sin embargo, la uva es un fruto con un contenido bajo de pectina. Otros alcoholes de importancia en el vino son los alcoholes superiores como el 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol, los cuales provienen de la deaminación de ciertos aminoácidos o de ciertos aldehídos, es decir, del metabolismo de las levaduras empleadas en la vinificación (Diamandis *et al.*, 1997; Hidalgo, 2003; Jackson, 2014).

El glicerol es uno de los componentes más abundantes en vinos secos sólo tras el agua y el etanol. A pesar de que se le asociaba con aportar al vino un gusto dulce y cierta viscosidad, estudios recientes ponen en duda estos beneficios pues raramente se logra presentar en el vino en cantidades suficientes como para ser percibido sensorialmente (Jackson, 2014).

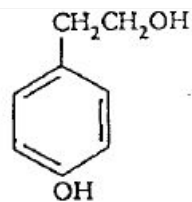
Los ácidos presentes en el vino se pueden dividir como volátiles o fijos. En el caso de la acidez volátil, se hace referencia a distintos ácidos con una alta volatilidad como el ácido acético, fórmico, butírico, etc. y, en el segundo caso, se hace referencia principalmente al ácido tartárico y málico. En realidad, son más los ácidos orgánicos presentes en el vino como lo son el ácido fumárico, láctico, cítrico, glucónico, succínico, ascórbico, etc. (Diamandis *et al.*, 1997; Jackson, 2014).

Los compuestos fenólicos en los vinos abarcan una gran variedad de moléculas que impactan de manera significativa en su calidad, sobretudo en vinos tintos. Estos compuestos influyen en la apariencia, textura, sabor, aroma y propiedades antimicrobianas del vino. Su origen, así como sus estructuras, son muy diversas ya que pueden proceder de la propia uva, del proceso fermentativo (en menor medida) o de la maduración en bodega de roble. Químicamente, los compuestos fenólicos son moléculas de benceno con uno o más grupos hidroxilo asociados. Las dos grandes categorías dentro de estas moléculas son los flavonoides y los no flavonoides (Tabla 2).

Tabla 2. Compuestos polifenólicos presentes en la uva y el vino.

Tipo general	Estructura	Ejemplos	Fuente principal
	No flavonoides		
Ácido benzoico		Ácido benzoico Ácido vainillínico Ácido gálico Taninos hidrolizables	Uva, roble Roble Uva, roble Uva
Benzaldehído		Benzaldehído Vainillina Sirangaldehído	Uva, roble, levadura Roble Roble
Ácido cinámico		Ácido p-cumárico Ácido ferúlico Ácido clorogénico Ácido cafeico	Uva, roble Uva, roble Uva Uva
Cinamaldehído		Coniferaldehído Sinapaldehído	Roble Roble

Tirosol

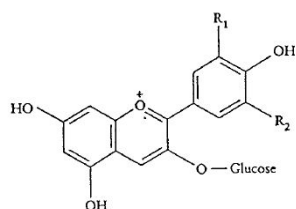


Tirosol

Levadura

Flavonoides

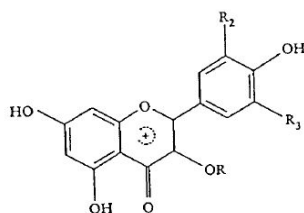
Flavonoles



Quercetina
Kaempferol
Miricetina

Uva
Uva
Uva

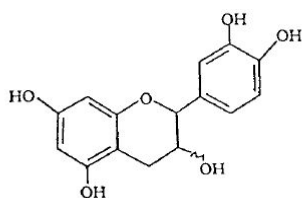
Antocianinas



Cianina
Malvidina
Petunina
Peonina

Uva
Uva
Uva
Uva

Flavan-3-oles



Catequina
Epicatequina
Galocatequina
Procianidinas
Taninos condensados

Uva
Uva
Uva
Uva
Uva

(Modificado de Diamandis, *et. al.*, 1997).

Los flavonoides son moléculas con dos fenoles unidos por un pirano (anillo aromático con oxígeno) entre los que destacan en el vino los flavonoles, catequinas (flavan-3-oles) y, en vinos tintos, las antocianinas.

Estos compuestos pueden existir de manera libre o polimerizados con otros flavonoides, azúcares, no flavonoides o alguna combinación de los anteriores (Diamandis *et al.*, 1997; Jackson, 2014).

La polimerización de flavan-3-oles (catequina y epicatequina) y sus ésteres de galato, produce oligómeros o polímeros denominados procianidinas las cuales se clasifican en función de sus monómeros, enlaces éster y propiedades funcionales. La forma más común en el vino es la que contiene enlaces carbono-carbono entre dos subunidades continuas; asimismo, se encuentran principalmente como dímeros aunque tienden a polimerizarse y dar paso a taninos condensados, procianidinas de tamaño medio con tres a cinco subunidades (Figura 9). Es posible establecer diferencias varietales con base en los perfiles de procianidinas de la piel o exocarpo de la uva, del mesocarpo o pulpa y del endocarpo o semillas (Diamandis *et al.*, 1997; Jackson, 2014) .

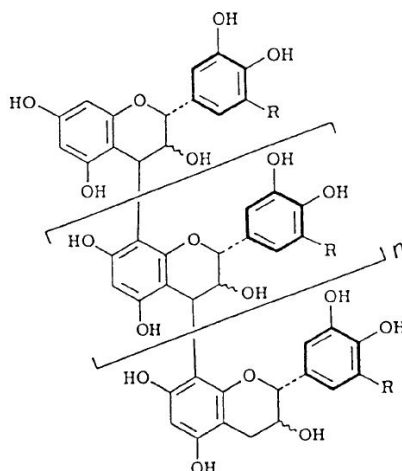


Figura 9. Estructura de una procianidina o tanino condensado (Modificado de Diamandis *et al.*, 1997).

Los flavonoides provienen principalmente del exocarpo o piel de la uva (antocianinas y flavonoles) o del endocarpo o semillas y tallos (catequinas). En vinos tintos, los flavonoides constituyen cerca del 85% del contenido fenólico (superior a 1,000 mg/L) mientras que en vinos blancos representa no más del 20% del contenido fenólico (menor a 50 mg/L). Dentro de los vinos tintos, la antocianinas juegan un papel vital en el color rojizo característico de este grupo (Diamandis *et al.*, 1997; Jackson, 2014).

Los principales no flavonoides presentes en los vinos (no madurados en barrica de roble) son derivados del ácido hidroxicinámico e hidroxibenzoico. Son más sencillos estructuralmente que los flavonoides y se encuentran almacenados en vacuolas del fruto, lo que facilita su extracción en el estrujado. Pueden aparecer esterificados con alcoholes, carbohidratos y ácidos orgánicos. En el caso de vinos madurados en barrica de roble, se tiene una mayor concentración de derivados del ácido hidroxibenzoico, provenientes de taninos hidrolizables (compuestos de ácido elágico y/o ácido gálico con glucosa). Asimismo, la degradación de lignina libera cinamaldehído y derivados del ácido benzoico (Diamandis *et al.*, 1997).

En las condiciones ácidas propias del vino, la degradación de taninos hidrolizables (no flavonoides) se ve favorecida, mientras que los taninos condensados (compuestos por flavonoides) son relativamente estables en estas condiciones.

La extracción de flavonoides y no flavonoides depende de la temperatura, tiempo y superficie de contacto mosto-piel de uva, tipo de tanque de fermentación, contenido de SO₂, cepa de levadura empleada, pH y enzimas pectinolíticas; asimismo, el contenido de estos compuestos en la uva estará determinado por el clima, la temperatura de desarrollo de la uva, la variedad de uva y el proceso de vinificación empleado.

Los no flavonoides provenientes de la uva se sintetizan a partir de fenilalanina, mientras que aquellos provenientes de la levadura se sintetizan a partir del ácido acético. En cambio, los flavonoides se sintetizan a partir de una combinación de derivados sintetizados a partir de fenilalanina y ácido acético.

La concentración de los polifenoles del vino irá disminuyendo tras la fermentación debido a su precipitación con proteínas o con residuos de levadura. De igual forma, disminuirá su concentración durante las etapas posteriores de maduración y demás operaciones finales (Diamandis *et al.*, 1997).

Otro grupo relacionado con los compuestos fenólicos del vino son las flavonas y fitoalexinas. Dentro de este último grupo se encuentra el resveratrol (Jackson, 2014),

presente en la piel o pericarpio de uvas tintas con beneficios en el control de la diabetes tipo 2 y cardiopatías (Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos, 2018).

2.6 Proceso de elaboración de vino

El proceso de elaboración de vino consta de distintas operaciones unitarias, iniciando desde la vendimia o colecta de la uva hasta el embotellado, con marcadas diferencias en el proceso dependiendo del vino que se desea producir (Figura 10) (Girard, 2004; Jackson, 2014).

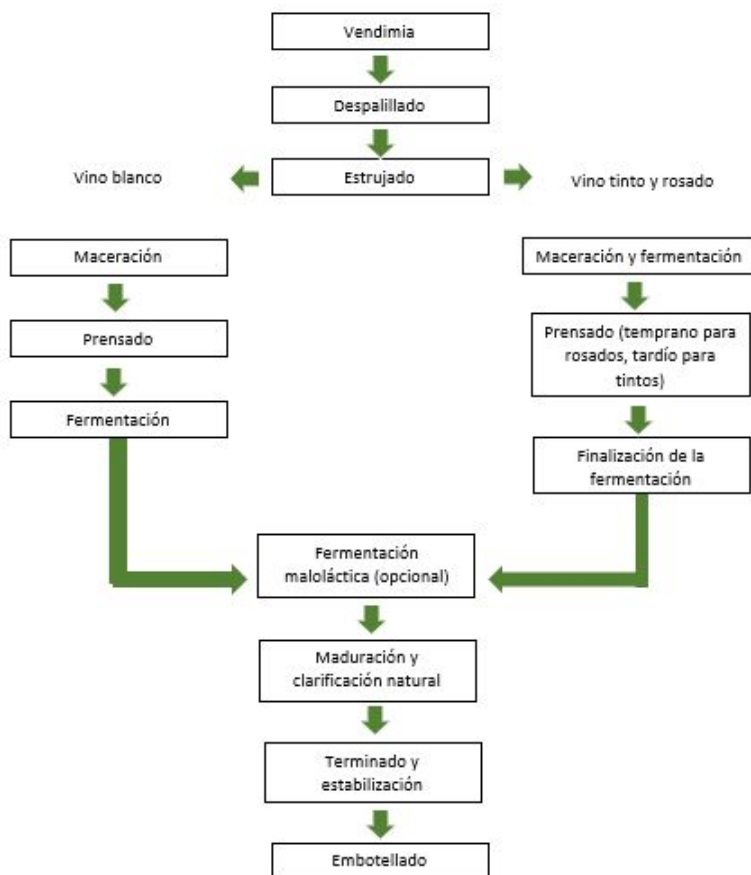


Figura 10. Proceso de elaboración de vinos tintos, rosados y blancos (Modificado de Jackson, 2014).

2.6.1 Vendimia

La vendimia consiste en recolectar y seleccionar uvas sanas y con un grado adecuado de madurez, lo que constituye un factor clave para la calidad del vino que se elaborará. El tiempo óptimo para realizar la vendimia se define mediante determinaciones constantes de acidez y contenido de azúcares (expresados como °Bx) en uva, así como por la evaluación del color de las uvas (por evaluación visual del color o bien por absorbancia a determinadas longitudes de onda o por cromatografía) y la facilidad con la que estas se desprenden del raspón (Girard, 2004; Jackson, 2014). La vendimia puede realizarse de manera mecánica o manual en función del presupuesto del viñedo, el estado del viñedo y el proceso de vinificación que se seguirá (Girard, 2004).

La vendimia es después colocada en refrigeración para retrasar así el desarrollo de microorganismos y reacciones enzimáticas no deseadas en esta etapa del proceso. Asimismo, debido al daño que pueden sufrir las uvas durante la colecta, se adiciona SO₂ para protegerlas contra la oxidación y el crecimiento microbiano (Girard, 2004; Jackson, 2014).

2.6.2 Evaluación de la calidad de la vendimia

Posteriormente, se evaluarán aspectos importantes de las uvas: sólidos solubles (°Bx), acidez total, integridad sanitaria y física de las uvas y, en el caso de variedades tintas, el contenido fenólico de las uvas (Jackson, 2014).

2.6.3 Selección y separación de material indeseable

Esta etapa permite la selección de uvas sin defectos y facilita la eliminación de materia extraña de tamaño pequeño como diversos insectos, metales y residuos de madera. Puede

realizarse de manera manual o mecánica, en función del presupuesto del viñedo (Girard, 2004; Jackson, 2014).

2.6.4 Despalillado y estrujado

El despalillado consiste en separar las uvas de hojas y raspones; mientras que el estrujado, que ocurre inmediatamente después del despalillado, consiste en aplastar ligeramente la uva para dejar expuesto el mosto a la actividad microbiana durante la fermentación (Girard, 2004; Jackson, 2014). Ambas operaciones ocurren por separado ya que, de esta forma, se evita la extracción de compuestos fenólicos y lípidos de los tallos aunque, puede desearse en variedades pobres en fenoles (como Pinot noir) o para enriquecer el contenido fenólico de vinos tintos (Jackson, 2014).

2.6.5 Operaciones comunes para vinificaciones en blanco y en tinto

Sulfitado

El sulfitado consiste en la adición de SO_2 al mosto de uva, ya que inhibe el desarrollo de bacterias, hongos y ciertas levaduras, limita la oxidación del mosto al reaccionar con el oxígeno presente para formar sulfitos (Figura 11), limita la actividad de enzimas oxidasas y acidifica el mosto lo que favorece la disolución de diversos compuestos (Girard, 2004; Jackson, 2014).

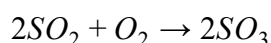


Figura 11. Reacción de oxidación del SO_2 en presencia de oxígeno (Girard, 2004).

El dióxido de azufre es especialmente efectivo contra bacterias, hongos y ciertos géneros de levaduras ya que, debido al pH bajo del mosto, se favorece la forma molecular del dióxido de azufre (su forma más tóxica). Es importante mencionar que el dióxido de azufre se puede encontrar en dos formas en el mosto: libre (forma molecular altamente tóxica) o combinada (combinación con diversos aldehídos y cetonas de reducida eficiencia) (Girard,

2004; Jackson, 2014). El sulfitado debe realizarse horas antes de dar inicio a la fermentación para evitar dañar a las levaduras en el caso de una fermentación iniciada por inoculación (Jackson, 2014).

La dosificación típica de SO_2 se encuentra entre 50-100 mg/L mosto aunque estará en función del tipo de vino que se elaborará, el estado sanitario de la vendimia y la concentración de azúcares y ácidos en el vino; valores superiores se pueden aplicar en vendimias contaminadas con hongos. Una sobredosificación puede llevar a la aparición de características sensoriales indeseables y a poner en riesgo la salud del consumidor, ya que en concentraciones fuera de las especificadas, el SO_2 puede suponer un riesgo severo para el ser humano (Girard, 2004; Jackson, 2014).

Las principales fuentes de SO_2 son las sales de bisulfito o metabisulfito de potasio o de sodio, ya sea aplicadas en forma de pastillas efervescentes, en polvo o en disolución (Girard, 2004).

Correcciones legales de la vendimia previa fermentación

En Europa, se permiten las correcciones de la vendimia pero con una obligatoriedad en su declaración y registro. Las correcciones de la vendimia comprenden la corrección de acidez y la corrección de azúcar o “chaptalización”.

La legislación europea es estricta en cuanto a los productos que pueden emplearse para las correcciones, así como en la cantidad de estos y en qué zonas de producción se pueden aplicar las correcciones (Girard, 2004; Jackson, 2014).

Maceración

La maceración consiste en la difusión de diversos componentes de la uva hacia el jugo. Depende principalmente de la temperatura, el tiempo y área de contacto uva-jugo, diferenciales de concentración, agitación, exposición a etanol o a preparaciones enzimáticas. En el caso de vinos tintos, la maceración puede tomar tanto tiempo como la

fermentación misma (pues se realizan al mismo tiempo, como se discutirá más adelante); o bien, períodos cortos de tiempo como en vinos blancos (Girard, 2004; Jackson, 2014).

Inoculación con levaduras

En un mosto con un nulo o sulfitado ligero, la fermentación se inicia de manera natural por parte de diversos géneros de levaduras; sin embargo, son las especies del género *Saccharomyces* spp. las que dominarán en gran parte de la fermentación. Esta forma de iniciar la fermentación tiene como principal característica el producir un vino con una alta variabilidad sensorial, lo que puede resultar positivo o negativo por igual. La principal y gran desventaja de este inicio de la fermentación es que genera resultados inconsistentes, lo que dificulta la producción de vino de una calidad constante (Jackson, 2014).

Otra forma de iniciar la fermentación es a través de la inoculación con una o varias especies seleccionadas para lograr una fermentación controlada; sin embargo, esta técnica resta tipicidad al vino. Una alternativa que combina ambas formas de iniciar la fermentación, consiste en la inoculación con levaduras aisladas seleccionadas del propio viñedo, lo que aporta tipicidad al vino y una calidad constante fermentación tras fermentación (Jackson, 2014).

2.6.6 Vinificación en tinto

Tras el despalillado y estrujado de la uva, se da inicio a la maceración y la fermentación al mismo tiempo, para favorecer la extracción, sobretodo, de compuestos polifenólicos (antocianinas, principalmente). La temperatura de fermentación-maceración influye considerablemente en la extracción de diversos compuestos del hollejo, siendo una temperatura de entre 25-30 °C la óptima para vinos tintos (Hidalgo, 2003; Girard, 2004).

La extracción de taninos y antocianinas (compuestos polifenólicos de mayor interés en vinos tintos) ocurre a tiempos distintos, siendo las antocianinas las primeras en extraerse por completo debido a que son más solubles en el medio líquido complejo del vino (3-5

días tras iniciar la maceración-fermentación), seguidas de los taninos (15-20 días tras iniciar la maceración-fermentación) (Figura 12). Generalmente, la maceración no suele extenderse por más de 3-5 días en el caso de vinos tintos que no se someterán a crianza; en cambio, maceraciones más largas son recomendables para vinos que sí entrarán a crianza (Girard, 2004; Jackson, 2014).

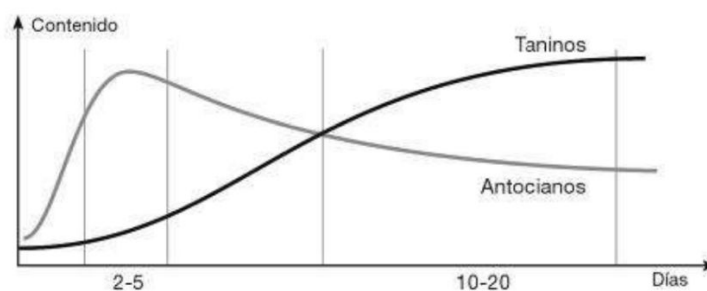


Figura 12. Extracción de antocianinas y taninos en función del tiempo de maceración.

(Blouin y Peynaud, 2003).

Durante la fermentación, el hollejo tiende a flotar formando una capa flotante denominada “sombbrero”, esto debido a la constante liberación de CO_2 por parte de las levaduras. Idealmente, se busca que el “sombbrero” se encuentre sumergido en el jugo y en contacto con mosto poco concentrado, por lo que se aplican dos técnicas: remontado o bazuqueo. El remontado consiste en mojar al “sombbrero” mediante el bombeo y aspersion de mosto del fondo del tanque de fermentación sobre el “sombbrero”; se puede realizar en presencia de aire si se realiza al inicio de la fermentación para promover el desarrollo de las levaduras o en ausencia de aire ya iniciada la fermentación para evitar la oxidación en el vino. En el caso del bazuqueo, se sumerge el sombrero en el mosto de manera manual o mecánica (Girard, 2004; Chávaro-Ortíz, 2014).

Una vez que se ha decidido parar la maceración (tras una fermentación completa o parcial del mosto), ya sea por desviaciones organolépticas o por la adquisición del perfil sensorial

deseado, el vino líquido se separa del hollejo, denominándose al producto líquido obtenido como “vino o caldo de yema”. El hollejo remanente se prensa varias veces a distintas presiones para obtener “vino de prensa”, el cual presenta un elevado contenido polifenólico, un color grisáceo (por materias en suspensión), amargor pronunciado, aroma terroso y pH y azúcares superiores a los del “vino de yema”. Con base en lo anterior, la combinación del “caldo de yema” y el “vino de prensa” dependerá de las características deseadas en el producto terminado (Girard, 2004; Jackson, 2014).

Tras la completa fermentación del mosto, se puede llevar a cabo la fermentación malo-láctica. Esta segunda fermentación tiene como objetivo reducir la acidez del vino mediante la inoculación de bacterias ácido lácticas, capaces de degradar el ácido málico a ácido láctico, lo que aporta un menor pH y un gusto ácido menos marcado. Asimismo, modifica el sabor del vino y aumenta su estabilidad microbiológica debido a un agotamiento de los nutrimentos residuales del mosto tras la primera fermentación (Jackson, 2014).

Una vez se ha completado la o las fermentaciones, se pueden aplicar correcciones al vino para compensar deficiencias que aparecieron durante la fermentación. Estas correcciones abarcan la acidificación, deacidificación, adición de azúcares, dealcoholización, entre otras. Es importante marcar que muchas de estas correcciones se encuentran prohibidas en distintas legislaciones en el mundo (Jackson, 2014).

2.6.7 Estabilización

Posteriormente, se estabiliza el vino, es decir, se siguen distintos procedimientos para evitar cualquier defecto en el perfil sensorial del vino ya producido. Estos procedimientos pueden ser:

- Estabilización de sales de tartrato: se busca evitar la precipitación de diversas sales de tartrato en el vino ya embotellado, lo que se logra sometiendo el vino previo embotellado a temperaturas por encima de su temperatura de congelación, a un

tratamiento con sales de tartrato para favorecer la cristalización o mediante la adición de ácidos orgánicos que retrasen el proceso de precipitación.

- Estabilización proteica: rara vez se presenta en vinos tintos, esto debido a la asociación de las proteínas con los taninos y su posterior precipitación. Puede provocar turbidez en el producto terminado. En caso de presentarse, se recurre a mantener temperaturas no muy elevadas en botella y la adición de diversos compuestos clarificantes (bentonita, principalmente).
- Estabilización de polisacáridos: polisacáridos como pectinas y algunos mucílagos pueden provocar complicaciones al momento de filtrar el vino e, incluso, turbidez en el mismo. Se emplean enzimas pectinolíticas que facilitan la eliminación de estos polisacáridos en el vino previo embotellado.
- Estabilización de taninos: los taninos, como se mencionó previamente, pueden asociarse con proteínas y favorecer cierta turbidez. Generalmente, una reducción en la temperatura favorece su precipitación; sin embargo, se puede recurrir a eliminar un exceso en taninos o proantocianidinas mediante la adición de distintas proteínas como albúmina, caseína, entre otras.
- Estabilización microbiológica: las condiciones propias del vino como un contenido bajo de carbohidratos (menor a 0.5 g/L) y un reducido pH (entre 3.3 a 3.6), garantizan cierta estabilidad microbiológica; sin embargo, en vinos dulces es necesaria la adición de compuestos como el dióxido de azufre (en concentraciones de 0.8-1.5 mg/L vino), ácido sórbico (en concentraciones de 200 mg/L); o bien, aplicar métodos físicos como la pasteurización o ultra filtración.
- Estabilización contra la oxidación: múltiples operaciones post-fermentación pueden introducir oxígeno al vino, haciendo necesaria su protección contra la oxidación mediante la adición de dióxido de azufre en distintas operaciones unitarias del proceso.

(Jackson, 2014).

2.6.8 Clarificación

El proceso continúa con la clarificación del vino, la cual permite la eliminación de partículas suspendidas y turbidez del vino mediante procesos físicos, es decir, se podría considerar como un complemento de la estabilización.

La clarificación puede realizarse de distintas formas:

- Trasvase del vino estabilizado de un recipiente a otro: se aplican varios trasiegos. En el primer trasiego, se eliminan levaduras, bacterias y residuos de la uva; en los trasiegos siguientes, se eliminará cualquier residuo de microorganismo, taninos precipitados, pigmentos y demás material precipitado producto de la estabilización. En esta operación, la sedimentación ocurre de manera natural o espontánea, por lo que se requieren períodos prolongados de tiempo para lograr resultados adecuados (Jackson, 2014).

Si no se dispone de tiempo para efectuar una cantidad suficiente de trasiegos, tal que se garantice la estabilidad y claridad del vino, se puede recurrir a cualquiera de estas dos operaciones:

- Centrifugación: consiste en someter al vino a una rotación a alta velocidad por varios minutos. Esta operación permite una sedimentación rápida a comparación de los trasvases. Es también de gran utilidad para tratar vinos con una elevada turbidez, pues si se recurre a un tratamiento por sedimentación natural, pueden ocurrir modificaciones sensoriales indeseables.
- Filtración: consiste en la retención física sobre un soporte (poroso o fibroso) de materia en suspensión o precipitada. Puede efectuarse previa maduración o previo embotellado. Generalmente, se aplica una pre clarificación para evitar un estancamiento del vino filtrado.

(Girard, 2004; Jackson, 2014).

2.6.9 Maduración y añejamiento

Ambos procesos pueden mejorar las características sensoriales del vino una vez terminada la fermentación. Sólo vinos elaborados con ciertas variedades de uva pueden ser sometidos a maduración como Cabernet sauvignon, Shiraz, Tempranillo, Nebbiolo y Pinot Noir para tintos y Sauvignon blanc, Riesling y Chardonnay para variedades blancas (Jackson, 2014).

La maduración en barrica tiene múltiples beneficios sobre el vino, como una estabilización del color y un enriquecimiento en compuestos fenólicos y aromáticos. La barrica empleada en la maduración es elaborada con roble (ya sea francés o americano), una planta perenne de la que se aprovecha su parte central o “duramen”, rica en polifenoles (ligninas, ácidos fenólicos y, sobretodo, taninos elágicos) y ácidos grasos, lactonas, terpenoles, alcanos y alquenos (Girard, 2004).

Una vez el vino se ha introducido en la barrica, ocurrirán diversos fenómenos. Uno de ellos es la oxigenación pues, a través de la madera y el tapón de la barrica, el oxígeno ingresa y favorece de esta forma reacciones de oxidación que favorecen la polimerización de taninos y antocianinas, lo que estabiliza el color del vino, le brinda una nueva tonalidad y reduce su astringencia y amargor. El trasiego entre barricas debe evitarse en medida de lo posible pues, puede introducir suficiente oxígeno en el vino como para el desarrollo de bacterias acéticas. Es siempre recomendable sulfitar el vino previa maduración y una limpieza regular de las barricas (Girard, 2004).

La maduración debe llevarse a cabo en condiciones definidas de humedad relativa y temperatura (humedad de entre 70-90% y una temperatura fresca de 15 °C, aproximadamente), así como en ciertas posiciones para evitar la evaporación del vino y el intercambio gaseoso con el exterior (Girard, 2004).

Por otra parte, el añejamiento consiste en una maduración pero ya en recipientes de vidrio, lo que permite el paso de la luz al vino para favorecer reacciones fotoquímicas en este, además de que permite una maduración en ausencia de oxígeno (condiciones reductoras), lo

que ocurre en algunos vinos como los vino base para espumosos y vinos de bajo precio (Girard, 2004; Jackson, 2014).

2.6.10 Embotellado

Previo embotellado del vino, se aplican distintos análisis como la tasa volumétrica alcohólica, azúcares reductores, acidez total y pH, acidez volátil, contenido de ciertos minerales, determinaciones de poblaciones microbianas y SO₂ libre y total. Asimismo, se pueden aplicar otras tantas metodologías analíticas para determinar la presencia y concentración de ciertos compuestos de interés; de igual forma, es de vital importancia evaluar sensorialmente el vino para asegurar la satisfacción del consumidor.

El embotellado se puede subdividir en cuatro operaciones menores:

- Enjuagado de botellas.
- Esterilización de la cadena de llenado.
- Llenado: se recomienda una temperatura de llenado de 5 a 25 °C, para conservar las características organolépticas del vino.
- Taponado.

(Girard, 2004).

Posteriormente, la botella debe mantenerse en condiciones estables de temperatura para evitar que el sello del corcho se pierda (Jackson, 2014).

2.6.11 Calidad del vino

En México, el vino se encuentra regulado por la NMX-V-012-NORMEX-2005 (que sustituye a la NMX-V-012-1986), la cual no se encuentra disponible en el catálogo de normas de la Secretaría de Economía. La versión anterior de la norma dicta que los análisis por realizar a un vino de mesa para su comercialización son: grado alcohólico (8.5-14 °GL), extracto seco reducido (mínimo 15 g/L), cenizas (mínimo 1 g/L), acidez total (4.5-10 g/L ácido tartárico), acidez volátil (máx. 1.2 g/L de ácido acético), acidez fija (mín. 4 g/L

ácido tartárico), metanol (máx. 300 mg/100 mL de alcohol 100%) y anhídrido sulfuroso total (máx. 300 ppm). (NMX-V-012-1986).

2.7 Levaduras

Las levaduras son hongos eucariontes, unicelulares, con reproducción por gemación o escisión, quimiorganótrofos, algunas pueden ser dimórficas y crecen como micelio, con células de un tamaño de 1-5 μ m de ancho y de 1 a 28 μ m de longitud. Asimismo, pueden presentar un metabolismo fermentativo u oxidativo. (Hidalgo, 2003; Franco-Díaz, 2018).

Las levaduras se distinguen de los hongos filamentosos por poseer un sólo núcleo y por presentar una pared celular única y diferente a la de los hongos filamentosos. Los hongos filamentosos presentan quitina en su pared celular como su principal componente; en cambio, las levaduras presentan β -1,3-D-glucanos (polímeros de glucosa) y manoproteínas (compuestas por polímeros de manosa unidos a proteínas) (Jackson, 2014). Estas últimas tienen una marcada relevancia en la industria vitivinícola pues se reconoce su capacidad de adsorber compuestos fenólicos (antocianinas y taninos, específicamente). Esta asociación física puede tener efectos positivos como una reducción en la astringencia y una menor agregación y precipitación de taninos; sin embargo, también se reconoce que puede reducir el contenido fenólico, la capacidad antioxidante y el color de los vinos tintos, así como reducir el contenido de volátiles y algunos ácidos grasos en el vino (Morata, *et al.*, 2003; Caridi, *et al.*, 2016).

2.7.1 Levaduras involucradas en la producción de vino

Existe una gran variedad de géneros de levaduras en la uva, ya sea en el receptáculo o en el pedicelo del racimo, en las hojas, en los sarmientos o bien, desarrollándose alrededor de heridas en el fruto o estomas. Estos géneros de levaduras corresponden a *Hansenula*, *Cryptococcus*, *Hanseniaspora*, *Candida*, entre otras tantas; sin embargo, las levaduras involucradas y deseadas en la fermentación del vino (del género *Saccharomyces*), se encuentran generalmente en números bajos (Hidalgo, 2003; Jackson, 2014).

Los géneros tanto de levaduras como de bacterias y hongos que se encuentran inicialmente en la uva son de poca relevancia en el proceso fermentativo, pues su desarrollo se ve muy poco favorecido debido a la alta acidez y elevada concentración de sólidos solubles del mosto, el rápido establecimiento de condiciones anaerobias, el sulfitado inicial del mosto y la creciente concentración de etanol conforme avanza la fermentación debido al desarrollo de *Saccharomyces* spp. (Jackson, 2014).

Conforme inicia la fermentación, predominan los géneros encontrados en la superficie de la uva como *Hanseniaspora* sp. y *Candida* sp. en concentraciones hasta del orden de 10^4 UFC/mL. Este desarrollo inicial, en condiciones de proceso adecuadas como se mencionó anteriormente, se verá rápidamente interrumpido; sin embargo, es importante mencionar que el desarrollo de estas levaduras nativas de la uva permite la aparición de diversos compuestos con impacto sensorial en el vino como lo son glicerol, varios ésteres, ácido acético y muchos otros compuestos que pueden tener un efecto positivo o negativo en el producto terminado (Jackson, 2014).

2.7.2 El género *Saccharomyces*

Bajo las condiciones expuestas en el anterior apartado, las levaduras pertenecientes al grupo *Saccharomyces sensu stricto* se verán ampliamente favorecidas para desarrollarse en el mosto de uva. Este grupo abarca a todas las levaduras de relevancia para la industria de la fermentación:

- *Saccharomyces cerevisiae*: encargada de conducir la mayor parte de la fermentación del mosto y de aportar gran cantidad de características sensoriales al vino. Es la levadura enológica por definición. Se encuentra poco distribuida en la naturaleza y se localiza principalmente en equipo de la vitivinícola (Redzepovic *et al.*, 2002; Jackson, 2014).
- *Saccharomyces bayanus*: capaz de tolerar y producir altas concentraciones de etanol, posee una alta resistencia al SO_2 y es capaz de fermentar en temperaturas

bajas, por lo que es de especial interés en la producción de vino blanco (Hidalgo, 2003; Orlic *et al.*, 2010).

- *Saccharomyces paradoxus*: ampliamente distribuida en ambientes naturales. Solía no considerarse como de utilidad en la elaboración de vino; sin embargo, diversos estudios recientes demuestran sus excelentes capacidades en el proceso fermentativo aunado a un impacto sensorial favorable en el vino producido por estas levaduras (Orlic *et al.*, 2007; Orlic, *et al.*, 2010).
- *Saccharomyces pastorianus*: levadura de desarrollo lento y un poder alcohológeno medio por lo que no se emplea en vino. Tiene la particularidad de producir cantidades apreciables de SO₂ (Hidalgo, 2003; Franco-Díaz, 2018)

Recientemente, se incluyeron tres especies más al grupo *Saccharomyces sensu stricto*:

- *Saccharomyces cariocanus*: se aisló de *Drosophila* sp. en bosques de Brasil.
- *Saccharomyces kudriavzevii*: aislada originalmente en Japón. Aislada del suelo.
- *Saccharomyces mikatae*: aislada originalmente en Japón. Aislada del suelo.

(Naumov, *et al.*, 2000).

Las células vegetativas de este género pueden ser ovaladas, cilíndricas o redondas. Asimismo, no son filamentosas, predominantemente diploides o poliploides y su reproducción es por gemación multilateral. Pueden esporular, formando cuatro ascosporas en el interior de ascas.

2.7.3 Desarrollo de la fermentación

Durante las primeras horas, las levaduras se adaptarán a las condiciones del mosto y, por lo tanto, no crecerán. La población inicial de levaduras dependerá de si el mosto ha sido inoculado o no con levaduras seleccionadas: en el primer caso, se tendrán una población de 10⁵-10⁶ UFC/mL o superiores de las levaduras inoculadas, mientras que en el segundo caso, se tendrá una población inicial de 10⁴ UFC/mL de algunos géneros de levaduras como *Hanseniaspora* spp. o *Candida* spp. Es importante recordar que en el caso de una

fermentación iniciada por inoculación, el desarrollo de otras levaduras ajenas a la inoculada, a pesar de que se desarrollarán en las primeras horas de la fermentación, será rápidamente interrumpido por el desarrollo del inóculo (Hidalgo, 2003; Jackson, 2014).

Tras la adaptación de las levaduras al mosto de uva, comienza la fase denominada exponencial, altamente influenciada por la temperatura, concentración de nitrógeno y otros nutrientes en el mosto (Moreno-Arribas y Polo., 2009). La fase dura de entre 3 a 6 días y la población de levaduras asciende hasta 10^7 - 10^8 UFC/mL.

Posteriormente, se alcanza la fase cuasi estacionaria en la cual las levaduras se mantienen viables pero no crecen por 2 a 10 días. Tras este período de tiempo, la población de levaduras se reduce debido a la falta de nutrientes y a la acumulación de sustancias tóxicas en el mosto (fase de declive o muerte) (Hidalgo, 2003; Moreno-Arribas y Polo., 2009)

En la Figura 13, se puede apreciar gráficamente el desarrollo de las levaduras en el mosto de uva durante la fermentación.

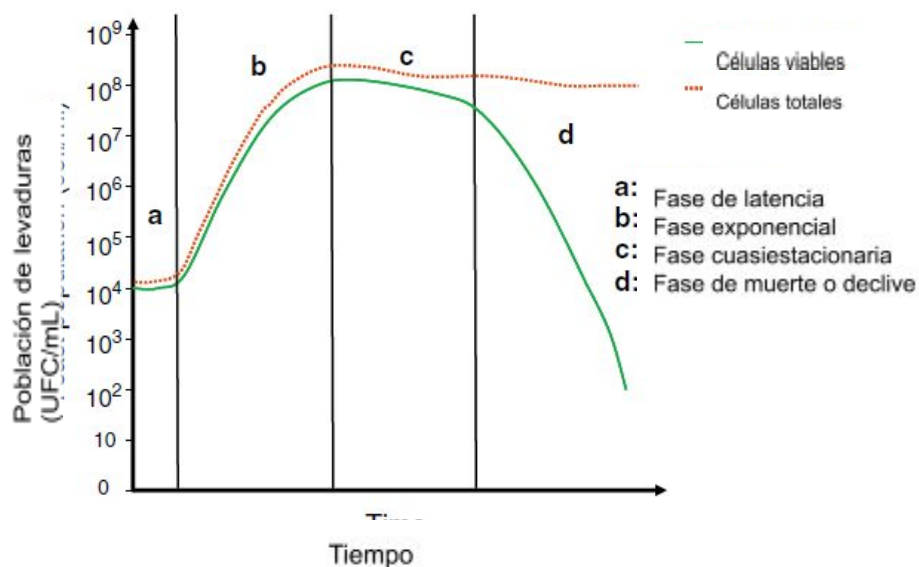


Figura 13. Desarrollo de levaduras durante la fermentación (Modificado de Moreno-Arribas y Polo, 2009).

2.7.4 Características deseadas en una levadura de interés enológico

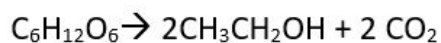
Las levaduras de interés enológico deben presentar ciertas características para así favorecer su implantación y adecuado desarrollo en el vino, garantizando además un impacto adecuado en el perfil sensorial del mismo. Los parámetros enológicos que se pueden evaluar en una levadura de interés son:

- Duración y eficiencia del proceso fermentativo: cinética de fermentación, eficiencia en la conversión de etanol, inicio de la fermentación, etc.
- Capacidad de sobrevivir a las condiciones del mosto: tolerancia al SO_2 , al etanol, osmotolerancia, actividad a bajas temperaturas, resistencia a toxinas killer (asociado a resistir toxinas producidas por diversas levaduras).
- Producción de metabolitos diferentes al etanol y agua: tanto de aquellos que impactan favorablemente en el perfil sensorial del vino (glicerol, alcoholes superiores, etc.) como de aquellos que reducen la calidad sensorial (ácido acético, compuestos azufrados, etc.).

(Girard, 2004).

2.8 Bioquímica de la fermentación alcohólica

La glucosa y la fructosa, presentes en el mosto de uva, serán metabolizadas a etanol y CO_2 siguiendo la siguiente reacción química:



Hexosa Etanol Dióxido de carbono

El objetivo de la fermentación alcohólica es, al igual que en el metabolismo bajo condiciones aerobias, obtener energía y distintas moléculas útiles para el desarrollo de la levadura.

Al mismo tiempo que la fermentación alcohólica ocurre, una gran cantidad de procesos bioquímicos, físicos y químicos ocurren lo que, aunado a la actividad hidrolítica de las levaduras se producirán o liberarán terpenos, fenoles, tioles, ácidos orgánicos, alcoholes superiores, ésteres, etc., dando al vino así su complejidad sensorial característica (Tabla 3) (Hidalgo, 2003; Moreno-Arribas y Polo, 2009; Jackson, 2014).

Tabla 3. Compuestos en el mosto y los productos obtenidos de éstos por el metabolismo de las levaduras.

Precursor en mosto	Producto en vino
Agua	Agua
Azúcares	Etanol CO ₂ Productos secundarios (glicerol, etanal, ácido succínico, ácido pirúvico, etc.) Ácidos volátiles (ácido acético)
Ácidos libres (málico, tartárico y cítrico) y sus sales	Ácidos libres y sus sales (bitartrato de potasio parcialmente precipitado)
Compuestos nitrogenados	Compuestos nitrogenados Alcoholes superiores
Compuestos minerales	Compuestos minerales
Pectinas	Pectinas parcialmente precipitadas
Sólido suspendidos	Taninos

(Modificado de Navarre, 1994).

Asimismo, ocurren diversos cambios físicos asociados a la fermentación alcohólica como un incremento en la temperatura del mosto, lo que hace indispensable el constante monitoreo y control de la temperatura para mantenerla en su valor óptimo durante la fermentación; asimismo, se observa una reducción en la densidad del vino conforme avanza la fermentación debido al aumento en la concentración de etanol (menos denso que el agua), lo que genera una densidad al final de la fermentación con valores entre 0.992 y 0.996 (Navarre, 1994).

2.8.1 Factores que inciden en el desarrollo de la fermentación

El correcto desarrollo y finalización de la fermentación depende de una serie de factores, entre los que destacan:

- Temperatura: favorece el desarrollo adecuado de las levaduras durante el proceso y, como se mencionó en el apartado de vinificación en tinto, favorece la extracción de diversos compuestos de la uva.
- Aireación: una aireación al segundo día de la fermentación promueve el desarrollo de las levaduras sin comprometer en sobre medida al mosto a la oxidación.
- Contenido de nitrógeno: la levadura es capaz de asimilar nitrógeno en forma de aminoácidos y sales de amonio. Su presencia es indispensable (en concentraciones superiores a 150 mg/L mosto) para reducir el riesgo de que se detenga la fermentación.

(Girard, 2004).

2.9 Métodos de identificación de levaduras

2.9.1 Métodos basados en características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas

Un primer acercamiento a la identificación de levaduras se hace mediante el análisis de las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas de los aislados. Estas pruebas abarcan desde la morfología celular de la levadura en estudio, la morfología del estado sexual (telomorfo) o asexual (anamorfo), la asimilación o fermentación de ciertos compuestos, entre otras; sin embargo, estas técnicas no permiten, en muchos casos, una adecuada identificación de las levaduras debido a que gran cantidad de pruebas dependen del estado fisiológico de las cepas, además de que implican gran cantidad de material y de experiencia suficiente para discernir acerca de los resultados obtenidos.

(Redzepovic, *et al.*, 2002; Franco-Díaz, 2018).

2.9.2 Métodos moleculares para la identificación de levaduras

Los métodos moleculares permiten una identificación rápida, precisa y fácil hasta nivel de especie de muchas levaduras de relevancia en la industria de los alimentos; algunas metodologías moleculares útiles son la secuenciación de regiones del ADN, cariotipificación acoplada a electroforesis, análisis de microsatélites, el polimorfismo longitudinal del ADN mitocondrial, entre otras (Orberá-Ratón, 2004).

Los genes ribosomales (5.8S, 18S y 26S) están agrupados formando unidades transcripcionales que se repiten en el genoma entre 100 a 200 veces (Figura 14). En cada unidad transcripcional, existen otras dos regiones: los espaciadores internos transcritos (ITS, por sus siglas en inglés) y los espaciadores externos transcritos (ETS, por sus siglas en inglés), las cuales son regiones transcritas pero no procesadas. Dentro de la unidad transcripcional, los genes codificantes se encuentran separados por espaciadores no transcritos intragénicos (o NTS).

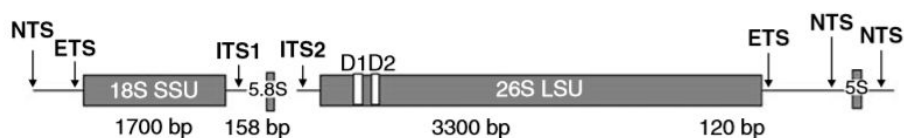


Figura 14. Estructura del ADN ribosomal (Fernández-Espinar, *et al.*, 2005).

Las regiones mencionadas anteriormente sugieren la posibilidad de utilizar herramientas poderosas para el establecimiento de relaciones filogenéticas entre especies y para su identificación; lo anterior asociado a la presencia de secuencias altamente conservadas y con una concertada evolución. Se han desarrollado múltiples técnicas que permiten analizar el ADN ribosomal:

- Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción del ADNr (RFLP): consiste en la diferenciación de organismos por el análisis de patrones de ruptura que se generan en el genoma al ser cortado éste por enzimas de restricción. Posteriormente, los fragmentos se analizan en un gel de electroforesis, donde se genera un patrón correspondiente al tamaño de los distintos cortes generados. Esta diferencia en el tamaño de los fragmentos se puede asociar a las diferencias en los sitios de unión de las enzimas de restricción en cada organismo, por lo tanto, se pueden establecer así correlaciones entre especies y cepas.
- Polimorfismo del ADN aleatoriamente amplificado (RAPD): consiste en la amplificación simultánea de distintas regiones del ADN con un único cebador. Debido a la baja temperatura de hibridación (35-39 °C) el cebador se asocia a regiones inespecíficas, lo que permite la amplificación de regiones polimórficas del ADN. Los productos se visualizan por electroforesis, lo que permite obtener “huellas digitales” de los microorganismos analizados a través del análisis de los fragmentos de distinto tamaño y número del ADN amplificado (Orberá-Ratón, 2004).
- Secuenciación de regiones ribosomales: la secuenciación de los genes 18S y el dominio D1/D2 del gen 26S, son las técnicas más empleadas debido a su disponibilidad en distintas bases de datos, sobretodo del dominio D1/D2. Esta técnica es de gran utilidad para asignar identidad a levaduras desconocidas cuando se tiene un %identidad superior al 99%. El acoplamiento de la técnica PCR previa secuenciación de genes o regiones definidas permite una rápida y adecuada identificación de levaduras (Fernández-Espinar, *et al.*, 2005).

En el caso del dominio D1/D2 del gen 26S, se trata de de una secuencia de aproximadamente 600 pb común a todas las especies de levaduras con una elevada variabilidad entre especies, con diferencias hasta de una sola base (Orberá-Ratón, 2004).

3. Justificación

El propósito del presente trabajo es evaluar la posibilidad de aislar levaduras útiles para la producción de vino tinto que presenten una baja adsorción de antocianinas y así responder a las necesidades de los productores de vino tinto del municipio de El Marqués, Querétaro.

4. Hipótesis

Dado que existen diversos géneros de levaduras en la microbiota nativa de las uvas, a partir de mostos se podrán aislar algunas del género *Saccharomyces* que presenten una adsorción de antocianinas dentro de valores reportados en la literatura para así ser de utilidad a la industria vinícola queretana.

5. Objetivo

Objetivo general:

Aislar levaduras pertenecientes al género *Saccharomyces* a partir de uvas variedad Cabernet Sauvignon de la región de El Marqués, Querétaro, que tengan una baja adsorción de antocianinas (menor al 4.0%).

Objetivos particulares:

- Aislar e identificar cepas de levaduras del género *Saccharomyces* a partir de mosto.
- Establecer la tolerancia de las levaduras seleccionadas al anhídrido sulfuroso y al etanol en concentraciones típicas de un proceso de vinificación, 70 mg/L mosto y hasta 14% v/v, respectivamente.
- Evaluar el desempeño de las levaduras seleccionadas en la fermentación de mosto de uva tinta a través de la determinación del rendimiento producto/biomasa $Y_{p/x}$ con respecto al etanol, la fermentación de los carbohidratos fermentables presentes en mosto, el contenido alcohólico al final de la fermentación y el contenido de antocianinas adsorbidas en la pared celular de las levaduras.

6. Estrategia experimental



7. Materiales y métodos

Se recolectaron uvas variedad Cabernet Sauvignon, variedad de uva tinta empleada ampliamente en el estado de Querétaro. Las uvas se recolectaron de la vitivinícola “Vinos del Marqués” ubicada en El Marqués, Qro.; se manejaron con guantes de nitrilo estériles y se transportaron en cajas de plástico lavadas a la Ciudad de México, donde se refrigeraron (4 °C) por doce horas. Posteriormente, se removieron tallos, hojas y uvas defectuosas manualmente (en condiciones estériles) y se determinó el peso de las uvas y de los residuos generados (hojas, tallos y uvas defectuosas). Después, las uvas se empacaron en bolsas estériles y se dividieron en 20 lotes.

- Inicio de micro vinificación natural con mosto de uva variedad Cabernet Sauvignon
Se estrujaron (manualmente y en condiciones de esterilidad) 7 lotes y se vertieron 175 mL de cada mosto en matraces Erlenmeyer de 250 mL estériles con 1.75 mL de una disolución 1.13% m/v $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ para lograr una concentración final de 70 mg SO_2/L mosto (Guzmán-Giménez y Serrano, 1963). Cada matraz se cubrió con manta de cielo para evitar la entrada de insectos. A los mostos se les determinó °Bx, acidez titulable y pH al inicio y final de la fermentación. El resto de las uvas se congelaron a -20 °C para su posterior uso. Posteriormente, se llevó un seguimiento del peso y temperatura de cada matraz durante la fermentación natural del mosto hasta alcanzar peso constante.

- Siembra post fermentación en medio selectivo para obtener crecimiento de levaduras

Al alcanzar peso constante, de cada fermentación se hicieron 7 diluciones decimales. A partir de la dilución 10^{-2} , se inocularon 200 μL de cada mosto en agar extracto de levadura-dextrosa-peptona de caseína (YPD) con ampicilina [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$] por triplicado para obtener colonias de levaduras y se incubaron a 26 °C por 2 días.

- Conteo de levaduras post fermentación de mosto de uva

Asimismo, a partir de las diluciones 10^{-6} y 10^{-7} se realizó la cuenta estándar para levaduras y mohos (NOM-111-SSA1-1994), las que se incubaron a 26°C por 5 días.

- Aislamiento de colonias de levaduras por pases consecutivos en medio selectivo

A partir de las colonias desarrolladas en agar YPD con ampicilina, se tomaron 5 inóculos aleatorios de los triplicados de cada una de las 7 fermentaciones (tomando mínimo un inóculo de cada triplicado) y se sembraron en agar YPD con ampicilina [$100\ \mu\text{g}/\text{mL}$] para obtener colonias aisladas y se incubaron a temperatura ambiente (24°C) por 3 días.

Posteriormente, se seleccionaron 82 colonias aisladas, donde cada una se re sembró en YPDA con ampicilina [$100\ \mu\text{g}/\text{mL}$] y se incubaron a temperatura ambiente (24°C) por 2 días. A partir de las 82 colonias aisladas desarrolladas, se re sembraron dos lotes de 20 colonias y un lote de 19 colonias seleccionadas al azar en YPDA con ampicilina [$100\ \mu\text{g}/\text{mL}$] y se incuban a temperatura ambiente (24°C) por 3 días.

- Pruebas en agar lisina de levaduras aisladas

A partir de los dos lotes de 20 y del de 19 colonias, se iniciaron las pruebas en agar selectivo Lisina (LA) efectuando dos pases consecutivos para los tres lotes de colonias seleccionadas. Cada pase se incubó a 25°C por 2 días. Se seleccionaron aquellas levaduras en las que se observó crecimiento nulo o pobre en el segundo pase efectuado.

Estas colonias seleccionadas se inocularon en medio YPDA con ampicilina [$100\ \mu\text{g}/\text{mL}$] y se incubaron a temperatura ambiente (26°C) por 4 días.

Se realizó tinción simple con safranina y tinción diferencial de Gram al crecimiento de levaduras en el medio YPDA con ampicilina [$100\ \mu\text{g}/\text{mL}$] para corroborar su pureza.

- Resiembra de levaduras seleccionadas en medio selectivo

Debido a contaminación por bacterias de los cultivos de levaduras en medio YPDA con ampicilina [$100\ \mu\text{g}/\text{mL}$], las levaduras ya seleccionadas se resembraron en agar papa

dextrosa (PDA) con cloranfenicol [50 $\mu\text{g}/\text{mL}$] (nueva propuesta de antibiótico) y se incubaron a 27 °C por 7 días.

- Primer pase de levaduras seleccionadas en medio diferencial WL

Posteriormente, a las colonias desarrolladas en PDA con cloranfenicol [50 $\mu\text{g}/\text{mL}$], se les realizó una tinción Gram para corroborar pureza y se inocularon en agar diferencial WL y se incubaron a 25 °C por 2 días. Se seleccionaron aquellas levaduras que presentaron colonias verde azuladas, con centro oscuro verdoso y cremosas en agar WL aunado a que hubieran presentado un desarrollo pobre en agar lisina, fenotipo correspondiente a *Saccharomyces* spp. (González, 2015).

- Pruebas de tolerancia a etanol

Posteriormente, aquellas colonias ya seleccionadas como sospechosas de pertenecer a *Saccharomyces* spp. (desarrolladas en PDA con cloranfenicol [50 $\mu\text{g}/\text{mL}$]) se inocularon en 5 mL de caldo extracto de levadura-peptona-dextrosa (YPD) y se incubaron a 25 °C hasta observar desarrollo en el medio, lo que ocurrió tras un día de incubación; a estos caldos se les adicionó etanol para lograr una concentración de 4% v/v etanol y se incubaron a 25 °C por 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, las levaduras se sembraron por estría ondulada en YPDA y se incubaron a 25 °C por dos días para evaluar su sobrevivencia a la concentración de etanol probada. Se siguió el mismo procedimiento para las concentraciones de etanol de 7% v/v, 10% v/v, 12% v/v y 14% v/v (Jackson, 2014; Miranda-Castilleja, *et al.*, 2014).

- Segundo pase de levaduras seleccionadas en medio diferencial WL

A partir de las levaduras sobrevivientes a 14% v/v etanol (sembradas en YPDA para evaluar su sobrevivencia), se inocularon por segunda vez en WLA y se incubaron a 25 °C por 3 días. Se seleccionaron colonias verdeazuladas, con centro oscuro verdoso y cremosas.

Previa inoculación en WL, se realizó tinción Gram para corroborar la pureza de las colonias.

- Cinética de crecimiento. Propuesta para relacionar DO con UFC.

A partir de la siembra en YPDA de la cepa identificada como “control” (levadura comercial para panificación), sobreviviente a 14% v/v etanol, se realizó una cinética de crecimiento. Se inoculó una punta de asa microbiológica en un tubo con caldo YPD y se incubó a 25 °C por 24 horas. A partir de este caldo, se reinoculó en 12 mL caldo YPD (en un tubo falcon de 15 mL) tal que se logró una concentración de 1% v/v de inóculo o una Densidad óptica (D.O., a una longitud de onda (λ) de 600 nm) equivalente de 0.083-0.088. Posteriormente, se determinó densidad óptica a una $\lambda=600$ nm y se inoculó 1 mL de caldo en agar Papa Dextrosa Acidificado (PDA) para desarrollar la metodología de cuenta estándar para levaduras y mohos (NOM-111-SSA1-1994). El caldo se incubó a 25 °C sin agitación y cada 6 horas se volvió a determinar DO y se realizaron diluciones decimales 10^{-3} y 10^{-4} para desarrollar la cuenta estándar para levaduras y mohos y obtener una cuenta que entre en el intervalo establecido por la legislación mencionada (10-150 UFC). Se siguió el mismo procedimiento cada 6 horas hasta alcanzar 36 horas de incubación, considerando que: tras 6 y 12 horas de incubación se realizaron diluciones 10^{-4} y 10^{-5} , tras 18, 24 y 30 horas de incubación se realizaron diluciones 10^{-6} y tras 36 horas de incubación se realizaron diluciones 10^{-6} y 10^{-7} . Asimismo, se considera el comienzo de una segunda cinética a destiempo para cubrir aquellas horas que sean imposibles de cuantificar en la primer cinética.

- Conservación de cepas identificadas como *Saccharomyces spp.*

Las colonias que fueron identificadas como presuntas *Saccharomyces spp.* se conservaron en glicerol al 15% v/v y se congelaron a -20 °C para su posterior uso.

- Reactivación de cepas congeladas

Las cepas congeladas seleccionadas (aislados identificados como 23, 30 y 31) se descongelaron a temperatura ambiente. Posteriormente, se tomaron 0.1 mL de glicerol con la cepa de interés y se inocularon en 9.9 mL de caldo YPD. Las muestras se incubaron a 25 °C a 250 rpm por 2 días.

Transcurrido el período de incubación, se siguió el protocolo establecido por (Martínez, 2009) para la obtención del paquete celular, modificándose el proceso de centrifugación a 8,872 x g por 10 minutos a 4 °C en una centrífuga Biofuge primo R Heraeus con rotor para tubos Falcon y un radio máximo de 12.4 cm

- Extracción de ADN

Se empleó el método liticasa+perlas propuesto por (Martínez, 2009). Posteriormente, al ADN extraído se purificó empleando un tratamiento inicial con 2.5 µL proteinasa K e incubación por 30 min. a 65 °C y 600 rpm; posteriormente, se añadieron 0.5 mL de cloroformo, se agitó por inversión, centrifugó a 15317 x g por 5 min. a 4 °C (en Centrífuga Beckman con rotor JA-14 con radio máximo de 13.7 cm) y se recuperó la fase acuosa. Estos pasos permiten reducir la contaminación proteínica y de polisacáridos. Después, se siguió el procedimiento de purificación establecido según el kit *Genomic DNA Extraction Kit* de Fast ID. La pureza y concentración de ADN extraído se evaluó empleando un lector de placas (Epoch, Biotek) para todas las muestras.

- Amplificación de dominio D1/D2 de ADNr 26S

Con base en el ADN extraído de cada una de las muestras, se procedió a amplificar el dominio D1/D2 del ADNr 26S. Se preparó la Mezcla de reacción (Master mix, en inglés) para la amplificación tomando como base lo establecido por (Martínez, 2009).

Tabla con los componentes de mastermix empleada.

Reactivo	[] inicial o de stock	[] deseada	Volumen p/1 reacción (µL)	Volumen p/6 reacciones (µL)
Agua	-	-	34.6	207.6

Buffer 10 X	10 X	1 X	5	30
Primer Fwd (NL1)	10 μ M	0.2 μ M	1	6
Primer Rvs (NL4)	10 μ M	0.2 μ M	1	6
Mix dNTPs	10 mM de cada dNTP	0.2 mM de cada dNTP	1	6
Enzima AccuPOL (AmpliQon) ^{α}	2.5 U/ μ L	1 U/50 μ L	0.4	2.4
MgCl ₂	25 mM	1mM ^{β}	2	12
ADN molde	20 ng/ μ L	100 ng/50 μ L	5	-
	Volúmenes		50 μ L total	270 μ L en total; 45 μ L en cada pozo de reacción

α : considerar que la enzima contiene ya una concentración de 1.5 mM de MgCl₂

β : se desea una concentración final de 2.5 mM pero se tiene ya por la enzima polimerasa 1.5 mM, por lo que se requiere adicionar el equivalente de 1 mM a la mezcla de reacción.

Se amplificó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 95 °C por 5 min.; 1-40 ciclos como siguen: desnaturalización 94 °C por 1 minuto, alineamiento a 55.5 °C por 2 minutos, extensión a 72 °C por 2 min. y una extensión final a 72 °C por 10 min.

- Visualización por electroforesis en gel de agarosa de amplicones

Posteriormente, se evaluó la presencia de los amplicones mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con una diferencia de potencial de 90 v aplicada durante 15 minutos.

- Corte de banda en gel de electroforesis correspondiente al amplicón D1/D2 del ADN_r 26S.

Tras evaluar la amplificación del dominio D1/D2 del ADNr 26S en el primer gel de agarosa (1%), se corre un nuevo gel empleando el resto de la mastermix sometida a amplificación. Posteriormente, se corta con una navaja estéril la banda correspondiente a un tamaño de 600 pb para cada muestra (23, 30 y 31) y se purifica con el kit QIAEX Gel Extraction Kit (Qiagen). La pureza y concentración del ADN purificado se evaluó empleando un lector de placas (Epoch, Biotek) para todas las muestras (Martínez, 2009).

Al observarse que la concentración del amplicón en la banda cortada era inferior a la necesaria para poder secuenciar las muestras, se realizó de nuevo la reacción de PCR para cada muestra (identificadas como 23, 30 y 31) siguiendo las mismas condiciones de amplificación (se anexa de nuevo la Tabla previa).

Tabla con los componentes de mastermix empleada.

Reactivo	[] inicial o de stock	[] deseada	Volumen p/1 reacción (μL)	Volumen p/6 reacciones (μL)
Agua	-	-	34.6	207.6
Buffer 10 X	10 X	1 X	5	30
Primer Fwd (NL1)	10 μM	0.2 μM	1	6
Primer Rvs (NL4)	10 μM	0.2 μM	1	6
Mix dNTPs	10 mM de cada dNTP	0.2 mM de cada dNTP	1	6
Enzima AccuPOL	2.5 U/ μL	1 U/50 μL	0.4	2.4

(AmpliQon) ^α

MgCl ₂	25 mM	1mM ^β	2	12
ADN molde	20 ng/ μ L	100 ng/50 μ L	5	-
	Volúmenes		50 μ L total	270 μ L en total; 45 μ L en cada pozo de reacción

α : considerar que la enzima contiene ya una concentración de 1.5 mM de MgCl₂

β : se desea una concentración final de 2.5 mM pero se tiene ya por la enzima polimerasa 1.5 mM, por lo que se requiere adicionar el equivalente de 1 mM a la mezcla de reacción.

Las muestras se amplificaron bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 95 °C por 5 min.; 1-40 ciclos como siguen: desnaturalización 94 °C por 1 minuto, alineamiento a 55.5 °C por 2 minutos, extensión a 72 °C por 2 min. y una extensión final a 72 °C por 10 min. (Martínez, 2009).

Tras la reacción de PCR, se evaluó la amplificación del dominio D1/D2 del ADNr 26S en gel de agarosa al 1% con una diferencia de potencial de 90 v aplicada por 15 minutos. Una vez evaluada la correcta amplificación del dominio, se cortó la banda correspondiente a 600 pb y se purificó con el kit QIAEX Gel Extraction Kit (Qiagen). La pureza y concentración del ADN purificado se evaluó empleando un lector de placas (Epoch, Biotek) para todas las muestras.

Por último, las dos purificaciones de ADN provenientes del gel de agarosa se combinaron para así aumentar la cantidad de ADN disponible para la secuenciación de los amplicones.

- Secuenciación de amplicones

Las muestras fueron enviadas a Macrogen (Corea del Sur) para su secuenciación junto con 20 μ L de cada uno los primers universales empleados en la reacción de amplificación: NL1 (GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) y NL4 (GGTCCGTGTTTCAAGACGG).

- Análisis y corrección de secuencias

Las secuencias tanto directas como inversas fueron analizadas y corregidas para obtener una secuencia consenso adecuada. Posteriormente, las secuencias fueron analizadas empleando la herramienta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para buscar homología con secuencias de levaduras reportadas.

- Construcción de un árbol de agrupamiento

Las secuencias consenso obtenidas de cada una de las muestras (23, 30 y 31) se analizaron por medio de un árbol de agrupamiento junto con secuencias de distintas levaduras reportadas como parte del grupo *Saccharomyces sensu stricto* (*Saccharomyces cerevisiae*, *S. bayannus*, *S. mikatae*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. pastorianus* y *S. paradoxus*). Se empleó el software MEGAX.

- Inicio de pruebas de micro vinificación.

Se seleccionaron aleatoriamente 3 lotes de uva despallada (variedad Cabernet sauvignon), recolectadas al inicio del proyecto en el municipio de El Marqués, Querétaro (mantenidas en congelación hasta el momento de su selección). Cada lote de uvas fue dividido en cuatro lotes (dos de 200 g para la cepa 23 y dos de 250 g para las cepas 30 y 31 de uva para vinificación y dos de 75 g para la caracterización del mosto pre fermentación). Las uvas fueron estrujadas dentro de bolsas resellables plásticas estériles.

Posteriormente, cada lote de 200 o 250 g de uva estrujada se transfirió a un matraz de 250 mL estéril. Los matraces con las uvas se sometieron a un tratamiento térmico (termovinificación) de 60 °C por 20 minutos (Miranda-Castilleja, *et al.*, 2014). Una vez concluido el tratamiento, los mostos fueron sulfitados a una concentración de 50 mg SO₂/L mosto y se maceraron a 25 °C por 24 horas.

Transcurridas las 24 horas de maceración, se prensó el orujo (o residuo sólido de uva estrujada) manualmente y en condiciones estériles. Posteriormente, se determinó el volumen de jugo (tanto el obtenido por estrujado como el obtenido por prensado) de uva prefermentación y se transfirió cada lote de jugo a un matraz de 250 mL estéril, respectivamente. En cuanto a los lotes de 75 g, uno se empleó para determinar °Bx y acidez total en uva pre fermentación y el otro se congeló para el análisis de glucosa y fructosa por cromatografía de líquidos en uva pre fermentación.

El proceso se realizó tres veces para probar las tres cepas identificadas.

Los matraces con el jugo de uva se cubrieron con manta de cielo estéril previa inoculación con levaduras y en los primeros días de la fermentación.

- Caracterización de mosto pre fermentación

Empleando uno de los lotes de 75 g de uva estrujada, se determinó al mosto pre fermentación °Bx según lo establecido en García-Cazorla y Xirau-Vayreda, 2000 y la acidez total titulable con base en lo establecido por Chávaro-Ortíz, 2014, empleando un potenciómetro calibrado (HANNA H 1 4211).

- Determinación de antocianinas de jugo de uva

Posterior al prensado del orujo, se tomó una muestra de 13 mL de cada matraz previa inoculación con las levaduras. Esta muestra se colocó en un tubo Falcon de 50 mL y se congeló durante 24 horas (hasta su análisis). La muestra se dejó descongelar a temperatura ambiente y se centrifugó a 8,872 x g por 5 min a 4 °C para eliminar partículas de la muestra (Morata, *et al.*, 2003). Posteriormente, se siguió el procedimiento propuesto por Giusti y Wrolstad, 2001 para determinar antocianinas en una muestra por medio del método del pH diferencial. Esta metodología permite cuantificar (mediante la ley de Lamber-Beer) una antocianina específica en una muestra con base en las propiedades espectrofotométricas de ésta (absorbancia, en particular) a determinados pH de análisis. El factor de dilución empleado fue de 0.4 mL de muestra y 9.6 mL de cada buffer empleado en esta determinación. Se consideró al malvidín-3-glucósido como la antocianina de referencia.

- Inoculación con levaduras seleccionadas

Las cepas de levaduras (conservadas en congelación con glicerol 15% v/v) ya identificadas, se descongelaron a temperatura ambiente. Posteriormente, se inocularon 0.3 mL de cada cepa en 4.5 mL de caldo extracto de levadura-peptona de caseína-dextrosa (YPD) y se incubaron a 25 °C por 24 horas.

A partir de este caldo, se inocularon 60 µL en 11.94 mL de caldo YPD (para el caso de la cepa 23) y 120 µL en 11.88 mL de caldo YPD (para las cepas 30 y 31) y se incubaron a 25 °C por 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se monitorea la densidad óptica del caldo hasta alcanzar valores entre 0.113-0.600 D.O., ya que estos valores son analizables en el intervalo lineal de la recta elaborada que permite la relación entre DO y UFC/mL.

Con base en la lectura de D.O., se pudo determinar la cuenta de levaduras en el caldo y, por lo tanto, inocular el mosto prensado con una concentración inicial de 10⁵ UFC/mL de la levadura seleccionada (Miranda-Castilleja, *et al.*, 2014).

- Seguimiento de avance de fermentación

Cada matraz con el jugo de uva inoculado se colocó en un baño de agua a 25 °C. Diariamente, se determinó el peso de cada matraz y se registró la temperatura de fermentación. Tras dos días de fermentación, se removió la tapa de manta de cielo y se colocó una tapa de plástico ajustada con una liga a cada matraz para favorecer condiciones de semi anaerobiosis.

La fermentación se consideró completa cuando el peso de los matraces se mantuvo constante.

- Análisis post fermentación

Una vez completa la fermentación, se tomaron 10 mL de vino para su análisis de etanol, glucosa y fructosa por cromatografía de líquidos; asimismo, se tomaron 15 mL y se

centrifugaron a 8,872 g por 5 min. a 4 °C y se determinó °Bx según lo establecido en García-Cazorla y Xirau-Vayreda, 2000; la acidez total titulable con base en lo establecido en Chávaro-Ortíz, 2014, empleando un potenciómetro calibrado (HANNA H 1 4211).

De igual forma, se determinó la cuenta de levaduras al final de la fermentación con base en lo establecido en la NOM-111-SSA1-1994, con la única modificación de que el volumen inicial tomado de la muestra homogeneizada fue de 0.1 mL en vez de 1 mL recomendado por la normativa y se realizaron diluciones pares, es decir, de 10^0 se procedió a 10^{-2} y así sucesivamente hasta 10^{-8} , incluyendo también y únicamente a la dilución 10^{-7}

- Determinación de contenido de antocianinas adsorbidas en la pared celular de las levaduras

Al final de la fermentación, se decantó el vino y se determinó el volumen total producido (considerando los volúmenes tomados en la caracterización post fermentación). Las “lías” (residuos sólidos depositados en el vino) producidas al final de la fermentación se mantuvieron en el fondo del matraz respectivo y fueron suspendidas en 50 mL del vino producido correspondiente. A partir de esta suspensión, se tomaron tres alícuotas de 12.5 mL de cada una de las fermentaciones y se siguió el procedimiento con lavados de agua y ácido fórmico:metanol (10:90 v/v) propuesto por Morata, *et al.*, 2003 para extraer las antocianinas adsorbidas en la pared celular de las levaduras.

Posteriormente, se aplicó la metodología del pH diferencial para cuantificación de antocianinas por medio de espectroscopía UV-visible propuesta por Giusti y Wrolstad, 2001. Se empleó un factor de dilución de 0.4 mL de muestra en 9.6 mL de buffer empleado. Se consideró al malvidín-3-glucósido como la antocianina de referencia.

- Cromatografía de líquidos de alto rendimiento y de gases para determinar etanol, glucosa y fructosa en jugo de uva pre y post fermentación

Las alícuotas tomadas para el análisis de fructosa y glucosa en mosto y prensados, así como las alícuotas tomadas para el análisis de glucosa, fructosa y etanol en vino se congelaron tras su obtención.

Posteriormente, se descongelaron a temperatura ambiente y se centrifugaron a $8,872 \times g$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos. Tras esta operación, se filtró 1.6 mL de cada muestra, empleando jeringas estériles y nuevas de 1 mL y filtros acoplables Titan 3 de Nylon ($0.45\text{ }\mu\text{m}$). Las muestras fueron sometidas a un análisis en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución acoplado a un detector de índice de refracción (HPLC-RI, marca Waters). Se utilizó una columna BioRad (Aminex HPX-87H $300\text{ mm} \times 7.8\text{ mm}$), como fase móvil se empleó una solución de agua estéril desionizada con 4 mM de ácido sulfúrico grado HPLC (Fluka), a una temperatura de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y con un flujo isocrático de 0.6 mL/min .

Asimismo, se analizaron las muestras en un cromatógrafo de gases (Agilent) para cuantificar el etanol en las muestras con un detector de ionización de flama. Se empleó una columna Carbowax/BTR (J&W Scientific) con un tamaño de partícula de $1\text{ }\mu\text{m}$ y unas dimensiones de $60\text{ m} \times 0.25\text{ mm}$. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: tras un periodo inicial isotérmico de 5 minutos a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, se estableció un gradiente de $5\text{ }^{\circ}\text{C/min}$ hasta alcanzar $140\text{ }^{\circ}\text{C}$, posteriormente, se aumentó el gradiente a $10\text{ }^{\circ}\text{C/min}$ hasta alcanzar $240\text{ }^{\circ}\text{C}$, la temperatura se mantuvo constante durante 5 minutos con un tiempo total de corrida de 40 minutos. La temperatura del inyector y del detector fue de $250\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se empleó una relación de split 1:5; se utilizó aire a 300 mL/min , hidrógeno a un flujo de 40 mL/min y nitrógeno a 28 mL/min , como gas acarreador.

8. Resultados y discusión

La uva fue recibida en huacales de plástico sin refrigeración y espolvoreadas previamente con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (empleado como conservador) en una proporción 20 g por cada 2.5 kg de uva, el cual no tiene influencia en la fermentación.

Las uvas se lotificaron, se pesó cada lote y se determinó el rendimiento promedio de uva por racimo (Tabla 4).

Tabla 4. Registro del total de uva recibida, uva despalillada y rendimiento de uva.

Peso de uva con tallos, hojas y uvas defectuosas (g)	Peso de uva despalillada (g)	Rendimiento de uva por racimo
16,798	15,656	93%

Posteriormente, se seleccionaron siete lotes de manera aleatoria para dar inicio a la fermentación natural a temperatura ambiente ($T= 23\text{ }^{\circ}\text{C}$, en promedio). A los lotes seleccionados se les determinó $^{\circ}\text{Bx}$ y acidez titulable expresada como (g/L de ácido tartárico) (Tabla 5).

Tabla 5. Caracterización de mosto seleccionado previa fermentación natural.

Lote mosto	Matraz	Peso mosto (g)	$^{\circ}\text{Bx}^{\text{A}}$	acidez titulable promedio (g ácido tartárico/L mosto) ^B	pH inicial
15	1	187.93	26.2	7.7 ± 0.1	3.67
19	2	184.18	25.0	7.9 ± 0.2	3.71
14	3	222.15	25.6	7.3 ± 0.1	3.63
18	4	191.13	23.6	7.6 ± 0.6	3.68
1	5	198.16	26.6	8.1 ± 0.2	3.64
16	6	206.63	26.6	7.6 ± 0.1	3.74
17	7	188.43	24.6	7.8 ± 0.1	3.58

Nota: ^A: la lectura efectuada por refractometría se corrige a la temperatura de medición ($24\text{ }^{\circ}\text{C}$). ^B: se realiza la determinación con potenciómetro, considerando el punto de equivalencia en un pH de 6.9-7.1

Se realizó la corrección de Miconi para el resultado en $^{\circ}\text{Bx}$ con el objetivo de obtener g azúcar/100 cm^3 de mosto ($(^{\circ}\text{Bx} \cdot 1.2) - 4$); asimismo, se determinó el Índice de maduración de De Cillis y Odifredi (Tabla 6). Los resultados del índice de maduración correspondieron a los de uva en madurez industrial, que corresponde a un valor entre 3 y 5 (Hidalgo, 2003).

Tabla 6. Contenido de azúcar y grado de maduración de la uva.

Matraz	Corrección de Miconi (g azúcar/ 100 cm^3 mosto)	Índice de De Cillis y Odifredi ($\frac{\text{g azúcar/ } 100 \text{ cm}^3 \text{ mosto}}{\text{g ác. Tartárico/ Lmosto}}$)
1	27.44	3.6
2	26.00	3.3
3	26.72	3.7
4	24.32	3.2
5	27.92	3.4

6	27.92	3.7
7	25.52	3.3

- Inicio de micro vinificación natural con mosto de uva variedad Cabernet Sauvignon

Se inició la fermentación natural en matraces Erlenmeyer de 250 mL recubiertos con gasa para mantener alejados a algún insecto. Se siguió la fermentación mediante determinaciones del peso de cada matraz y, además, se determinó la temperatura tanto ambiental como de cada matraz. La fermentación natural transcurrió dentro del rango de temperatura recomendado para la fermentación del mosto de uva (15-30 °C) (Hidalgo, 2003) (Tabla 7). Tras alcanzarse el día 7, se aprecia en el Figura 15 que la reducción del peso fue ya mayor para algunas fermentaciones (2, 3 y 6), hecho asociado con el avance de la fermentación y la consecuente producción de etanol por parte de las levaduras (Moreno-Arribas y Polo, 2009), razón por la que se decidió comenzar el aislamiento de levaduras en ese día (Figura 15).

Tabla 7. Temperatura de cada fermentación y temperatura ambiente durante la fermentación natural.

Día	Temperatura promedio fermentaciones (°C)	Temperatura ambiente (°C)
1	23	24
2	23	23
3	23	23
4	23	23
5	23	23
6	23	22
7	23	24

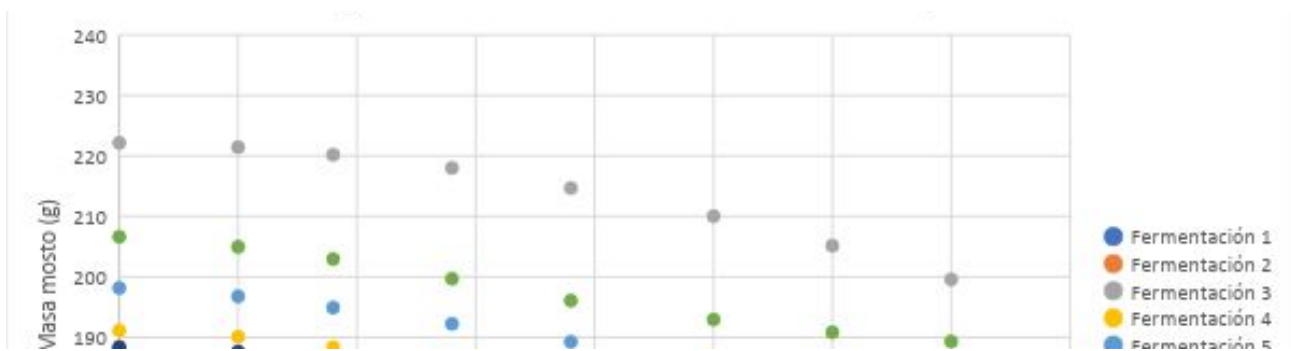


Figura 15. Seguimiento del peso de cada fermentación natural en función del tiempo de fermentación.

Cada fermentación se desarrolló en matraces de 250 mL estériles con 175 mL de mosto de uva variedad Cabernet Sauvignon, sulfitados a una concentración de 70 mg SO₂/L mosto.

La determinación del peso de cada matraz se realizó una vez por día hasta alcanzar peso constante.

A los siete días de fermentación, se inocularon 3 cajas con YPDA con ampicilina por fermentación para obtener un desarrollo masivo de levaduras; además, se inoculó el mosto en agar papa dextrosa para la determinación del número de levaduras de cada fermentación natural (Tabla 8). Con base en la literatura (Moreno-Arribas y Polo, 2009) y la cuenta obtenida, se puede concluir que las levaduras de los matraces 1 y 5 se encontraban en la fase estacionaria (la literatura menciona una cuenta de levaduras en esta fase del orden 10⁷-10⁸ UFC/mL) y el resto de los matraces en la fase exponencial pre estacionaria (reportada en valores de 10⁶-10⁷ UFC/mL). Esto es de relevancia pues es en estas fases de crecimiento donde se presenta la mayor cantidad de levaduras en toda la fermentación. Entonces, al haber inoculado los mostos en YPDA con ampicilina en este período dentro de la fermentación, se garantiza la presencia en el inóculo de una amplia variedad y cantidad de las levaduras involucradas en la fermentación (Moreno-Arribas y Polo, 2009).

Tabla 8. Cuenta de mohos y levaduras al alcanzar peso constante en las fermentaciones.

Fermentación	Cuenta de mohos y levaduras (UFC/mL mosto fermentado)
1	42x10 ⁷ (valor estimado)
2	58x10 ⁶
3	27x10 ⁶
4	87x10 ⁶
5	12x10 ⁷
6	37x10 ⁶
7	57x10 ⁶

Asimismo, relacionando la cuenta de levaduras y mohos con lo observado en la Figura 17, se puede corroborar como la disminución del peso fue menos marcada al día siete, lo que puede asociarse justamente con la entrada de las levaduras en la fase estacionaria o pre estacionaria.

Al mosto fermentado se le determinó °Bx y acidez titulable (Tabla 9). Con base en las Tablas 5 y 9, se aprecia una reducción en los °Bx en el medio de más del 50%, hecho que coincide con lo reportado en la literatura para 7 días de fermentación (Hidalgo, 2003); sin embargo, la acidez aumentó, hecho que se puede atribuir a la producción de diferentes ácidos orgánicos por parte de las levaduras a partir de piruvato como el ácido acético, succínico, etc. o por otras rutas metabólicas (Hidalgo, 2003).

Tabla 9. Caracterización de mosto fermentado tras fermentación natural.

Matraz	°Bx ^A	Acidez titulable promedio (g ácido tartárico/L vino) ^B	pH tras fermentación
1	13.6	10.0 ± 1.0	3.50
2	8.6	10.0 ± 1.0	3.68
3	9.6	8.0 ± 1.0	3.57
4	10.8	11.0 ± 1.0	3.55
5	12.6	11.0 ± 1.0	3.62
6	14.6	11.0 ± 1.0	3.55
7	14.6	14.0 ± 1.0	3.44

Nota: ^A: la lectura efectuada por refractometría se corrige a la temperatura de medición (24 °C). ^B: se realiza la determinación con potenciómetro, considerando el punto de equivalencia en un pH de 6.9-7.1

- Siembra post fermentación en medio selectivo para obtener crecimiento de levaduras

Como se mencionó previamente, el mosto se inoculó en medio YPD con ampicilina ([100 µg/mL]) (siembra 1), los cuales mostraron un desarrollo masivo de levaduras (Figura 16).



Figura 16. Desarrollo masivo de levaduras en YPDA con ampicilina ([100 µg/mL]), fermentación 7.

- Aislamiento de colonias de levaduras por pases consecutivos en medio selectivo
- Posteriormente, se tomaron aleatoriamente cinco inóculos provenientes de cualquiera de las tres cajas con crecimiento por fermentación. Se sembraron mediante estría cuadrante radial para obtener colonias aisladas (Figura 17), (siembra 2).



Figura 17. Desarrollo de colonias aisladas. Primer resiembra en YPDA ampicilina ([100 µg/mL]). Inóculo proveniente de la caja I, fermentación 1.

Tras incubación, se seleccionaron colonias aisladas que presentaron un color blanquecino, forma redonda, apariencia y textura cremosa, así como una elevación convexa, ya que es la morfología reportada como típica para *Saccharomyces* spp. (Fernández-Espinar, *et al.*, 2005). Se seleccionaron algunas colonias con elevación apicular y algunas en forma de papila (con una elevación marcada en el centro). Se seleccionaron un total de 82 colonias sospechosas de pertenecer al género *Saccharomyces* (numeradas del 1 al 82 para su fácil identificación).

Estas colonias se resembraron dos veces más en agar YPD con ampicilina ([100 µg/mL]) para obtener colonias de levaduras con un único morfotipo (siembra 3) (Figura 18).



Figura 18. Desarrollo de colonia aislada inoculada en YPDA ampicilina ([100 µg/mL]).

Inóculo proveniente de la colonia 69.

- Pruebas en agar lisina de levaduras aisladas

A partir de la última siembra en YPDA ampicilina ([100 µg/mL]), se comenzaron las pruebas en agar lisina. Las colonias se dividieron en dos lotes de 20 colonias y uno de 19 colonias y se realizaron dos pases hasta conseguir 10 a 12 colonias sospechosas de pertenecer al género *Saccharomyces*.

El medio lisina se ha empleado para la identificación de levaduras del género *Saccharomyces*, lo que se debe a la incapacidad de estas levaduras para desarrollarse con lisina como principal fuente de nitrógeno (a pesar de que el medio presenta otros aminoácidos y sales de amonio como fuente de nitrógeno, las cuales se encuentran en cantidad inferior a lisina); sin embargo, se ha reportado la posibilidad de que las levaduras puedan desarrollarse ligeramente (crecimiento apreciado como micro colonias continuas) en el medio debido a la presencia de impurezas del medio del cual proviene el inóculo,

YPDA en este caso (Eddy y Morrys, 1956). Experimentalmente, fue posible discriminar entre posibles levaduras *Saccharomyces* y no *Saccharomyces* (Figura 19) por un desarrollo abundante para levaduras no *Saccharomyces* (Figura 19, I) y un pobre desarrollo para levaduras del género *Saccharomyces* (Figura 19, II). Asimismo, se inoculó un control de una levadura *Saccharomyces* spp. para tener una clara referencia del crecimiento esperado (Figura 20).

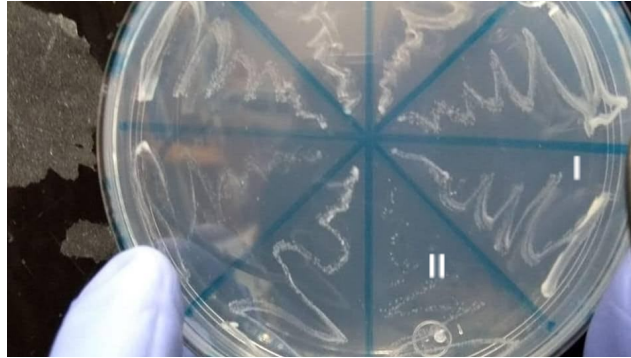


Figura 19. Desarrollo de segundo pase en agar lisina.

I: desarrollo de colonia abundante, interpretada como no *Saccharomyces*. II: desarrollo de colonia puntual y pobre, interpretada como *Saccharomyces* spp.




Figura 20. Desarrollo de segundo pase de levadura *Saccharomyces* spp. (control) inoculada en agar lisina.

De las colonias seleccionadas como posibles *Saccharomyces*, se realizó una tinción simple con safranina para comprobar su pureza, a partir de la siembra en YPDA ampicilina ([100

µg/mL]) de la cual se inoculó el agar lisina (Tabla 10). Se observó contaminación bacteriana en los cultivos 6 y 35.

Tabla 10. Resultados de tinción simple con safranina de primeras colonias seleccionadas como posibles *Saccharomyces*.

Observación microscópica	Características
	Colonia: 30 Aumento: 40x Descripción: levaduras con forma ovoide y algunas elipsoidales, gemación polar.

Es importante aclarar que las pruebas en agar lisina arrojaron también como nuevas sospechosas a las colonias identificadas como 3 y 23, por lo que se sembraron también en YPDA ampicilina ([100 µg/mL]). No se encontró contaminación bacteriana tras tinción simple de estas colonias.

- Resiembra de levaduras seleccionadas en medio selectivo

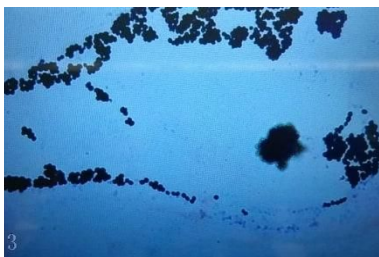
A partir de las colonias sospechosas de pertenecer al género *Saccharomyces* (3, 23, 35, 31, 9, 69, 6, 30, 19, 10, 5 y 22), se buscó eliminar a las bacterias presentes en algunos cultivos (6 y 35, específicamente) y también verificar la morfología colonial mediante una siembra en medio YPDA ampicilina ([100 µg/mL]), buscando aquellas con elevación convexa-apicular, cremosa, color crema blanquecino, borde redondo y circular (Kovacevic, 2015, González, 2015).

Las levaduras seleccionadas se resembraron con éxito y se desarrollaron en YPDA ampicilina ([100 µg/mL]). De este desarrollo se analizó la morfología de los aislados y se realizó una tinción Gram para verificar si la carga bacteriana se redujo. Con respecto a la

morfología colonial en YPDA ampicilina ([100 µg/mL]), se apreció que muchas de las levaduras consideradas como “positivas” para *Saccharomyces* no coincidieron con la descripción morfológica esperada ((Kovacevic, 2015, González, 2015), por lo que se propuso inocular en agar WL para una adecuada y certera identificación.

En cuanto a la tinción, se encontró que la contaminación bacteriana persistió y se había hecho aún más evidente gracias a la tinción (Tabla 11); sin embargo, el desarrollo de las bacterias resultó marginal en comparación con el desarrollo de las levaduras, con base en lo observado en las tinciones.

Tabla 11. Tinción Gram colonias seleccionadas como posibles *Saccharomyces*.



Colonia: 30
Aumento: 40x
Descripción: forma ovoide, gemación multipolar.



Colonia: 30
Aumento: 100x
Descripción: cocos Gram +.

La presencia de bacterias en los cultivos levantó la sospecha de posibles falsos positivos en los resultados observados en el agar lisina, razón por la cual se realizaron tinciones a distintos crecimientos (elegidos al azar) en el agar lisina para evaluar su pureza. Se

encontró que las bacterias no se desarrollaron ni influyeron en el desarrollo de las levaduras en el agar lisina (Figura 21), lo cual concuerda con lo reportado en la literatura (Eddy y Morris, 1956).

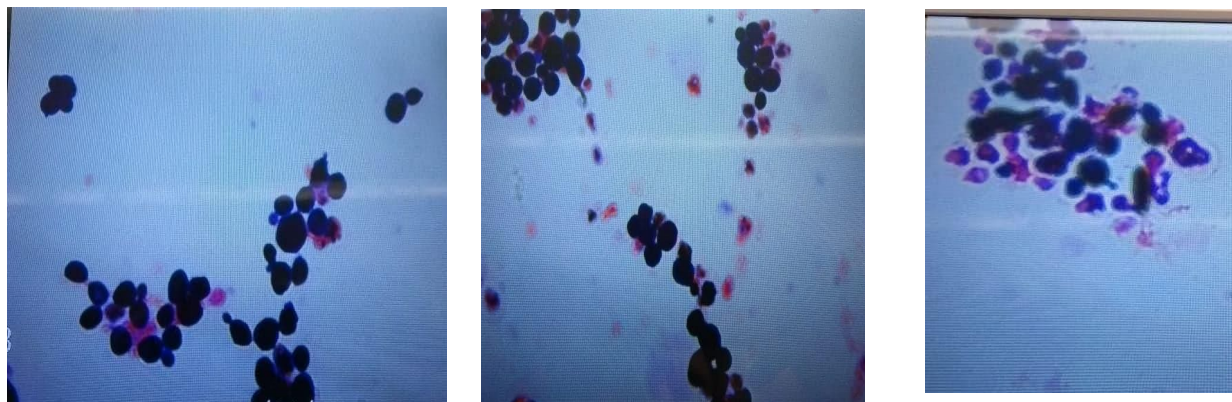
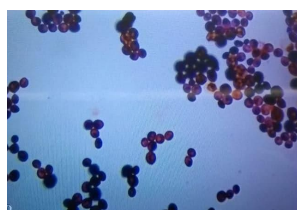


Figura 21. Observaciones microscópicas de desarrollo en agar lisina de colonias 23, 3 y 9, aumento 100x.

Debido a la persistencia de la contaminación microbiana en los cultivos de levaduras, estas se sembraron en agar papa dextrosa (PDA) con cloranfenicol ([50 $\mu\text{g}/\text{mL}$]), ya que el cloranfenicol se reporta como un antibiótico de amplio espectro contra bacterias gram positivas y gram negativas (Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México, 2018) con una actividad óptima al pH del PDA (pH reportado por el fabricante de 5.6 ± 0.2). Tras inoculación e incubación, se apreció mediante tinción Gram una notable reducción en la cantidad de bacterias presentes (Tabla 12) y, en algunos casos, incluso la completa inhibición de las bacterias.

Tabla 12. Resultados de tinción Gram de algunas colonias seleccionadas como posibles *Saccharomyces* provenientes de PDA con cloranfenicol ([50 $\mu\text{g}/\text{mL}$])



Colonia: 30
Aumento: 100x
Descripción: forma ovoide, gemación polar.

Colonia: 30
Aumento: 100x
Descripción: contaminación bacteriana no apreciable.

- Primer pase de levaduras seleccionadas en medio diferencial WL

Tras lograr una siembra con baja contaminación, se inician pruebas en agar WL para las 12 colonias sospechosas de pertenecer al género *Saccharomyces* (identificadas como 3, 23, 22, 10, 5, 31, 19, 30, 35, 6, 69 y 9) y un control positivo (proveniente de inoculación en agar YPDA ampicilina ([100 µg/mL])).

El agar WL es un medio diferencial que permite identificar levaduras pertenecientes al género *Saccharomyces* por el color y la morfología de las colonias desarrolladas en el agar, siendo esta de color verde azulado, superficie opaca y lisa, elevación convexa y consistencia cremosa y colonias brillantes (González, 2015). Con base en esta descripción, se probaron las 12 colonias seleccionadas y se obtuvieron resultados positivos (identificación como *Saccharomyces* spp.) para 4 colonias (identificadas como 23, 30, 31 y 69) y control (Tabla 13). En el caso de la colonia 69 no se tuvo completa certeza de que se trate de una levadura *Saccharomyces*, sin embargo, se conservó para el resto de las pruebas.

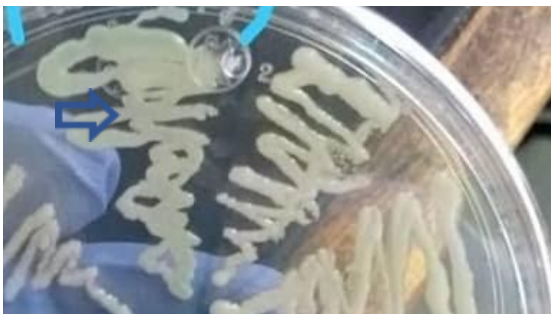
Tabla 13. Resultados de crecimiento en agar WL para colonias seleccionadas.

Desarrollo colonial

Descripción

Colonia 30 (tercera de derecha a izquierda).

Aspecto: crecimiento brillante, consistencia cremosa, verde azulado con centros oscuros a lo largo del estriado.



NOTA: la flecha señala el crecimiento referido en la columna a la derecha de la imagen.

- Pruebas de tolerancia a etanol

Las colonias 23, 30, 31, 69 y control se sometieron a pruebas de tolerancia a etanol de 4% v/v hasta 14% v/v. Para esto, las cinco colonias se inocularon en caldo YPD (tomando el inóculo del agar PDA con cloranfenicol ([50 µg/mL])) y se incubaron hasta observar crecimiento evidente. Tras 24 horas de incubación, se observó amplio desarrollo en los caldos (Figura 22), por lo que se decidió dar inicio a la prueba. Las cinco colonias probadas mostraron crecimiento positivo en agar YPD tras cada adición de etanol a lo largo de toda la prueba (Tabla 14). La concentración máxima (14% v/v etanol) probada es aquella considerada como máximo para un vino de mesa convencional (Rebolo, 2007).

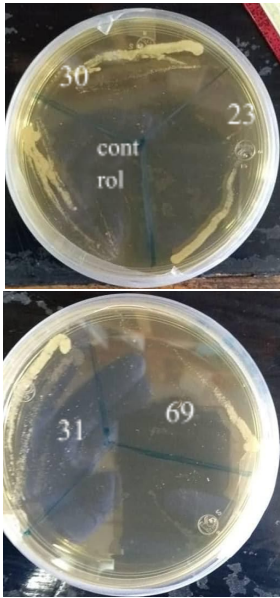


Figura 22. Caldo YPD inoculado con colonia a analizar, incubado por 24 horas. Colonia 30, control y 23 (de izquierda a derecha).

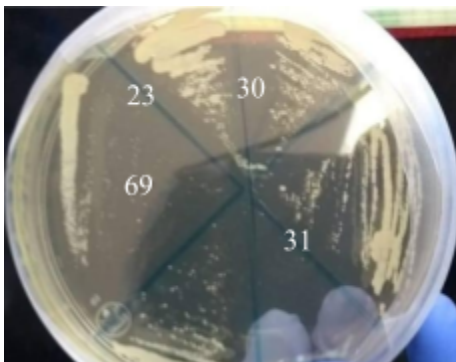
Tabla 14. Pruebas de etanol. Evaluación de la sobrevivencia de las levaduras evaluando crecimiento en YPDA tras adiciones crecientes de etanol.

Desarrollo

Descripción



Prueba 4% v/v etanol. Desarrollo positivo en todas las levaduras.



Prueba 7% v/v etanol. Desarrollo positivo en todas las levaduras.



Prueba 10% v/v etanol. Desarrollo positivo en todas las levaduras.



Prueba 12% v/v. Desarrollo positivo en todas las levaduras.

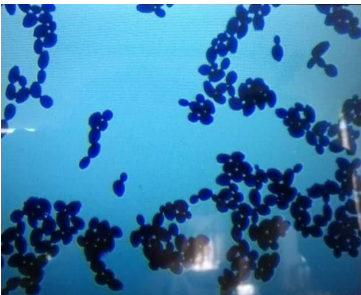


Prueba 14% v/v. Desarrollo positivo en todas las levaduras.

A partir del crecimiento en YPDA para las sobrevivientes a 14% v/v etanol, se efectuó una tinción Gram previa re inoculación en agar WL con el objetivo de evaluar su pureza (Tabla 15).

No se encontró presencia de bacterias en estos cultivos, hecho asociado a la concentración de etanol en el medio ya que, precisamente, la literatura reporta que las bacterias son inhibidas en gran medida de la fermentación de mosto de uva debido a la creciente concentración de etanol en el mosto (hasta 14% v/v etanol) (Universidad de California Davis, 2018).


Tabla 15. Tinción Gram para colonias supervivientes a 14% v/v etanol.

Observación	Descripción
	Colonia: 30 Aumento: 100x Descripción: forma ovoide, gemación polar. Contaminación bacteriana no apreciable.

- Segundo pase de levaduras seleccionadas en medio diferencial WL

Las colonias sobrevivientes a 14% v/v de etanol desarrolladas en medio YPDA, se reinocularon en agar WL para corroborar los resultados fenotípicos (Tabla 16). Con base en los resultados obtenidos, se identificaron como levaduras del género *Saccharomyces* a las colonias 23, 30 y 31. Considerando que se empezaron las pruebas con 69 colonias, se tiene una recuperación de levaduras del género *Saccharomyces* del 4%. Este hecho concuerda con lo reportado en la literatura, la cual reconoce que el género *Saccharomyces* se encuentra presente en muy baja cantidad en la superficie de uvas sanas y, por lo tanto, no hay certeza de su desarrollo en la fermentación (González, 2015; Vaduano *et al*, 2018); sin embargo, es importante reconocer que, finalmente, si las levaduras del género *Saccharomyces* se encuentran presentes (aún en baja cantidad), son éstas las que predominarán al final de la fermentación, ya que son capaces de resistir de mejor forma la elevada concentración de solutos del mosto, la creciente concentración de etanol y el sulfitado inicial del mosto (Hidalgo, 2003; Jackson, 2014).

Tabla 16. Desarrollo de colonias sobrevivientes a 14% v/v etanol en agar WL.

Desarrollo colonial	Descripción
	<p data-bbox="1019 1398 1154 1425">Colonia 30</p> <p data-bbox="813 1451 1360 1587">Colonias verde azuladas, brillantes, circulares, borde redondo, elevación convexa, centro oscuro ligeramente apreciable.</p>

- Extracción de ADN

Posteriormente, se reactivaron las cepas congeladas y se procedió a extraer el ADN de cada cepa y purificarlo. En la Tabla 17 se aprecian los valores de la cuantificación y purificación del ADN extraído de cada una de las muestra de interés (23, 30 y 31).

Tabla 17. Resultados de análisis espectrofotométrico realizado a muestras con ADN extraído de las cepas 23, 30 y 31.

Muestra	Absorbancia 260	Absorbancia 280	Concentración (ng/ μ L)	Cociente 260/280	Concentración promedio (ng/ μ L)	Cociente 260/280
23	0.048	0.023	47.948	2.072	45.965	2.178
	0.044	0.019	43.981	2.284		
30	0.037	0.017	36.545	2.102	36.062	2.149
	0.036	0.016	35.579	2.195		
31	0.037	0.018	36.800	2.102	36.008	2.122
	0.035	0.016	35.217	2.141		
Blanco	0.001	0.002	1.362	0.65	-	-
	0.002	0.002	2.312	1.048	-	-

El ADN extraído se puede clasificar como puro, pues se encuentra dentro de los valores Cociente 260/280 recomendados (mayor a 1.5 hasta 2.2) (Martínez, 2009).

Una vez comprobada la pureza y concentración del ADN extraído de cada muestra, se efectuó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) del dominio D1/D2 del ADN_r 26S. Esta región, con un tamaño aproximado de 600 pb, es común dentro del filo *Ascomycota* pero con suficiente variabilidad en su secuencia para discriminar a nivel de especie entre levaduras (Martínez, 2009; Zanut et. al., 2010). La reacción de amplificación se realizó sobre un control negativo, un control positivo (correspondiente a *Metschnikowia pulcherrima*) y las tres cepas de interés (23, 30 y 31).

Al finalizar la PCR, se evaluó la amplificación por medio de electroforesis en un gel de agarosa 1% con 3 μ L de bromuro de etidio para las tres muestras y los controles, obteniendo los resultados presentados en el Figura 23. Se corrieron dos geles con el mismo ADN amplificado.

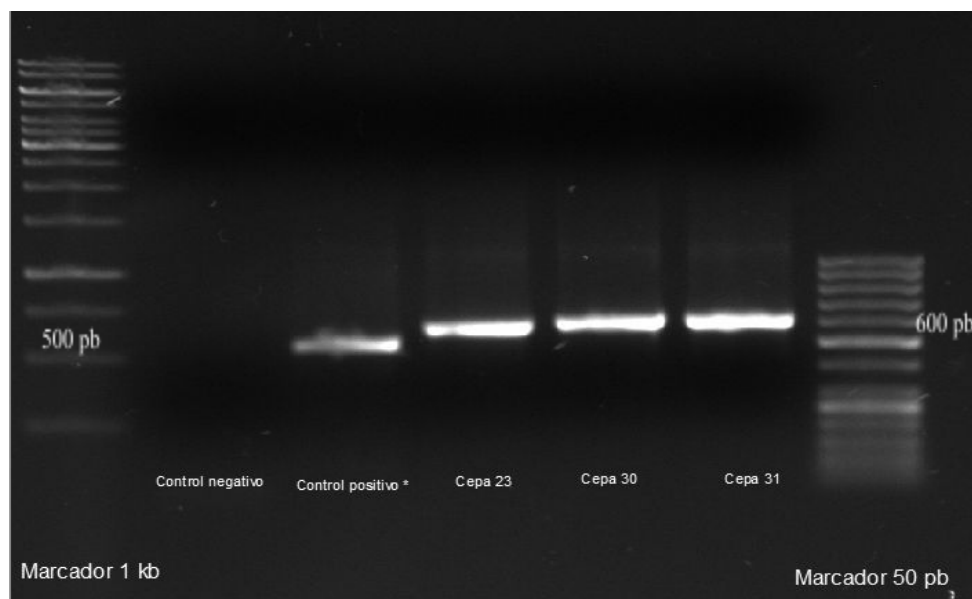


Figura 23. Gel de agarosa 1%. Se observan de izquierda a derecha: marcador *O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder, ready to use* (Fermentas), control negativo, control positivo (*Metschnikowia pulcherrima*), muestra 23, muestra 30 y muestra 31 y marcador *O'GeneRuler 50 bp DNA Ladder, ready to use* (Fermentas).

Con base en los resultados observados en el gel de agarosa, se pudo apreciar que las bandas correspondientes a los carriles “cepa 23, cepa 30 y cepa 31” coinciden con el tamaño esperado del amplicón (600 pb); sin embargo, en estos mismo carriles se apreció ligeramente una banda por encima de las bandas más intensas, lo que se puede asociar a una amplificación inespecífica del ADN. Esto fue de relevancia al momento de secuenciar, pues el procedimiento de purificación de ADN se tuvo que realizar cortando la banda deseada del gel para evitar así la presencia de secuencias no deseadas en la secuenciación. De igual forma, se puede apreciar en el carril “control positivo” una amplificación adecuada del control positivo.

Posteriormente, se cortaron las bandas de los dos geles corridos para obtener amplicones con suficiente pureza para su secuenciación.

Los resultados de concentración y pureza del ADN amplificado obtenido en cada una de las dos purificaciones de bandas cortadas en cada uno de los geles de agarosa 1%, se muestran en las tablas 18 y 19. La concentración y pureza obtenidas al combinar ambas disoluciones con ADN purificado se muestra en la tabla 20.

Tabla 18. Resultados de purificación de las bandas cortadas del primer gel de agarosa para cada muestra (23, 30 y 31).

Muestra	Absorbancia	Absorbancia	Conc	CV	Dev	Cociente	Conc	Radio
	260	280	(ng/μL)	(%)	Est	260/280	promedio (ng/μL)	A260/A280 promedio
23	0,046	0,023	45,593	13,2	6,636	1,984		
	0,055	0,028	54,977			1,975	50,285	1,980
30	0,046	0,028	45,602	5,9	2,584	1,647		
	0,042	0,02	41,947			2,148	43,775	1,898
31	0,041	0,02	41,151	8,4	3,264	2,05		
	0,037	0,018	36,535			2,081	38,843	2,066
Blanco	-0,002	-0,003	-2,043	-21,8	0,525	0,736		
	-0,003	-0,002	-2,785			1,293	AGUA B.M.	N.A.

Tabla 19. Resultados de purificación de las bandas cortadas del segundo gel de agarosa para cada muestra (23, 30 y 31).

Muestra	Absorbancia	Absorbancia	Conc	CV	Dev	Cociente	Conc	A260/A280
	260	280	(ng/μL)	(%)	Est	260/280	promedio (ng/μL)	promedio
23	0,027	0,013	27,167	4,59	1,287	2,136		
	0,029	0,014	28,988			2,064	28,078	2,100
30	0,034	0,016	33,56	4,65	1,614	2,088		
	0,036	0,018	35,842			2,009	34,701	2,049

31	0,027	0,013	27,207	0,697	0,189	2,051		
	0,027	0,014	26,94			1,943	27,074	1,997

Tabla 20. Resultados de la mezcla de ambas purificaciones para cada muestra (23, 30 y 31).

Muestra	Concentración promedio	A260/A280 promedio
	global(ng/μL)	global
23	39,181	2,040
30	39,238	1,973
31	32,958	2,031

El ADN extraído se puede considerar como de pureza adecuada, pues se encuentra dentro de los valores Cociente 260/280 recomendados (1.8-2.0) (Martínez, 2009).

El ADN purificado se envió a Corea del Sur para su secuenciación en Macrogen.

Los resultados enviados se analizaron para determinar la secuencia consenso. Esto implica alinear las dos cadenas del ADN secuenciadas, tanto aquella en sentido 5' → 3' (obtenida con el primer directo o “forward”) como la de sentido 3' → 5' (obtenida con el primer reverso o “reverse”), para tener una única secuencia, en sentido 5' → 3'.

Así se pudo comparar la secuencia consenso (en sentido 5' → 3'), por medio de la herramienta “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST, por sus siglas en inglés), contra secuencias de referencia, obteniéndose así la identidad de cada muestra. La identidad determinada para cada cepa de esta forma se presenta en la Tabla 21.

Tabla 21. Resultados tras análisis por BLAST de las secuencias correspondientes a los aislados 23, 30 y 31.

Cepa	Puntaje máximo	Puntaje total	Covertura	Valor E	Identidad	Levadura con género y especie
------	----------------	---------------	-----------	---------	-----------	-------------------------------

23	1062	1062	99%	0.0	100%	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
30	1062	1062	100%	0.0	99.66%	<i>Saccharomyces paradoxus</i>
31	1055	1055	99%	0.0	100%	<i>Saccharomyces paradoxus</i>

Es importante mencionar que las secuencias consenso analizadas de los aislados 30 y 31 arrojaron datos confusos acerca de su identidad, pues se identificaron (con % de identidad considerablemente altos) como *Saccharomyces cariocanus* y *Saccharomyces paradoxus*. Esto permite suponer que las secuencias analizadas muestran un alto grado de conservación entre estas especies.

Con el objetivo de obtener resultados más confiables para cada aislado, se construyó un árbol de agrupamiento empleando las secuencias obtenidas de los aislados 23, 30 y 31, así como secuencias de referencia disponibles en Genbank (base de datos pública).

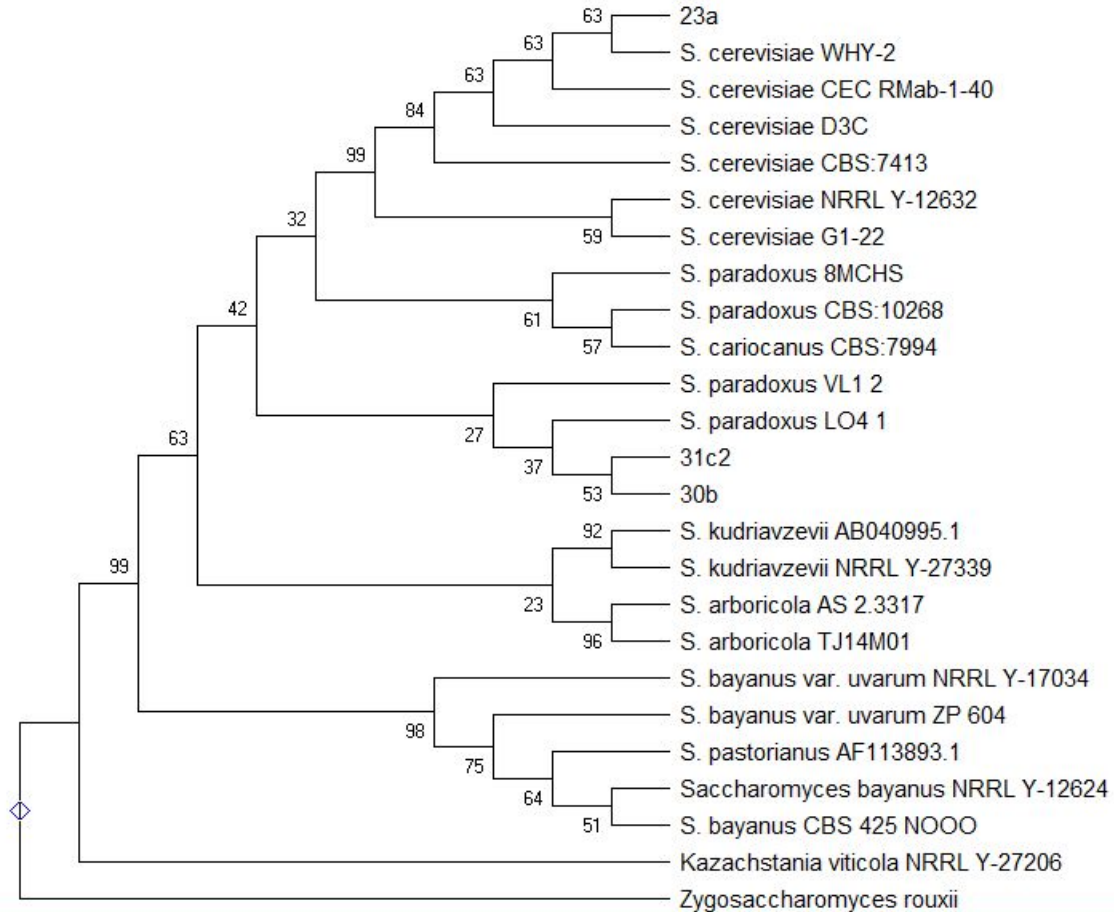


Figura 24. Árbol de agrupamiento, inferido usando el método Neighbor-Joining. El árbol consenso bootstrap se infirió de 1000 réplicas. El porcentaje de árboles réplica en los cuales los organismos asociados se agruparon en el ensayo bootstrap (1000 réplicas) se muestra enseguida de cada rama. El agrupamiento se calculó empleando el método Tamura-Nei y se encuentran en unidades de número de sustituciones de base por sitio. El análisis involucró 25 secuencias nucleotídicas, Todas las posiciones ambiguas se removieron para cada par de secuencias (opción de delección pairwise). Hubo un total de 587 posiciones en el arreglo final. Análisis de agrupamiento conducido en MEGA X.

En la Figura 24, se apreció que los aislados 30b y 31c (cepas 30 y 31, respectivamente), se agruparon con las cepas de referencia *Saccharomyces paradoxus* y se separaron del grupo de *S. cariocanus*. La razón por la que el análisis por BLAST arrojaba datos poco

convincientes, se debió a que algunas secuencias disponibles en la base de datos de la herramienta, contra las que se comparaban las muestras de interés, tenían un tamaño menor a 587 pb, donde no se consideraban las regiones indispensables para la diferenciación entre estas especies (altamente variables). El árbol se construyó considerando las secuencias que cumplieran con el anterior requisito (Figura 24). En el caso del aislado 23a (cepa 23), se agrupó adecuadamente con *S. cerevisiae*.

Saccharomyces cerevisiae, *S. bayannus*, *S. mikatae*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. pastorianus* y *S. paradoxus* forman parte de un grupo denominado *Saccharomyces sensu stricto*, el cual agrupa levaduras de interés en la industria de la fermentación. Las especies de este grupo se encuentran relacionadas estrechamente y, en algunos casos, incluso no existe una clara separación.

Los porcentajes de identidad existentes entre especies son de 46-59% entre *S. cerevisiae* y *S. paradoxus* y hasta de 70% entre *S. bayanus* y *S. pastorianus* (Redzepovic *et al.*, 2002; Franco-Díaz, 2018).

Asimismo, se reporta que, en el dominio D1/D2 del ADNr 26S, existen diferencias entre especies de hasta una única base (Orberá-Ratón. 2004). Lo anterior concuerda también con lo reportado para el gen ribosomal 18S, donde existen diferencias de tan sólo un base entre *S. cariocanus* y *S. cerevisiae* y *S. paradoxus*; asimismo, se reporta que, aún en regiones ribosomales que presentan una mayor variación en sus secuencias, las regiones ITS1 e ITS2 (regiones dentro de la unidad transcripcional que contiene los genes ribosomales), las diferencias entre las especies anteriormente mencionadas no superan las cinco bases (Naumov *et al.*, 2000). Lo anterior permite explicar las dificultades al momento de asignar una identidad definida a las secuencias de las cepas analizadas.

Es importante notar que la literatura reporta que el agar WL, empleado en este trabajo para la identificación de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, permite el crecimiento por igual

de todas las levaduras pertenecientes al grupo *Saccharomyces sensu stricto*, lo cual permite explicar por qué se identificó experimentalmente a especies ajenas a *Saccharomyces cerevisiae* pero pertenecientes al género *Saccharomyces* (Redzepovic *et al.*, 2002).

Además, se establece la necesidad de acoplar técnicas genéticas moleculares a las distintas pruebas fisiológicas existentes para la identificación de levaduras *Saccharomyces*, pues estas últimas resultan poco confiables al depender de las condiciones de cultivo y de la cepa en estudio, entre otras tantas desventajas (Smole-Mozina *et al.*, 1997; Redzepovic *et al.*, 2002).

Una técnica reconocida en la literatura para una efectiva identificación de levaduras del grupo *Saccharomyces sensu stricto*, es la amplificación del espaciador transcrito interno (ITS, por sus siglas en inglés) perteneciente al ADNr 18S y el posterior análisis RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) de los amplicones digeridos con determinadas enzimas, principalmente, *HaeIII* y *MspI* (Smole-Mozina, 1997; Redzepovic *et al.*, 2002).

Smole-Mozina *et al.* (1997) pudo establecer patrones de restricción empleando las enzimas *Hae III* y *MspI* para *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* y *S. bayanus* que permiten la rápida identificación de estas levaduras en menos de dos días; sin embargo, (Naumov, *et al.*, 2000) propone una serie de pruebas fisiológicas que permiten distinguir efectivamente entre especies del grupo *Saccharomyces sensu stricto* sin necesidad de pruebas moleculares.

Existe evidencia en cuanto al aislamiento de *Saccharomyces paradoxus* de uvas empleadas para vinificación (Redzepovic *et al.*, 2002; Miranda-Castilleja, *et al.*, 2014). En cuanto a la viabilidad enológica de *S. paradoxus*, las referencias bibliográficas indican que presenta un comportamiento fermentativo adecuado en mosto de uva, es decir, produce etanol hasta en un 12% v/v, resiste concentraciones elevadas del mismo, algunas cepas presentan una baja producción de compuestos relacionados negativamente con el perfil sensorial del vino (como el H₂S) y una baja producción de ácidos volátiles, lo que se relaciona con un impacto

discreto en el perfil sensorial del vino (Redzepovic *et al.*, 2002). Asimismo, Orlic *et al.* (2007) evaluó el perfil sensorial de vino blanco producido por distintas cepas de *S. paradoxus* y lo comparó con el producido por una cepa comercial de *S. cerevisiae*. Por lo anterior, los resultados son alentadores en cuanto al uso de *S. paradoxus* como inóculo iniciador de la fermentación de mosto de uva.

- Cinética de crecimiento. Propuesta para relacionar DO con UFC.

Tras las pruebas de tolerancia a etanol, se comienza el estudio de la cinética de crecimiento de las levaduras seleccionadas, desarrollando una cinética de crecimiento con la levadura control. La cinética tiene por objeto relacionar valores de densidad óptica (D.O.) con determinados valores de UFC. Se desarrollaron dos cinéticas en condiciones idénticas para poder cubrir aquellos tiempos dentro de la cinética que fueran imposibles de determinar en una u otra fermentación.

Con base en las Figuras 25 y 26, se puede apreciar que la levadura alcanza la fase estacionaria tras 24 horas de incubación. Asimismo, con base en la Tabla 22 se puede apreciar que existe una clara correlación entre las lecturas de D.O. y las cuentas obtenidas en placa, pues los valores correspondientes de 0-6 horas se mantienen relativamente estables (fase de adaptación o lag), los valores correspondientes de 12-24 horas van en aumento (fase exponencial de crecimiento) y los valores correspondientes de 24-36 horas se mantienen relativamente estables, marcando la entrada de la levadura en la fase estacionaria de crecimiento.

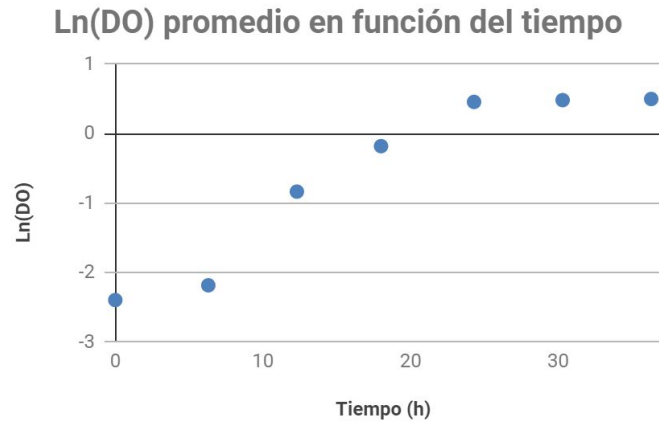


Figura 25. Cinética de crecimiento para levadura control con base en las determinaciones de DO realizadas cada 6 horas

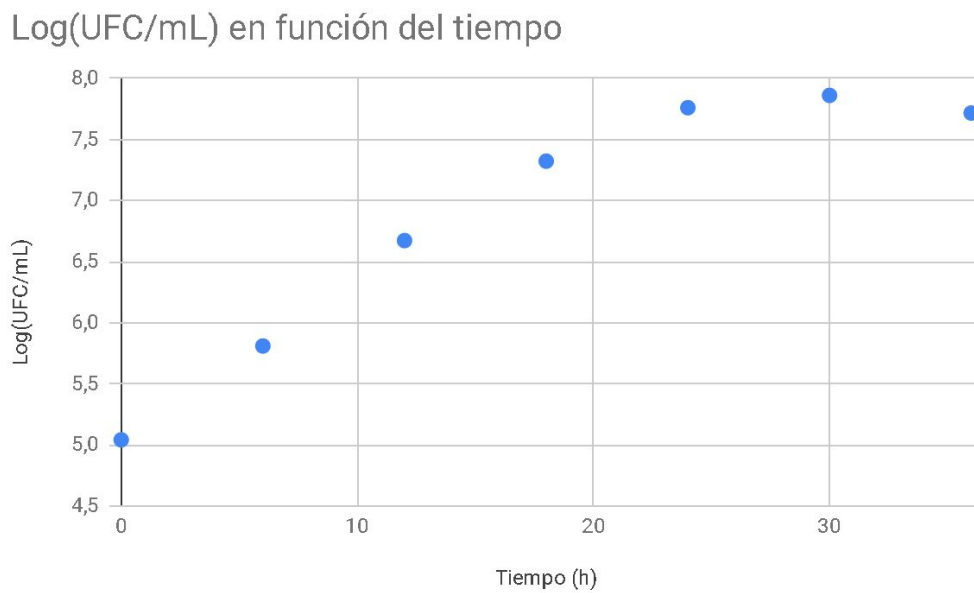


Figura 26. Cinética de crecimiento para levadura control con base en las determinaciones de UFC/mL realizadas cada 6 horas

Tabla 22. Valores promedio de cuenta en placa y D.O. cada 6 horas en la fermentación.

Tiempo (h)	LOG (UFC/mL)	DO
0	5,04	0,091
6	5,81	0,113
12	6,67	0,433
18	7,32	0,833
24	7,76	1,574
30	7,86	1,615
36	7,72	1,642

Con base en los resultados obtenidos, se puede generar un gráfico que permita relacionar valores de DO con valores determinados de UFC/mL (Figura 27).

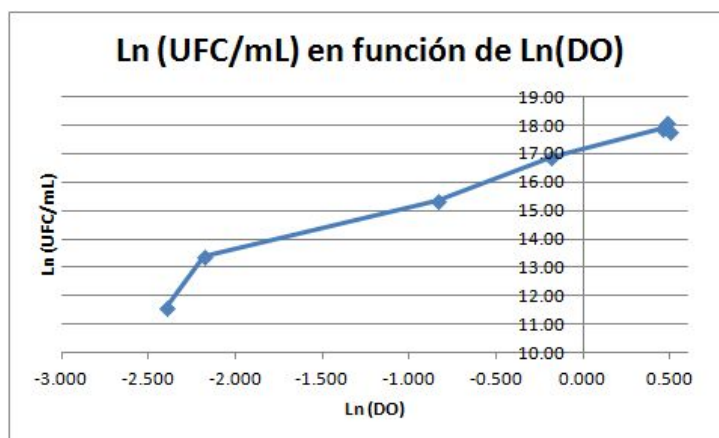


Figura 27. Ln(UFC/mL) en función de Ln(DO).

Se construyó una curva que permitiera relacionar valores de D.O. con UFC/mL, mediante la extrapolación de un valor de D.O. en la región lineal de dicha curva. Ya que tanto los valores de UFC/mL como de D.O. presentaban una tendencia exponencial, al aplicar el logaritmo natural se logró linealizar estos valores.

Ahora bien, si se supone la fase exponencial desde $\text{Ln}(\text{DO})=-2.18$ a $\text{Ln}(\text{DO})=0.45$, se obtiene una recta con un coeficiente de correlación (r^2) de 0.996 y una ecuación de la recta como $\text{Ln}(\text{UFC/mL})= 1.7269(\text{Ln}(\text{DO}))+17.053$ (Figura 28). Este gráfico (Figura 28)

presenta la utilidad que, conociendo el volumen de una microvinificación y que se busca una concentración inicial en el mosto del orden de 10^5 - 10^6 UFC/mL mosto (Moreno-Arribas y Polo, 2009; Miranda-Castilleja, *et al.*, 2015), se puede determinar el volumen por inocular de un pre inóculo a una determinada concentración; dicha concentración se puede conocer por determinaciones de DO que estarían asociadas, por medio de la figura 28, a un valor definido de UFC /mL.

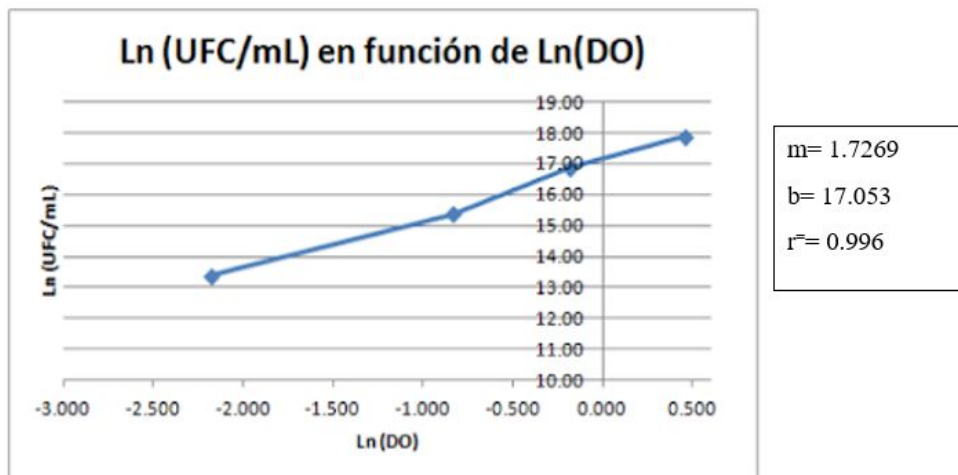


Figura 28. Relación lineal entre Ln(UFC/mL) y Ln(DO).

El presente gráfico permite extrapolar valores de DO para así obtener valores de UFC dados.

- Inicio de pruebas de micro vinificación.

Una vez identificadas las levaduras aisladas, se iniciaron las pruebas de micro vinificación. Para cada cepa, se seleccionó un lote de uvas de aquellas recolectadas al inicio del proyecto. Las uvas se mantuvieron en congelación hasta su selección. Se seleccionaron al azar los lotes 5, 3 y 7 para las cepas 23, 30 y 31, respectivamente.

Cada uno de los lotes seleccionados fue caracterizado mediante la determinación de °Bx y acidez titulable (Tabla 23). Con base en estas determinaciones, se realizó la corrección de

Miconi (para convertir los °Bx a g azúcar/100 cm³ mosto) y se determinó el índice de madurez de De Cillis y Odifredi (g azúcar/100 cm³ mosto/acidez total) (Tabla 24).

Tabla 23. Resultados obtenidos de °Bx y acidez total titulable de los lotes de uvas seleccionados.

Lote	°Bx	Acidez total (g ácido tartárico/ L mosto)
5	24.3 ± 0.2	6.1 ± 0.2
3	24.6 ± 0.0	6.0 ± 0.2
7	24.9 ± 0.3	6.5 ± 0.3

Se presentan los valores promedio con su desviación estándar.

Tabla 24. Contenido de azúcar y grado de maduración de las uvas.

Lote	Corrección de Miconi (g azúcar/100 cm ³ mosto)	Índice de De Cillis y Odifredi (g azúcar/100 cm ³ mosto/acidez total)
3	25.1 ± 0.3	4.1
5	25.5 ± 0.0	4.2
7	25.9 ± 0.4	4.0

Con base en la Tabla 24, se puede concluir que los tres lotes de uvas se encontraban en un grado óptimo de madurez (se esperan valores de 3 a 5) (Hidalgo, 2003).

Se tomaron de cada lote 75 g de uva y se estrujaron en condiciones estériles para analizar la concentración de glucosa y fructosa en uva previa fermentación mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés). Mediante el método del patrón externo, empleando la ecuación $\text{Área debajo de pico} = 1 \cdot 10^6 \cdot \% \text{glucosa} + 10141$ para la cuantificación de glucosa y la ecuación $\text{Área debajo de pico} = 1 \cdot 10^6 \cdot \% \text{fructosa} - 34068$

para la cuantificación de fructosa (Figuras 1 y 2, del apartado II en la sección de ANEXOS, respectivamente), se determinó la concentración de glucosa y fructosa en las muestras (Tabla 25). Los cromatogramas de cada muestra se encuentran en la sección III del Anexo.

Tabla 25. Contenido de glucosa y fructosa en uva pre fermentación.

Muestra	Fermentación en la que se empleó	Carbohidrato	Área ($\mu V*s$)	Concentración (%)
Mosto lote 5	23	Glucosa	4003988	7.98
		Fructosa	3984057	8.04
Mosto Lote 3	30	Glucosa	4604951	9.18
		Fructosa	4646523	9.36
Mosto Lote 7	31	Glucosa	4059333	8.10
		Fructosa	4049808	8.16

Las uvas fueron después estrujadas en condiciones estériles y trasvasadas junto al orujo a matraces de 250 mL estériles. Se aplicó un proceso de termovinificación reportado por Miranda-Castilleja *et al.*, 2014 (60 °C por 20 minutos), con el objetivo de reducir la población microbiana nativa de las uvas. Posterior al tratamiento térmico, se sulfitó el mosto con una concentración de 50 mg SO₂/L mosto (considerando un volumen de mosto de 250 mL en el caso de los lotes de 250 g de uva pesada o 200 mL en el caso de los lotes de 200 g de uva pesada).

Posteriormente, se aplicó una maceración al mosto sulfitado durante 24 horas a 25 °C con el objetivo de favorecer la extracción de diversos compuestos del orujo hacia el jugo. Transcurrido este período de tiempo, se filtró el mosto en manta de cielo estéril y se prensó el orujo manualmente para extraer la mayor cantidad de componentes del mismo previa fermentación y, también, facilitar la recuperación de las lías (residuos de levaduras) una vez concluida la fermentación. Este jugo de uva se recolectó en matraces de 250 mL estériles.

En la tabla 26, se presentan los volúmenes obtenidos de jugo de uva proveniente del prensado del orujo. Se prepararon dos lotes por fermentación para tener en cada una un duplicado.

Tabla 26. Volumen de jugo generado post prensado.

Lote de uva	Volumen producido en matraz 1 (mL)	Volumen producido en matraz 2 (mL)
23	100	100
30	134	138
31	134	144

A partir de estos volúmenes de prensado, se tomaron alícuotas de 13 mL para determinar el contenido de antocianinas previa fermentación y, únicamente para los lotes 30 y 31, de 10 mL para determinar la concentración de glucosa y fructosa en el jugo prensado previa fermentación, lo anterior con el objetivo de evaluar el efecto del prensado en la extracción de carbohidratos fermentables. En la Tabla 27 se presenta la concentración de glucosa y fructosa en el jugo de uva prensado pre fermentación, determinada por HPLC y cuantificada mediante el método del patrón externo, empleando la ecuación de las rectas ya mencionadas para la cuantificación de estos carbohidratos en uva pre fermentación. Los cromatogramas de estas muestras se encuentran en la sección III del Anexo.

Tabla 27. Contenido de glucosa y fructosa en jugo de uva pre-fermentación.

Muestra	Fermentación en la que se empleó	Carbohidrato	Área ($\mu V*s$)	Concentración (%)
Jugo de uva, matraz I	30	Glucosa	4567861	9.12
		Fructosa	4553842	9.18
Jugo de uva, matraz II	30	Glucosa	4672395	9.32
		Fructosa	4652894	9.38
Jugo de uva, matraz I	31	Glucosa	4483917	8.94

		Fructosa	4433910	8.94
Jugo de uva, matraz II	31	Glucosa	4724034	9.42
		Fructosa	4677287	9.42

Con base en la Tabla 25 y Tabla 27, se aprecia un incremento de entre 10 y 18% en el contenido de carbohidratos fermentables tras el prensado del orujo. De igual forma, se puede apreciar que la relación glucosa-fructosa coincide con lo reportado en la literatura para uvas con un grado adecuado de madurez (una proporción 1:1) (Jackson, 2014).

Al mismo tiempo que se preparaban los lotes con jugo de uva se comenzó la preparación del inóculo de cada una de las levaduras correspondientes. El inóculo se encontraba en congelación con glicerol al 15% v/v, el cual se descongeló a temperatura ambiente y se tomaron 0.3 mL que fueron inoculados en 4.5 mL de caldo YPD. Este caldo se incubó durante 24 horas a 25 °C. Posteriormente, se inocularon 0.12 mL de este caldo en 11.88 mL de caldo YPD en el caso de las cepas 30 y 31 y 0.06 mL en 11.94 mL de caldo YPD en el caso de la cepa 23. Lo anterior asociado a un desarrollo lento de las cepas 30 y 31 en comparación con la cepa 23.

Los caldos inoculados se incubaron a 25 °C por 16 horas hasta alcanzar valores de D.O. entre 0.113 y 0.600, pues estos valores se encuentran dentro del intervalo lineal de la ecuación propuesta para relacionar D.O. con UFC/mL. En la Tabla 28, se muestran los valores de D.O. obtenidos y la cuenta asociada a dicha medición, tomando como base la ecuación de la recta obtenida: $\text{Ln}(\text{UFC}/\text{mL})=1.7269\text{Ln}(\text{D.O.})+17.053$

Tabla 28. Valores de D.O. del pre inóculo de cada levadura y la cuenta asociada a dicho valor.

Levadura (cepa)	D.O. (600 nm)	UFC/mL
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (23)	0.448	10 ⁷
<i>Saccharomyces paradoxus</i> (30)	0.495	10 ⁷
<i>Saccharomyces paradoxus</i> (31)	0.431	10 ⁷

Con base en las cuentas obtenidas del pre inóculo, se inoculó el jugo de uva para lograr una concentración de 10⁵ UFC/mL al inicio de la fermentación.

Se dió inicio a la microvinificación y se siguió el peso y temperatura a lo largo del proceso fermentativo hasta que se alcanzara un peso constante en ambos matraces por fermentación (Figura 29 a Figura 34).

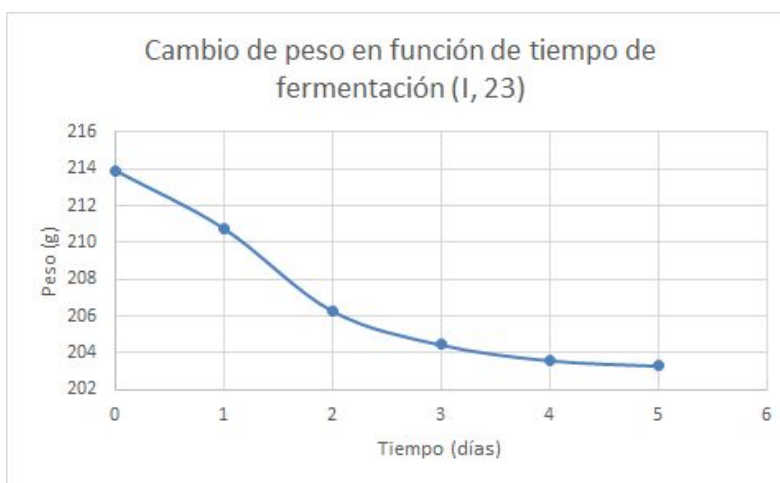


Figura 29. Avance de la fermentación. Fermentación 23, lote I.

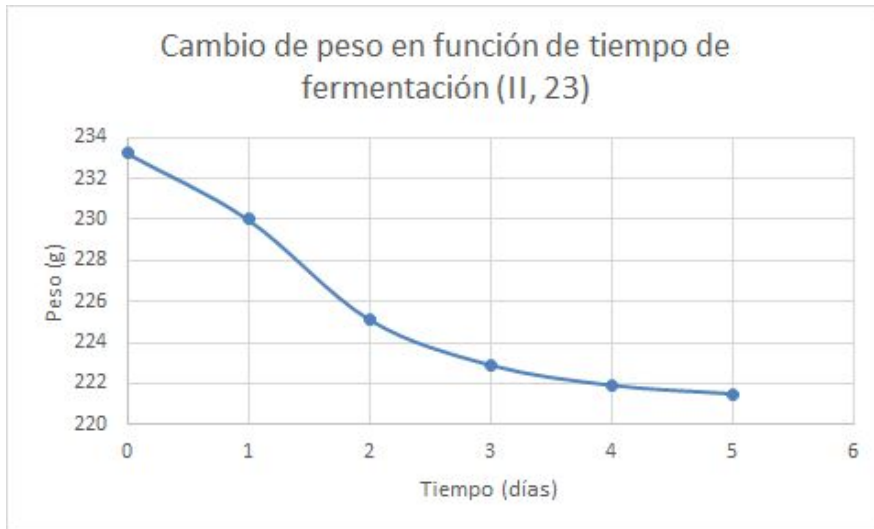


Figura 30. Avance de la fermentación. Fermentación 23, lote II.

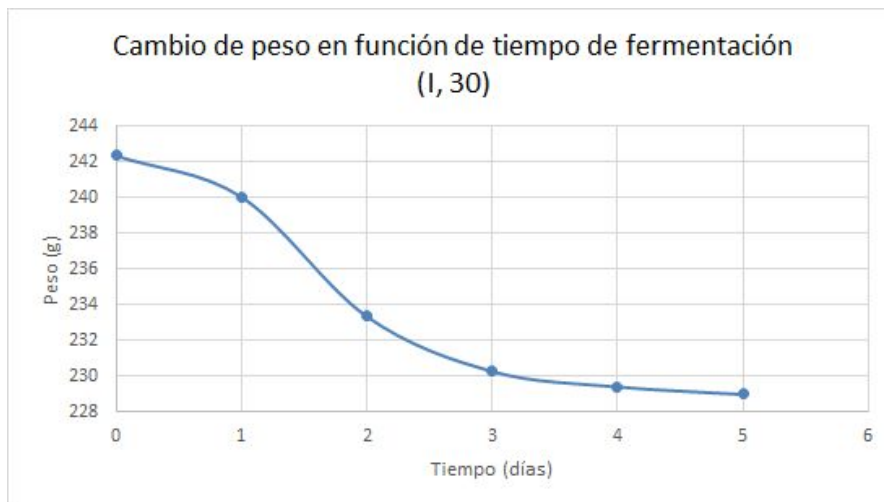


Figura 31. Avance de la fermentación. Fermentación 30, lote I.

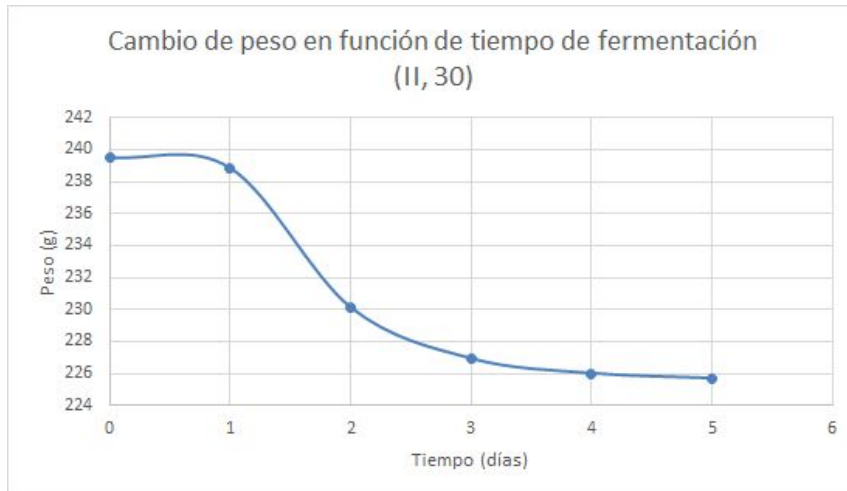


Figura 32. Avance de la fermentación. Fermentación 30, lote II.

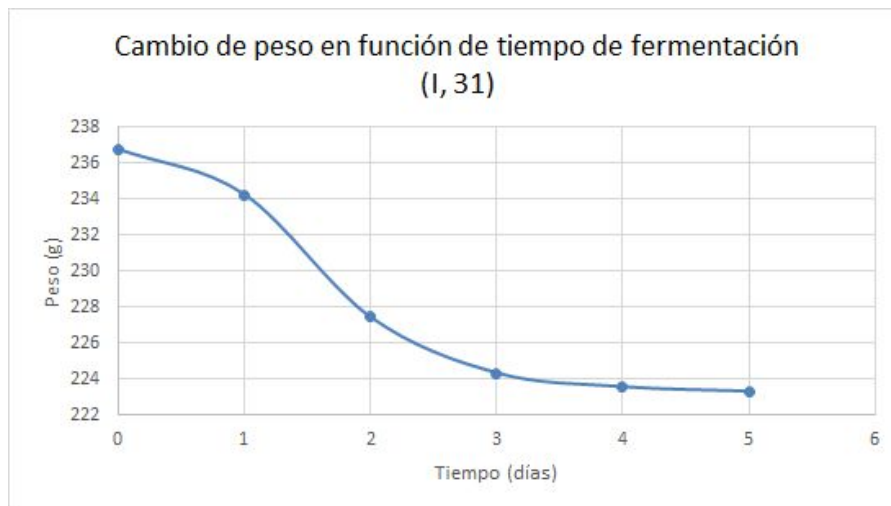


Figura 33. Avance de la fermentación. Fermentación 31, lote I.

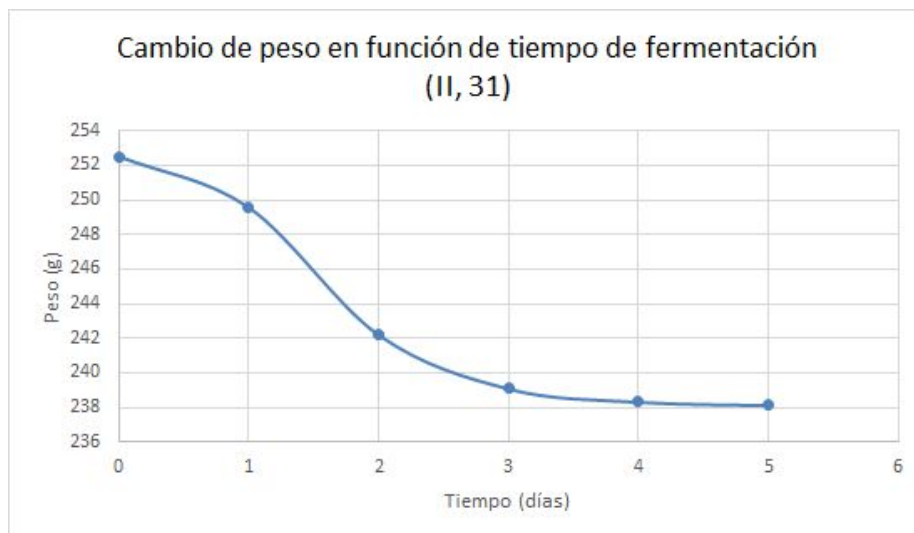


Figura 34. Avance de la fermentación. Fermentación 31, lote II.

Al segundo día de iniciada la fermentación, se removió la manta de cielo estéril que recubría cada matraz (colocada para favorecer la aireación al inicio del proceso y favorecer así el desarrollo de las levaduras) (Chávaro-Ortíz, 2014) y se cambió por una tapa de plástico para favorecer condiciones de semi anaerobiosis.

Una vez alcanzado peso constante en ambos matraces, se consideró la fermentación como completa, pues las levaduras dejan de consumir el mosto cuando la aparición de etanol es máxima; asimismo, la aparición de etanol (con menor densidad que el agua, modificando así el peso de cada matraz) y a la transformación de nutrientes en CO_2 y otras especies volátiles por parte de las levaduras influyen en el cambio de peso de cada matraz (Chávaro-Ortíz, 2014). Posteriormente, se tomaron alícuotas para determinar $^{\circ}\text{Bx}$, acidez titulable y concentración de antocianinas adsorbidas en la pared celular de las levaduras (Tabla 29).

Tabla 29. °Bx, acidez total y % adsorción de antocianinas para cada una de las cepas probadas.

Cepa	Acidez total (g ácido tartárico/L vino)	°Bx residuales	% adsorción antocianinas
<i>S. cerevisiae</i>	8.8 ^a	7.4 ^a	2.27 ^a
<i>S. paradoxus b</i>	10.35 ^b	8 ^a	3.86 ^a
<i>S. paradoxus c</i>	9.2 ^a	8.3 ^a	5.77 ^a

Letras iguales indican que no existe diferencia significativa entre muestras ($p \leq 5\%$).

Los vinos obtenidos presentan un contenido °Bx post fermentación desde 7.4 hasta 8.3; sin embargo, es importante considerar que los °Bx no permiten determinar azúcares directamente, sino únicamente sólidos solubles. Con base en los valores iniciales, se aprecia una reducción de °Bx al final de la fermentación, lo que se puede asociar con un evidente avance de la fermentación.

En cuanto a la acidez total, los valores producidos por la cepa de *S. paradoxus b* son superiores a los deseados para un vino (4-9 g/L ácido tartárico). Una posible solución sería una fermentación malo láctica (Miranda, *et al.*, 2014, Iowa State University, 2018); esta operación reduce la acidez del vino mediante la inoculación de bacterias ácido-lácticas (generalmente, *Oenococcus oeni*) para transformar el ácido málico en ácido láctico, reduciendo así la percepción de acidez, incrementando el pH, aportando una mayor complejidad sensorial y estabilidad microbiológica al vino (Chávaro-Ortíz, 2014; Jackson, 2014).

Con respecto a la adsorción de antocianinas en la pared celular de las levaduras al final de la fermentación, no existe diferencia significativa entre las cepas evaluadas; de igual forma, los valores concuerdan con lo reportado en la literatura para antocianinas glucosiladas adsorbidas (% adsorción de 3.07 reportado para vinificaciones con uva variedad Cabernet

Sauvignon) y no representan un impacto significativo al contenido de antocianinas glucosiladas en el vino (Morata, *et al.*, 2003). Los diferentes porcentajes de adsorción se pueden asociar a diferencias en la pared celular de cada una de las cepas evaluadas ((Morata, *et al.*, 2003; Minaar, *et al.*, 2018).

En la Tabla 30 se presentan los datos de glucosa y fructosa post-fermentación y etanol producido. En el caso de los carbohidratos fueron detectados mediante HPLC y cuantificados empleando las mismas ecuaciones de las rectas presentadas previamente para la cuantificación de estos carbohidratos; para el etanol, se detectó mediante cromatografía de gases y se cuantificó mediante el método del patrón externo empleando la ecuación de la recta obtenida de la curva patrón $\text{Área}=2590*(\% \text{ v/v etanol}) - 143.45$, presente en la figura 3 del apartado II en la sección de Anexos. Los cromatogramas de cada muestra se encuentran en la sección III del Anexo.

Tabla 30. Contenido de etanol, glucosa y fructosa post-fermentación para cada una de las cepas probadas.

Levadura	Fructosa (% m/v)	Glucosa (% m/v)	Etanol (% v/v)
<i>S. cerevisiae</i>	0.16 ± 0.01 ^a	0.00 ^a	12.56 ± 0.40 ^a
<i>S. paradoxus</i> b	0.17 ± 0.01 ^a	0.00 ^a	12.98 ± 0.03 ^a
<i>S. paradoxus</i> c	0.14 ± 0.0 ^a	0.00 ^a	13.25 ± 0.14 ^a

-Se presentan valores promedio y su desviación estándar.

-Letras iguales indican que no existe diferencia significativa ($p \leq 5\%$).

Todas las cepas evaluadas presentaron un contenido residual de azúcares desde 0 hasta 1.8 g/L (ya fuere glucosa o fructosa) al final de la fermentación, pudiendo considerarse los vinos producidos como secos. Este comportamiento fermentativo es el deseable para una levadura de interés enológico (Miranda, *et al.*, 2014); asimismo, se reporta en la literatura que al final de la fermentación, es de esperar que la fructosa esté en mayor concentración

que la glucosa, pues ésta última se prefiere como fuente de carbono por las levaduras (V. Moreno-Arribas y C. Polo, 2009).

Con respecto al contenido de etanol, se aprecia que las tres levaduras evaluadas produjeron concentraciones de etanol dentro de los valores esperados para vino (8-5 %v/v hasta 14% v/v), siendo *S. paradoxus c* la mayor productora (Jackson, 2014; Miranda, *et al.*, 2014); sin embargo,, no existe diferencia significativa entre las tres levaduras en cuanto al contenido de etanol en vino ($p \leq 5\%$).

Con los datos de la Tabla 30, se puede determinar el rendimiento producto biomasa ($Y_{p/x}$) con respecto al etanol y la eficiencia fermentativa, comparando el contenido de etanol esperado (calculado con la ecuación $0.6757 \cdot Bx - 2.0839$) (García-Cazorla y Xirau-Vayreda, 2000) y el valor obtenido al final de la fermentación. (Tabla 31).

Tabla 31. Rendimiento producto-biomasa con respecto al etanol ($Y_{p/x}$), eficiencia fermentativa y la conversión azúcar:etanol al final de la fermentación.

Levadura	$Y_{p/x}$ ($\frac{\% \text{ v/v etanol}}{UFC/mL}$)	Eficiencia fermentativa ^a
<i>S. cerevisiae</i>	$10^{-7.15}$ ^a	87.59%
<i>S. paradoxus b</i>	$10^{-6.40}$ ^b	89.27%
<i>S. paradoxus c</i>	$10^{-6.54}$ ^c	89.89 %

a: los valores de etanol esperados son: para el lote de la cepa 23 de 14.34% v/v, para el lote de la cepa 30 de 14.54% v/v y para el lote de la cepa 31 de 14.74% v/v

b: Letras iguales indican que no existe diferencia significativa ($p \leq 5\%$).

Con base en los resultados de la Tabla 31, se aprecia que las levaduras *S. paradoxus b* y *c* presentan un mayor rendimiento producto-biomasa ($Y_{p/x}$) en comparación con *S. cerevisiae*, lo que se traduce en una mayor producción de etanol con un desarrollo limitado

de biomasa. Con respecto a la eficiencia fermentativa, se observa también el mismo comportamiento, donde las cepas de *S. paradoxus* presentan los mejores rendimientos fermentativos. En la literatura, se reportan valores de eficiencia fermentativa de entre 82% al 90% para cepas de *S. cerevisiae* y *S. paradoxus*, por lo que los valores obtenidos en el presente trabajo se pueden interpretar como un comportamiento fermentativo óptimo para levaduras de interés enológico (Miranda-Castilleja, *et al.*, 2014):

Una vez concluida cada una de las microvinificaciones, se evaluó el aroma que desprendía cada lote de vino producido, notando un marcado olor a huevo en aquellos lotes correspondientes a *S. paradoxus* tanto b como c. Esto se puede asociar a una elevada producción de compuestos azufrados, pues son estos los que se asocian con las notas detectadas. En el apartado III de la sección de ANEXOS se puede apreciar en los cromatogramas correspondientes a cromatografía de gases, ciertos picos al inicio de la corrida, los cuáles podrían estar relacionados precisamente con estos compuestos azufrados altamente volátiles (Moreno-Arribas y Polo, 2009). Es importante destacar que la literatura reporta como posible solución a la aparición de compuestos azufrados, el efectuar varios trasiegos, ya que al ser altamente volátiles, de esta forma se favorece su liberación antes del embotellado del vino (Jackson, 2014).

Con base en los resultados obtenidos, se recomendaría el uso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para su aplicación en la industria enológica. Lo anterior con base en que esta levadura presenta la menor adsorción de antocianinas de las tres levaduras evaluadas, una producción de etanol dentro de los valores esperados, la completa fermentación de los carbohidratos fermentables en el mosto de uva, la producción de una acidez total dentro de los valores esperados para un vino comercial y un impacto sensorial esperado en el producto terminado.

9. Conclusiones

Se lograron aislar levaduras pertenecientes al género *Saccharomyces* a partir de una fermentación natural de uvas variedad Cabernet Sauvignon de la región de El Marqués, Querétaro.

Las levaduras aisladas probaron tolerar concentraciones de SO₂ (empleadas típicamente en la industria vitivinícola) de 70 mg/L mosto de uva y concentraciones de hasta 14% v/v de etanol.

Las levaduras de interés (denominadas cepa 23, 30 y 31) fueron identificadas, analizando la secuencia del dominio D1/D2 del ADNr 26 S, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces paradoxus* y *Saccharomyces paradoxus*, respectivamente.

Las tres levaduras presentaron un comportamiento fermentativo adecuado para una levadura de interés enológico, es decir, cada una fue capaz de utilizar fructosa y glucosa según lo previsto para una levadura enológica.

Las levaduras *S. cerevisiae* y *S. paradoxus* c presentaron una producción de acidez total adecuada para un vino comercial; por el contrario, *S. paradoxus* b presentó valores elevados.

Con respecto a la concentración de antocianinas adsorbidas en la pared celular de las levaduras, se concluyó que no existe diferencia significativa entre las tres levaduras evaluadas. Lo anterior permite concluir que cualquiera de las tres levaduras aisladas podría emplearse en la elaboración de vinos tintos, considerando como único criterio su baja adsorción de antocianinas.

Con respecto al producto-biomasa ($Y_{p/X}$), las levaduras *S. paradoxus* b y c presentaron mejores valores (más grandes) en comparación con la cepa de *S. cerevisiae* evaluada. El mismo comportamiento se encontró para el contenido de etanol al final de la fermentación y para el rendimiento fermentativo.

La levadura *S. cerevisiae* aislada se considera como la más adecuada para su aplicación en la industria enológica debido a su adecuado contenido de etanol, una acidez total dentro del rango esperado, una completa fermentación de los carbohidratos fermentables del mosto de uva y la menor adsorción de antocianinas de entre las levaduras aisladas; sin embargo, el

bajo rendimiento producto-biomasa de esta levadura implicaría que se tendría que eliminar una mayor cantidad de biomasa del mosto fermentado.

10. Perspectivas

Evaluar el perfil sensorial de los vinos producidos por las tres cepas aisladas.

Evaluar el acoplamiento de una fermentación malo láctica en el vino producido por la cepa 30.

Identificar por métodos analíticos los compuestos químicos relacionados con la acidez y el perfil azufrado del vino.

11. Referencias

- Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos, 2018. *Resveratrol*. [En línea] (Actualizado en 2018). Disponible en : <https://medlineplus.gov/spanish/druginfo/natural/307.html> [último acceso el 4 de marzo de 2019].
- Blouin, J. y Peinaud, É. 2003. *Enología práctica. Conocimiento y elaboración del vino*. Barcelona: Mundi-Prensa. 353 p.
- Borboa, C., 2018. *La ruta del vino en Querétaro*. [En línea] (Actualizado el 11 de febrero de 2019). Disponible en: <https://www.eluniversal.com.mx/menu/la-ruta-del-vino-en-queretaro> [último acceso el 13/02/2019].
- Caridi, A., De Bruno, A., De Salvo, E., Piscopo, A., Poiana, M. y Sidari, R., 2016. Selected yeasts to enhance phenolic content and quality in red wine from low pigmented grapes. *European Food Research and Technology*, 2017 (243): 367-378.
- Chávaro-Órtiz, M., 2014. Tesis. *Evaluación de la calidad de vinos obtenidos con levaduras nativas seleccionadas en viñedos de Querétaro*. Querétaro: Universidad Autónoma de Querétaro.
- Consejo Mexicano Vitivinícola, 2019. *Datos de la industria*. [En línea] (Actualizado el 10 de febrero de 2019). Disponible en: Revisado el 14/02/2019, disponible en <http://uvayvino.org.mx/datos-industria.php#sabia-que> [último acceso 14 de febrero de 2019].
- Diamandis, E., Goldberg, D. y Solas, G., 1997. Wine as a Biological Fluid: History, Production, and Role in Disease Prevention. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 1997 (11): 287-313.
- Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México, 2018. *Cloranfenicol*. [En línea] (Actualizado a noviembre de 2018). Disponible en: http://www.facmed.unam.mx/bmd/gi_2k8/prods/PRODS/Cloranfenicol%20Ung.htm [Último acceso el 18 de noviembre de 2018].

- Fundación de Investigaciones Sociales, 2018. *Historia del vino en México*. [En línea] (Actualizado el 2018). Disponible en: www.fisac.org.mx/pdfdocument.cfm?articleid=422&catID= [último acceso el 30 de enero de 2019].
- Fernández-Espinar, M., Martorell, P., de Llanos, R. y Querol, A., 2005. *Molecular Methods to Identify and Characterize Yeasts in Food Beverages*. En: Fernández-Espinar, M., Martorell, P., de Llanos, R. y Querol, A. eds. *Yeasts in Food and Beverages*. Berlin: Springer, 55-83.
- Franco-Díaz, M., 2018. Tesis. *Identificación de las levaduras que participan en la fermentación natural para la producción de sotol*. Ciudad de México: UNAM
- García-Cazorla y Xirau-Vayreda., 2000. *Técnicas usuales de análisis en enología*. Barcelona: Panreac.
- Girard, G., 2004. *Bases científicas y tecnológicas de la enología*. Zaragoza: Acribia.
- Giusti, M. y Wrolstad, R., 2001. Characterization and measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 2001 (-): 1-13
- González, M., 2015. Tesis. *Evaluación de la persistencia de levaduras Saccharomyces en viñedos de la zona alta del río Mendoza*. Mendoza: Universidad Nacional de Cuyo.
- Grupo de Investigación en Viticultura, 2018. *Morfología de la vid*. Madrid: Universidad Politécnica de Madrid.
- Guzmán, G y Serrano, A., 1996. *Posibilidades del metabisulfito potásico en la industria cervecera*. Murcia: Universidad de Murcia.
- Hidalgo-Torres, J., 2003. *Tratado de Enología*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
- Instituto Nacional de Geografía y Estadística, 2017. *Anuario estadístico y geográfico de Querétaro 2017*. Aguascalientes: Instituto Nacional de Geografía y Estadística.

- Iowa State University, 2018. *Titrateable Acidity*. [En línea]. (Actualizado el 2018). Disponible en : <https://www.extension.iastate.edu/wine/titrateable-acidity> [Último acceso el 19 de abril de 2019].
- Jackson, R., 2014. *Wine Science*. California: ELSEVIER.
- Kovacevic, M., 2015. *Morphological and physiological characteristics of the yeast Saccharomyces cerevisiae cells differing in the life span*. Zagreb: Universidad de Zagreb.
- Martínez, P., 2009. Tesis. *Identificación de levaduras en el queso Cotija por métodos moleculares dependientes e independientes de cultivo (ARDRA, RFLP Y DGGE)*. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Martínez, M., 2015. *La industria del vino en México*. [En línea] (Actualizado al 2017). Disponible en: <https://www.forbes.com.mx/forbes-life/la-industria-del-vino-en-mexico/> [Último acceso el 15 de agosto de 2018].
- Miranda-Castilleja, D., *et al.*, 2014. Aislamiento, selección e identificación de levaduras *Saccharomyces* spp. nativas de viñedos en Querétaro, México. *Agrociencia*, 49 (7): 759-773
- Minaar, P., Nyobo, L., Jolly, N., Ntushelo, N. y Meiring, S. 2018., Anthocyanins and polyphenols in Cabernet Franc wines produced with *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* yeast strains: Spectrophotometric analysis and effect on selected sensory attributes. *Food Chemistry*, 2018 (268): 287-291
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M., Suberviola, J., Bartolomé, B., Colomo, B. y Suárez, J., 2003. Adsorption of Anthocyanins by Yeast Cell Walls during the Fermentation of Red Wines. *Journal Of Agricultural and Food Chemistry*, 2003 (51): 4084-4088.
- Moreno-Arribas, V. y Polo, C., 2009. *Wine chemistry and biochemistry*. Madrid: Springer.
- Morrays, E. y Eddy, A., 1956. Method for the measurement of wild yeast infection in pitching yeast. *J. Inst. Brew.*, 1 (63): 34-35
- Naumov, G., James, S., Naumova, E., Louis, E. y Roberts, I. Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000 (50): 1931-1942

- Navarre, C., 1994. *Manual d'Enologie*. París: Bailliére. 287 p.
- NMX-V-012-1986. BEBIDAS ALCOHÓLICAS. VINOS. ESPECIFICACIONES.
- Norma Oficial mexicana NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
- Orberá-Ratón, T., 2004. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Revista Iberoamericana de Micología*, 21 (2004): 15-19
- Organización Internacional de la Viña y el Vino, 2019. *Definición de productos*. [En línea] (Actualizado el 4 de febrero de 2019). Disponible en: <http://www.oiv.int/public/medias/5985/definici-n-de-productos.pdf> [último acceso 6 de febrero de 2019].
- Organización Internacional de la Viña y el Vino, 2019. *Estadísticas*. [En línea] (Actualizado el 10 de febrero de 2019). Disponible en: <http://www.oiv.int/es/bases-de-datos-y-estadisticas/estadisticas> [último acceso 14 de febrero de 2019].
- Organización Internacional de la Viña y el Vino, 2011. *Herramientas de biología molecular para identificar la levadura de vinificación Saccharomyces cerevisiae y otras especies de levadura relacionadas con la vinificación*. [Documento PDF] (Actualizado al 2011). Disponible en: <http://www.oiv.int/public/medias/1348/oiv-oeno-408-2011-es.pdf> [Último acceso el 29 de agosto de 2018]
- Orlic, S., Redzepovic, S., Jeromel, A., Herjavec, S. y Iacumin, L., 2007. Influence of indigenous *Saccharomyces paradoxus* strains on Chardonnay wine fermentation aroma. *International Journal of Food Science and Technology*, 2007 (42): 95-101
- Orlic, S., Arroyo-López, F., Huic-Babic, K., Lucilla, I., Querol, A. y Barrio, E., 2010. A comparative study of the wine fermentation performance of *Saccharomyces paradoxus* under different nitrogen concentrations and glucose/fructose ratios. *Journal of Applied Microbiology*, 2010 (108): 73-80
- Rebolo, S., 2007. Definición del vino. **En:** S. Rebolo ed. *Estudio de la composición polifenólica de vinos tintos gallegos con D.O.: Ribeiro, Valdeorras y Ribeira Sacra*. Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela.

- Redzepovic, S., Orlic, S. Sikora, S., Majdak, A. y Pretorius, I.S., 2002. Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* strains isolated from Croatian vineyards. *Letters in Applied Microbiology*, 35 (/): 305-310
- Smole-Mozina, S., Dlačny, D., Deak, T. y Raspor, P. 1997. Identification of *Saccharomyces sensu stricto* and *Torulaspota* yeasts by PCR Ribotyping. *Letters in Applied Microbiology*, 24 (/): 311-315
- Universidad California Davis, 2018. *Wine yeast diversity* [En línea]. (Actualizado el 2018).
Disponible en:
<http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast/diversity.html>
[Último acceso el 22 de agosto de 2018].
- Vaduano, E., Quintero, G., Constantitni, A., Pulcini, L., Pessione, E. y García-Moruno, E., 2018. Yeast distribution in Grignolino grapes growing in a new vineyard in Piedmont and the technological characterization of indigenous *Saccharomcyes* spp. strains. *International Journal of Food Microbiology*, 289 (2019): 154-161
- Winker, A., Cook, J., Kliewe, W. y Lieder, L., 1974. *General viticulture*. California: University of California Press. 710 p.
- Zanol, G.C., Baleiras-Couto, M. y Duarte, F. 2010. Restriction profiles of 26S rDNA as a molecular approach for wine yeasts identification. *Ciencia e Tecnica Vitivinicola*, 25 (2):75-85

12. Anexos

I. Cálculos

II. Curvas patrón

Curva patrón para glucosa

Curva patrón para glucosa

Curva patrón para etanol

III. Cromatogramas

Cromatogramas obtenidos por cromatografía de líquidos

Cromatogramas obtenidos por cromatografía de gases

I. Cálculos

a) Acidez total:

$$V_{\text{gastado NaOH } 0.1M} \left(\frac{0.1 \text{ mol NaOH}}{1000 \text{ mL disolución}} \right) \left(\frac{1 \text{ mol } \acute{\text{a}}\text{c. tartárico}}{2 \text{ mol NaOH}} \right) \left(\frac{150.087 \text{ g } \acute{\text{a}}\text{c. tartárico}}{1 \text{ mol } \acute{\text{a}}\text{c. tartárico}} \right) \left(\frac{1}{30 \text{ mL muestra}} \right) \left(\frac{30 \text{ mL muestra}}{3 \text{ mL vino}} \left(\frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L vino}} \right) \right)$$
$$= 3.9 \text{ mL} \left(\frac{0.1 \text{ mol NaOH}}{1000 \text{ mL disolución}} \right) \left(\frac{1 \text{ mol } \acute{\text{a}}\text{c. tartárico}}{2 \text{ mol NaOH}} \right) \left(\frac{150.087 \text{ g } \acute{\text{a}}\text{c. tartárico}}{1 \text{ mol } \acute{\text{a}}\text{c. tartárico}} \right) \left(\frac{1}{30 \text{ mL muestra}} \right) \left(\frac{30 \text{ mL muestra}}{3 \text{ mL vino}} \left(\frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L vino}} \right) \right)$$
$$= 9.8 \frac{\text{g } \acute{\text{a}}\text{cido tartárico}}{\text{L}_{\text{mosto o vino}}}$$

b) Corrección de Miconi:

$((^{\circ}\text{Bx}) * 1.2) - 4$; si se tiene $^{\circ}\text{Bx} = 24.6$:

$$((24.6) * 1.2) - 4 = 25.52 \frac{\text{g azúcar}}{100 \text{ cm}^3 \text{ mosto}}$$

c) Índice de De Cillis y Odifredi:

$$\text{Índice de De Cillis y Odifredi} = \left(\frac{\text{Corrección de Miconi}}{\text{Acidez total mosto}} \right) = \left(\frac{25.52 \text{ g azúcar}/100 \text{ cm}^3 \text{ mosto}}{5.8 \text{ g } \acute{\text{a}}\text{cido tartárico}/\text{L mosto}} \right) = 4.4$$

d) Concentración de antocianinas:

i) En mosto pre fermentación:

Empleando el método del pH diferencial, se considera la siguiente ecuación para obtener una Absorbancia corregida:

$$Abs \text{ corregida} = (A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{pH=1.0} - (A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{pH=4.5}$$

sustituyendo con valores experimentales se tiene que:

$$Abs \text{ corregida} = (1.001 - 0.009)_{pH=1.0} - (0.156 - 0.004)_{pH=4.5} = 0.840$$

Se considera al malvidín-3-glucósido como la antocianina de referencia (P.M.=493.2 g/mol; Coeficiente de absorción molar (ϵ)=28,000 L/mol*cm), un factor de dilución de 0.4 mL aforados a 10 mL con el buffer en cuestión. Se sustituyen los valores en la siguiente ecuación:

$[malvidín - 3 - glucósido] (mg/L) = (Abs_{corregida}) * (Peso\ molecular) * (Factor\ dilución) * (1000)/(\epsilon) * (1\ cm)$
 tal que,

$$= [malvidín - 3 - glucósido] (mg/L) = (0.840) * (493.2\ g/mol) * \left(\frac{10\ mL\ dis}{0.4\ mL\ muestra}\right) * \left(\frac{1000\ mg}{1\ g}\right) / (28,000\ \frac{L}{mol*cm}) * (1\ cm)$$

=369.90 mg malvidín-3-glucósido/L mosto

ii) Adsorbidas en superficie de levaduras:

Las lías producidas se resuspenden en 50 mL de vino y se toman alícuotas de 12.5 mL para llevar a cabo la extracción de antocianinas adsorbidas en la pared celular de las levaduras. Posteriormente, se sigue el mismo procedimiento del pH diferencial para cuantificar las antocianinas adsorbidas:

$$Abs\ corregida = (A_{520\ nm} - A_{700\ nm})_{pH=1.0} - (A_{520\ nm} - A_{700\ nm})_{pH=4.5}$$

sustituyendo con valores experimentales se tiene que:

$$Abs\ corregida = (0.058 - 0.012)_{pH=1.0} - (0.013 - 0.002)_{pH=4.5} = 0.035$$

Se considera al malvidín-3-glucósido como la antocianina de referencia (P.M.=493.2 g/mol; Coeficiente de absorción molar (ϵ)=28,000 L/mol*cm), un factor de dilución de 0.4 mL aforados a 10 mL con el buffer en cuestión. Se sustituyen los valores en la siguiente ecuación:

$[malvidín - 3 - glucósido] (mg/L) = (Abs_{corregida}) * (Peso\ molecular) * (Factor\ dilución) * (1000)/(\epsilon) * (1\ cm)$
 tal que,

$$= [malvidín - 3 - glucósido] (mg/L) = (0.035) * (493.2\ g/mol) * \left(\frac{10\ mL\ dis}{0.4\ mL\ muestra}\right) * \left(\frac{1000\ mg}{1\ g}\right) / (28,000\ \frac{L}{mol*cm}) * (1\ cm)$$

=15.41 mg malvidín-3-glucósido/L vino

Ahora bien, se sabe que se produjo en total un volumen de 103.1 mL de vino, por lo que, si existen 15.41 mg antocianinas adsorbidas en las levaduras correspondientes a 1L de vino,

para 103.1 mL de vino habrán 1.58 mg antocianinas adsorbidas a la pared celular de las levaduras.

Tal que, si al inicio se tenía una concentración de 369.90 mg antocianinas/L mosto, para un volumen de 103.1 mL, se tendrá un valor inicial del antocianinas de 38.14 mg antocianinas/L mosto. De tal forma que, si se adsorben 1.58 mg antocianinas se tendría un % de adsorción con respecto al contenido inicial de antocianinas, del 4.14%.

e) Ejemplo de cálculos de concentración empleando cromatogramas y método de patrón externo (concentración de fructosa):

Si se tiene un área debajo del pico observado en el cromatograma (asociado a la fructosa) para una muestra de uva estrujada de 4567861 $\mu V/s$ y se tiene una recta obtenida de una curva patrón (ANEXO, sección II, figura 2) de:

Área debajo de pico = $1 * 10^6 * \%fructosa - 34068$, se sustituye el área debajo tal que:

$$\%fructosa = ((4567861 \mu V/s + 34068) / (10^6)) * 2 = 9.2\% \text{ m/v.}$$

IMPORTANTE: El valor se multiplica por dos debido a que la muestra que se analizó en el cromatógrafo se diluyó en proporción 1:1 con la fase móvil.

f) Cálculo de UFC/mL a partir de una lectura de D.O.:

Se tiene la ecuación de la curva que permite relacionar valores de Densidad Óptica (D.O.) a 600 nm con UFC/mL, la cual es:

$$\ln(\text{UFC/mL}) = 1.7269(\ln(\text{DO})) + 17.053$$

Ahora bien, si se tiene una lectura en el pre inóculo de D.O.=0.495, se tiene que:

$$\ln(\text{UFC/mL}) = 1.7269(\ln(0.495)) + 17.053 = 15.84$$

Ahora bien, se aplica exponencial al valor obtenido para obtener UFC/mL, tal que:

$$\text{UFC/mL} = e^{15.84} = 7562014.7 \text{ UFC/mL}, \text{ aplicando } \log_{10} \text{ se tiene una cuenta de } 10^{6.9} \text{ UFC/mL}.$$

Ahora bien, si se tiene un volumen de jugo prensado de uva de 134 mL y un volumen por inocular de 111 mL (tras la toma de 10 mL para analizar fructosa y glucosa y 13 mL para analizar antocianinas pre fermentación) y se desea una concentración inicial de 10^5 UFC/mL, se sustituye en la siguiente ecuación:

$$V_1 * C_1 = V_2 * C_2$$

$$\text{donde } V_2 = 111 \text{ mL}, C_2 = 10^5 \text{ UFC/mL}, V_1 = ? \text{ mL}, C_1 = 10^{6.9} \text{ UFC/mL}$$

Entonces se tiene que

$$V_1 * 10^{6.9} \text{ UFC/mL} = 111 \text{ mL} * 10^5 \text{ UFC/mL}$$

$V_1 = 1.40 \text{ mL}$ se tienen que inocular del pre inóculo en 111 mL de mosto para lograr una concentración inicial de 10^5 UFC/mL

g) Cálculo de rendimiento producto-biomasa ($Y_{p/X}$):

$$\text{Se tiene la ecuación: } Y_{p/X} = \left(\frac{\%v/v \text{ etanol final} - \%v/v \text{ etanol inicial}}{\text{UFC/mL}_{\text{final}} - \text{UFC/mL}_{\text{inicial}}} \right),$$

sustituyendo valores experimentales se tiene que:

$$Y_{p/X} = \left(\frac{13.35 \%v/v - 0 \%v/v \text{ etanol}}{34 * 10^6 \text{ UFC/mL}_{\text{final}} - 10^5 \text{ UFC/mL}_{\text{inicial}}} \right) = 10^{-6.40}$$

NOTA: se supone que la concentración inicial del etanol en el mosto de uva es 0% v/v.

h) Eficiencia fermentativa:

Con base en las determinaciones de °Bx se puede calcular el contenido de etanol esperado como sigue:

$0.6757 \cdot \text{°Bx} - 2.0839$, sustituyendo valores experimentales se tiene:

$$0.6757 \cdot (24.6 \text{ °Bx}) - 2.0839 = 14.54\% \text{ v/v etanol.}$$

Experimentalmente, se obtuvo una concentración de etanol de 12.98% v/v, tal que la eficiencia fermentativa se calcula como sigue:

$$\text{Eficiencia fermentativa} = \frac{\% \text{ v/v etanol experimental}}{\% \text{ v/v etanol esperado}} * 100 = 89.27\%$$

II. Curvas patrón

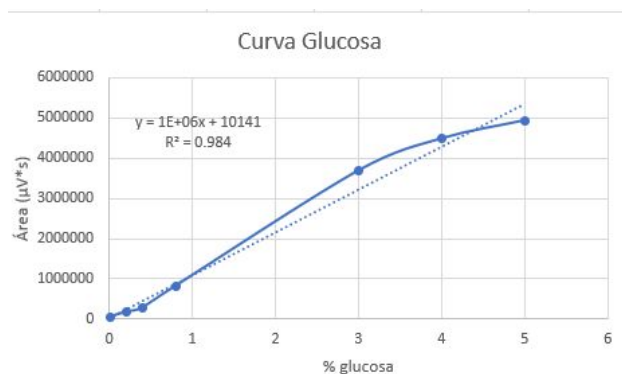


Figura 1. Curva patrón de glucosa.

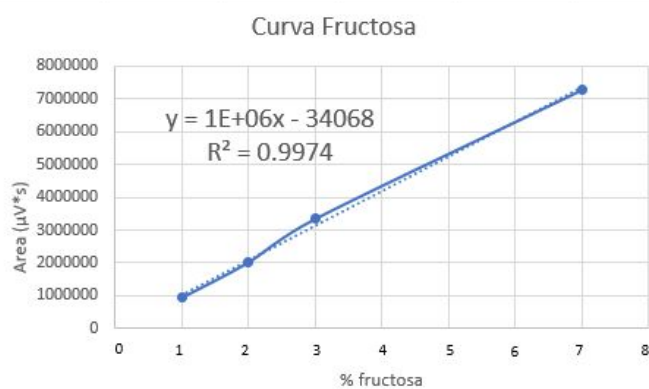


Figura 2. Curva patrón de fructosa.

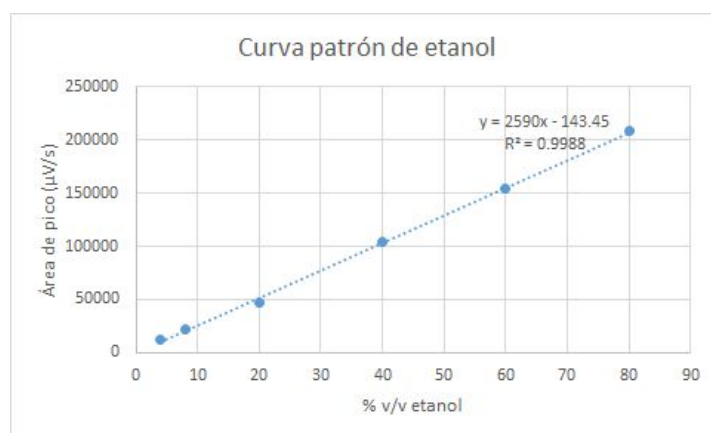


Figura 3. Curva patrón de etanol

III. Cromatogramas

Tabla para identificación de cromatogramas

Clave	Identidad	Análisis efectuados
01	Estrujado de uva. Lote 5 para fermentación 23	C.L.: F, G
02	Mosto fermentado por cepa 23 (<i>S. cerevisiae</i>). Lote I de fermentación	C.L.: F, G C.G.: E
03	Mosto fermentado por cepa 23 (<i>S. cerevisiae</i>). Lote II de fermentación	C.L.: F, G C.G.: E
04	Estrujado de uva. Lote 3 para fermentación 30	C.L.: F, G
05	Jugo prensado. Lote I para fermentación 30	C.L.: F, G
06	Jugo prensado. Lote II para fermentación 30	C.L.: F, G
07	Mosto fermentado por cepa 30 (<i>S. paradoxus</i> b). Lote I de fermentación	C.L.: F, G C.G.: E
08	Mosto fermentado por cepa 30 (<i>S. paradoxus</i> b). Lote II de fermentación	C.L.: F, G C.G.: E
09	Estrujado de uva. Lote 7 para fermentación 31	C.L.: F, G
10	Jugo prensado. Lote I para fermentación 31	C.L.: F, G
11	Jugo prensado. Lote Ii para fermentación 31	C.L.: F, G
12	Mosto fermentado por cepa 31 (<i>S. paradoxus</i> c). Lote I de fermentación	C.L.: F, G C.G.: E
13	Mosto fermentado por cepa 31 (<i>S. paradoxus</i> c). Lote II de fermentació	C.L.: F, G C.G.: E

C.L.=cromatografía de líquidos

C.G.= cromatografía de gases

F= fructosa

G= glucosa

E= etanol

Cromatogramas obtenidos por cromatografía de líquidos

-Tiempo de retención asociado a fructosa: 9 min. aprox.

-Tiempo de retención asociado a glucosa: 10 min. aprox.

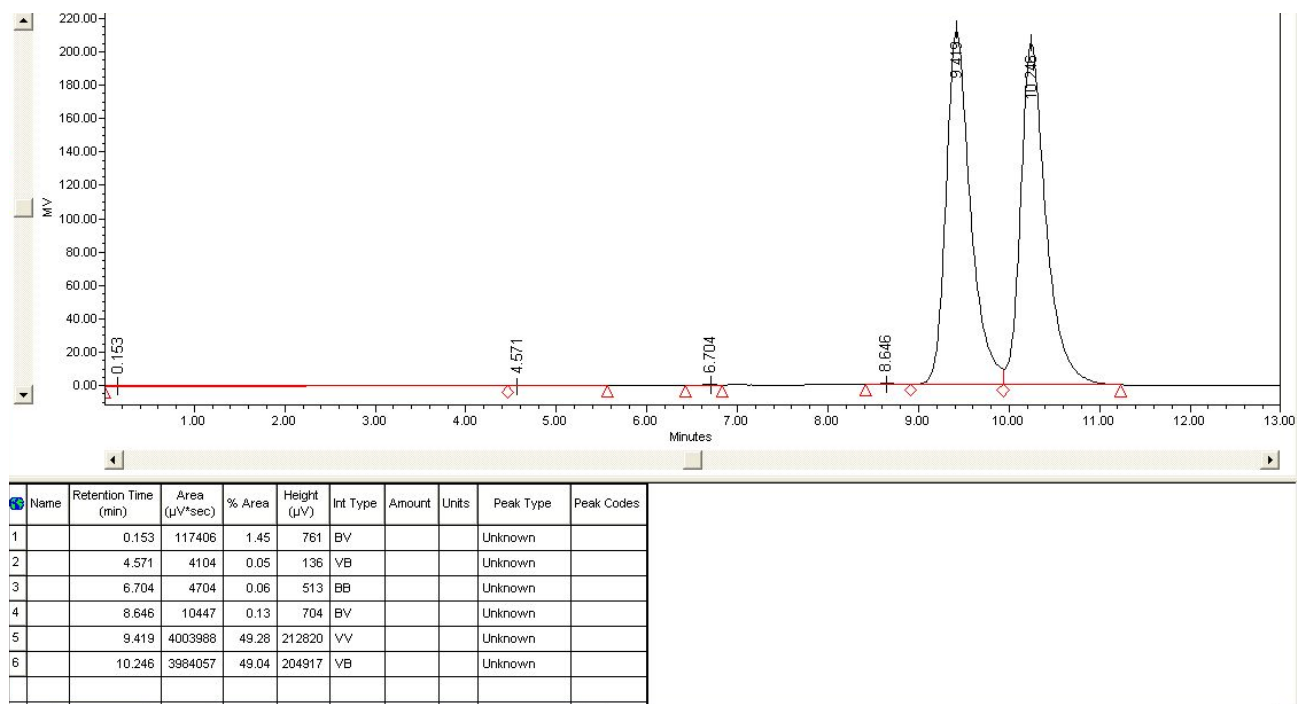


Figura 1. Cromatograma para muestra 1.

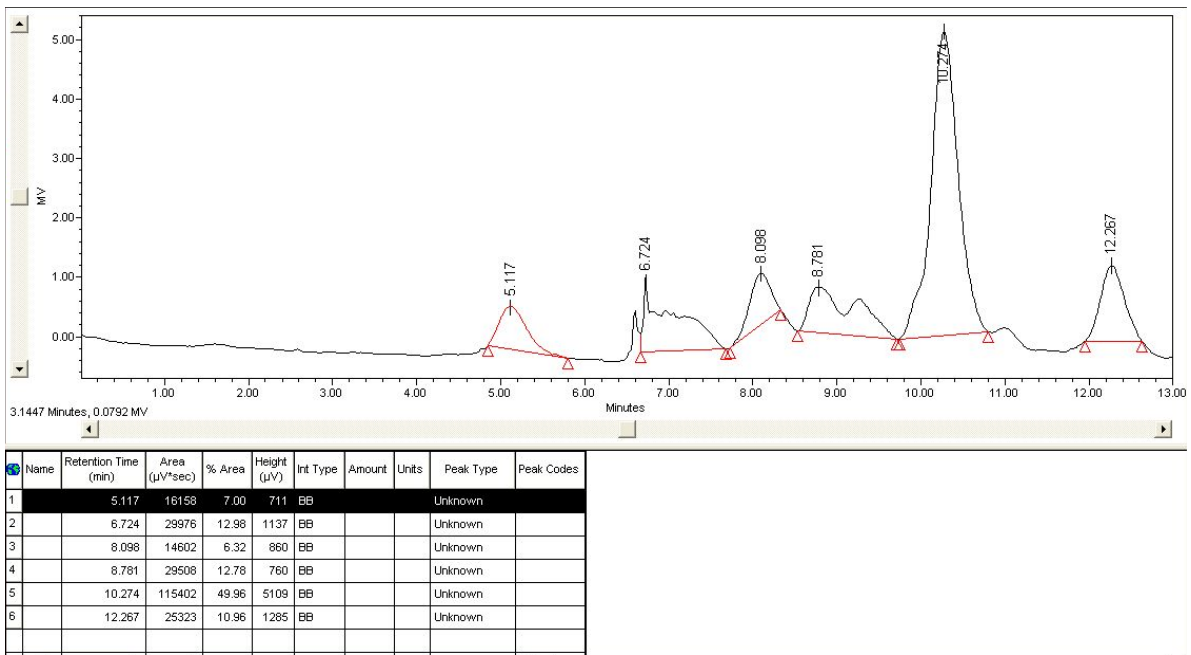


Figura 2. Cromatograma para muestra 2.

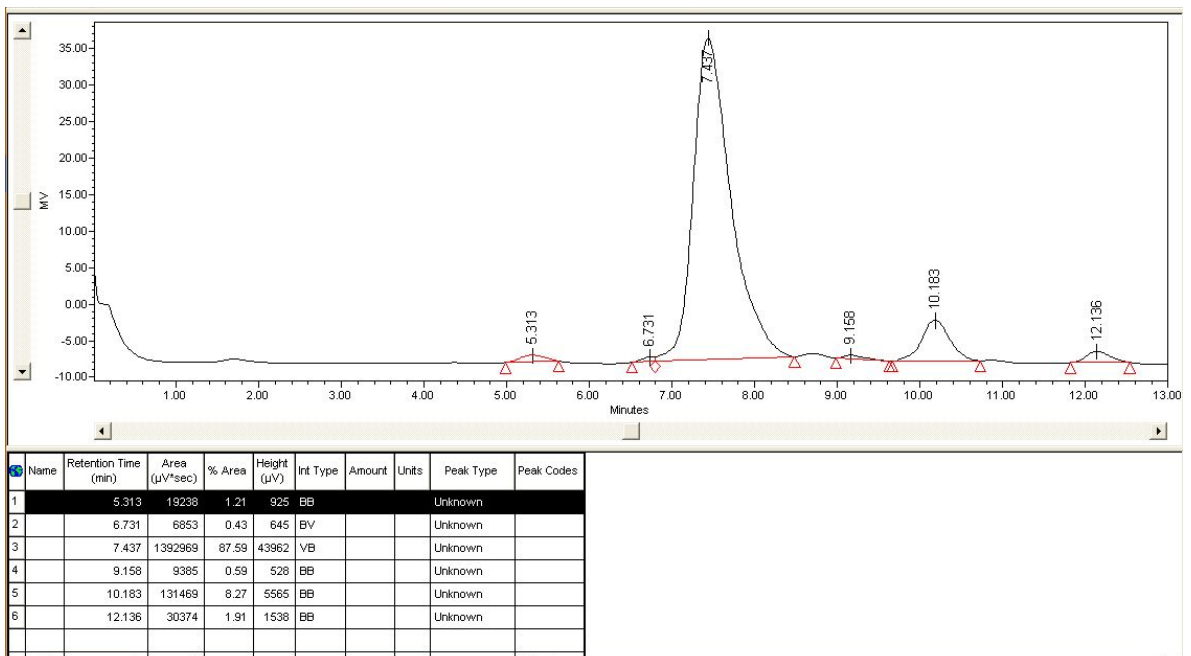


Figura 3. Cromatograma para muestra 3.

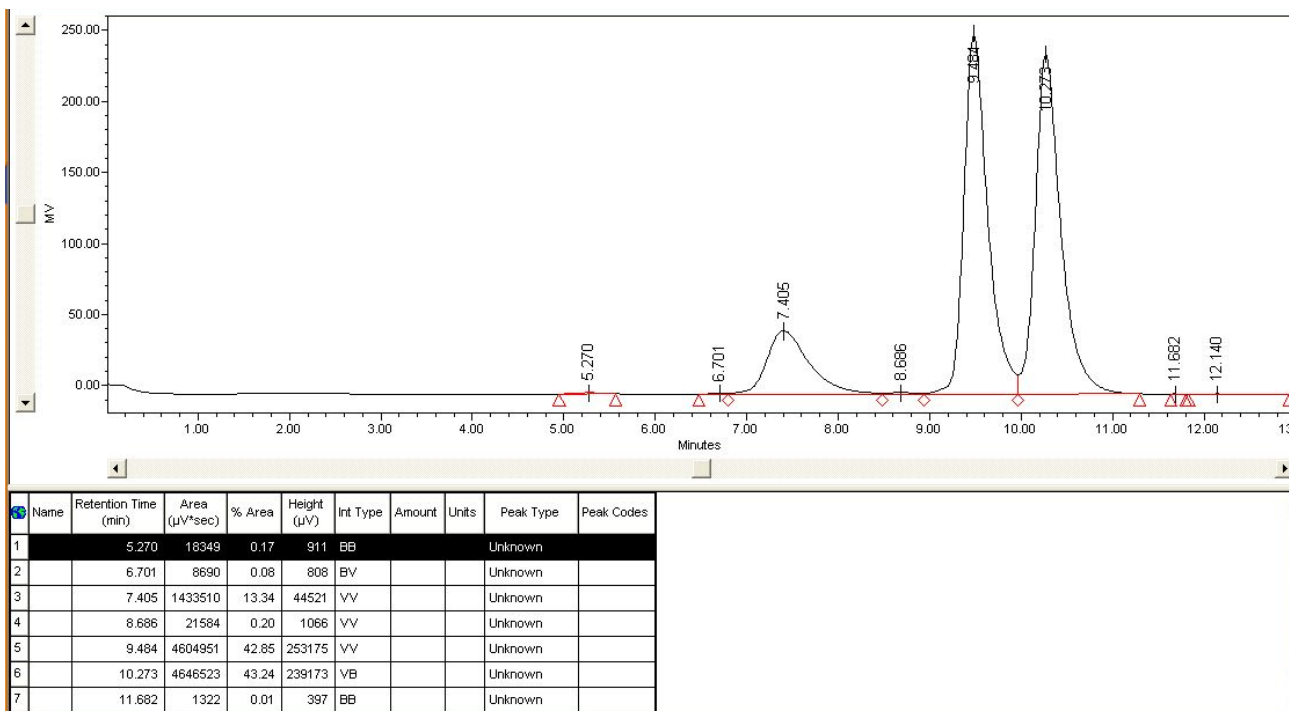


Figura 4. Cromatograma para muestra 4.

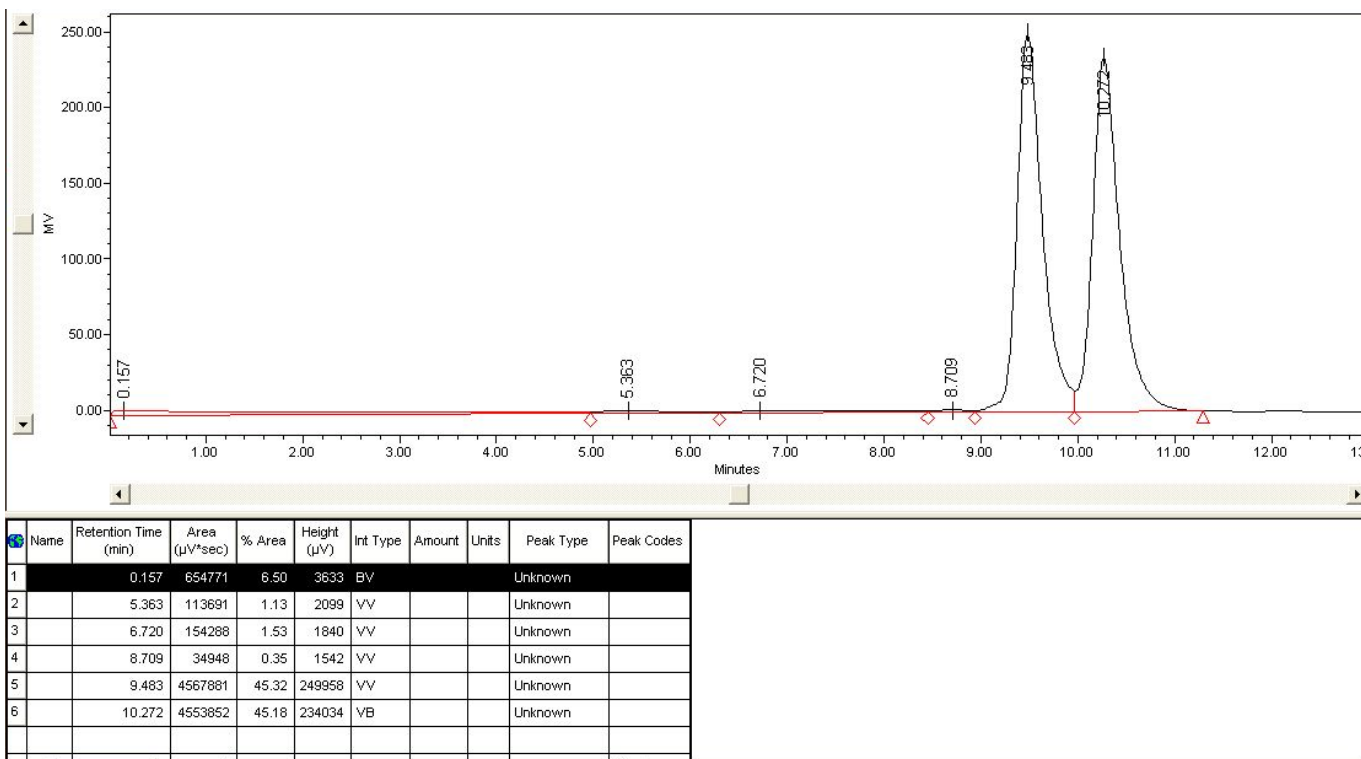


Figura 5. Cromatograma para muestra 5.

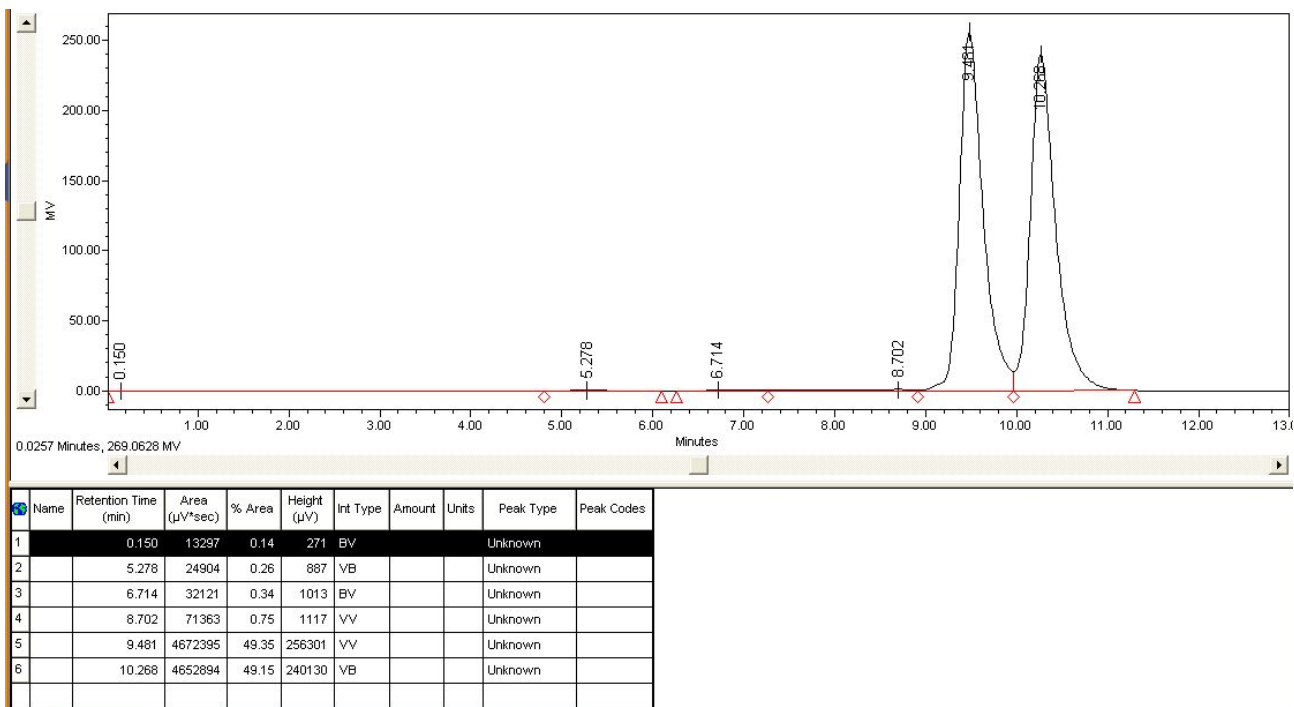


Figura 6. Cromatograma para muestra 6.

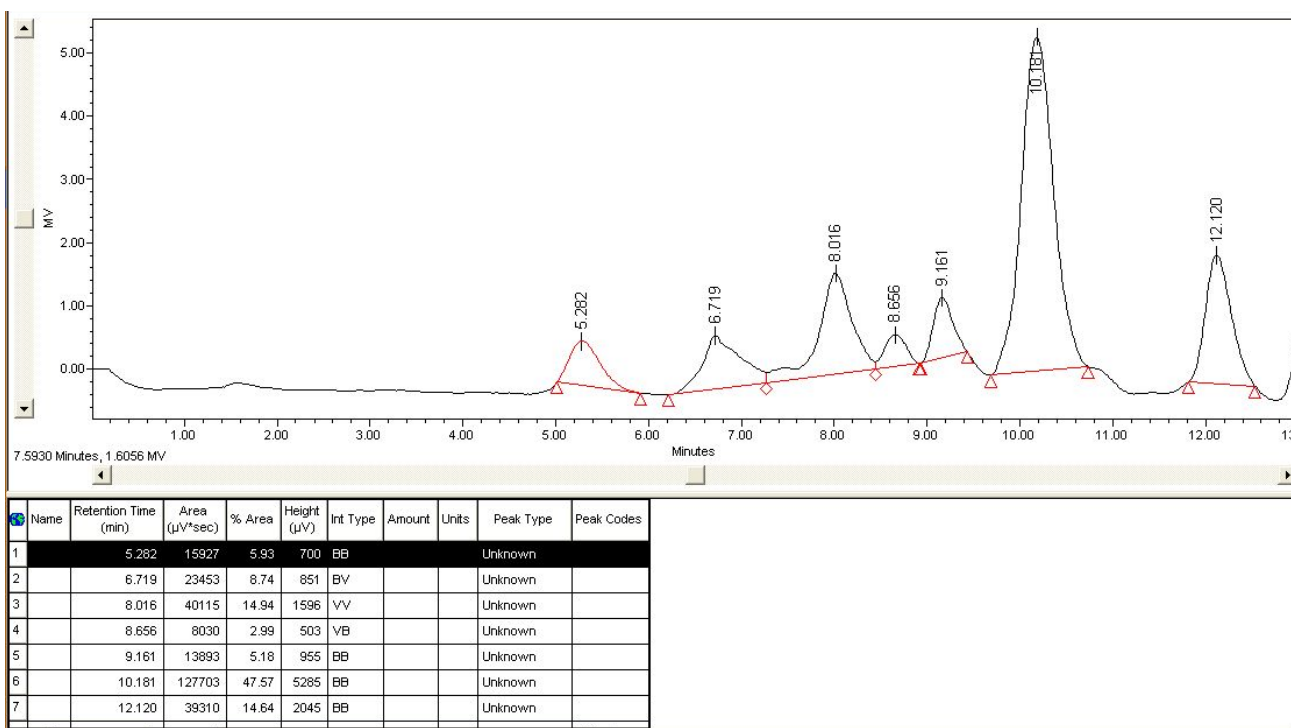


Figura 7. Cromatograma para muestra 7.

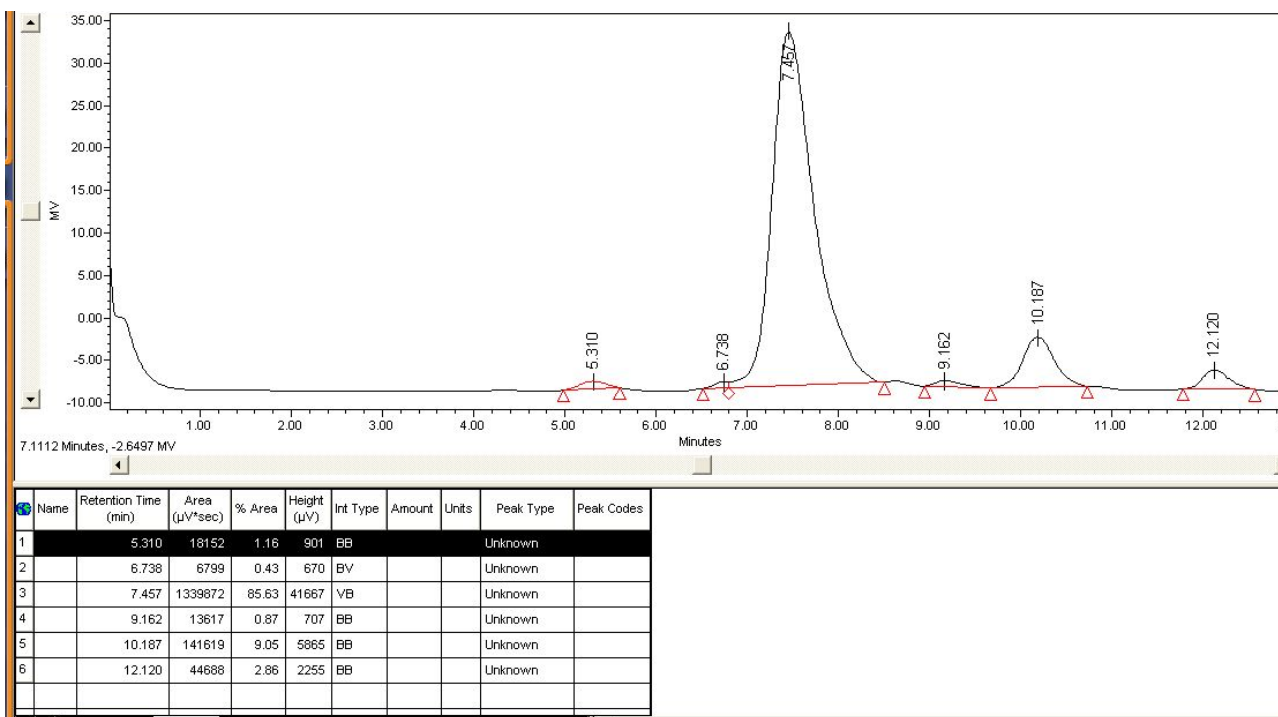


Figura 8. Cromatograma para muestra 8.

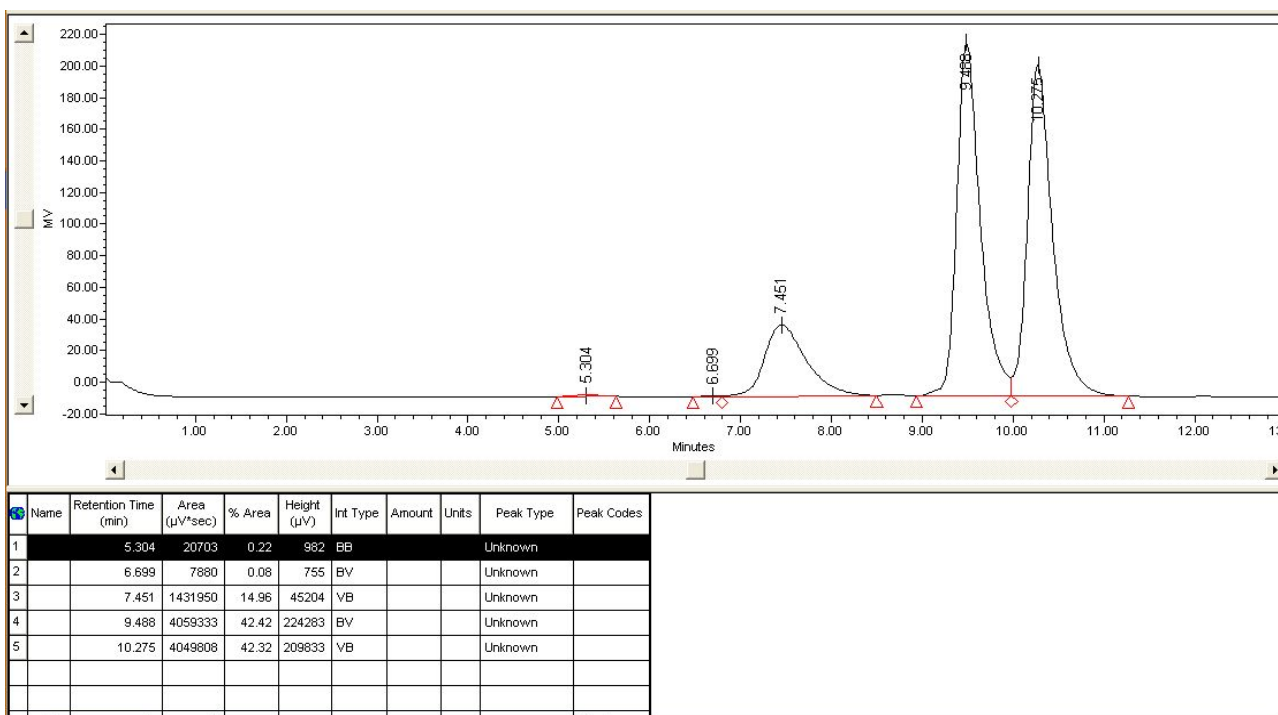


Figura 9. Cromatograma para muestra 9.

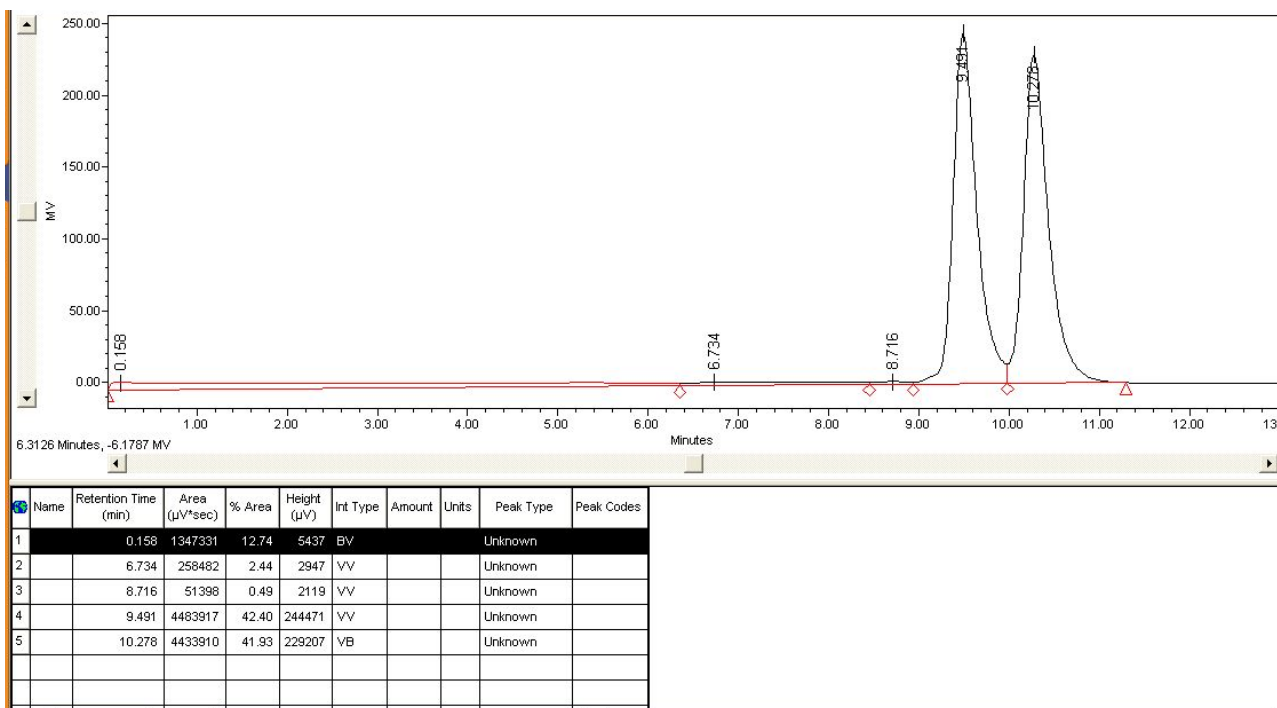


Figura 10. Cromatograma para muestra 10.

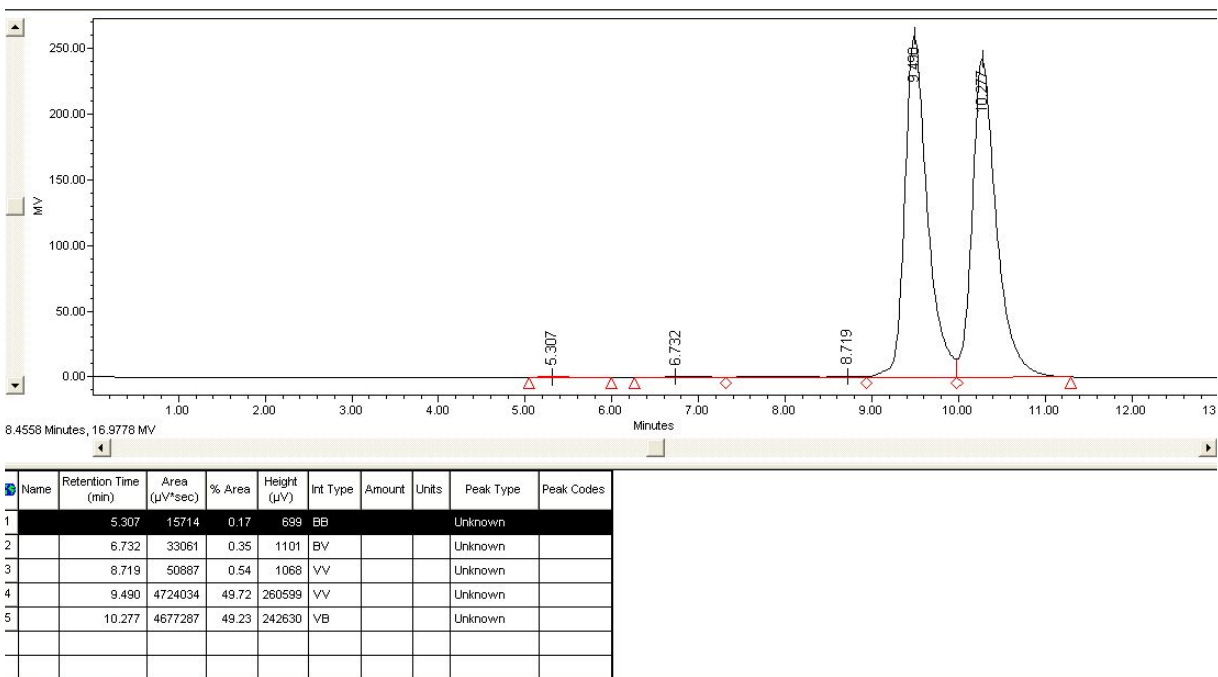


Figura 11. Cromatograma para muestra 11.

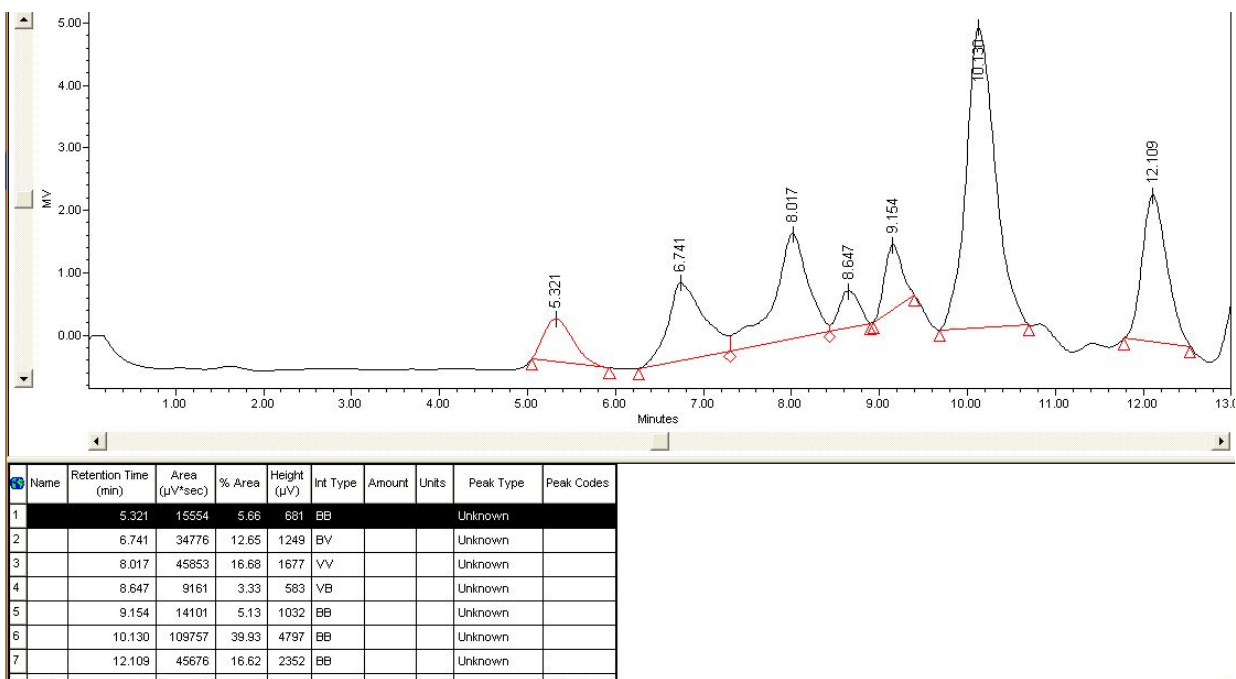


Figura 12. Cromatograma para muestra 12.

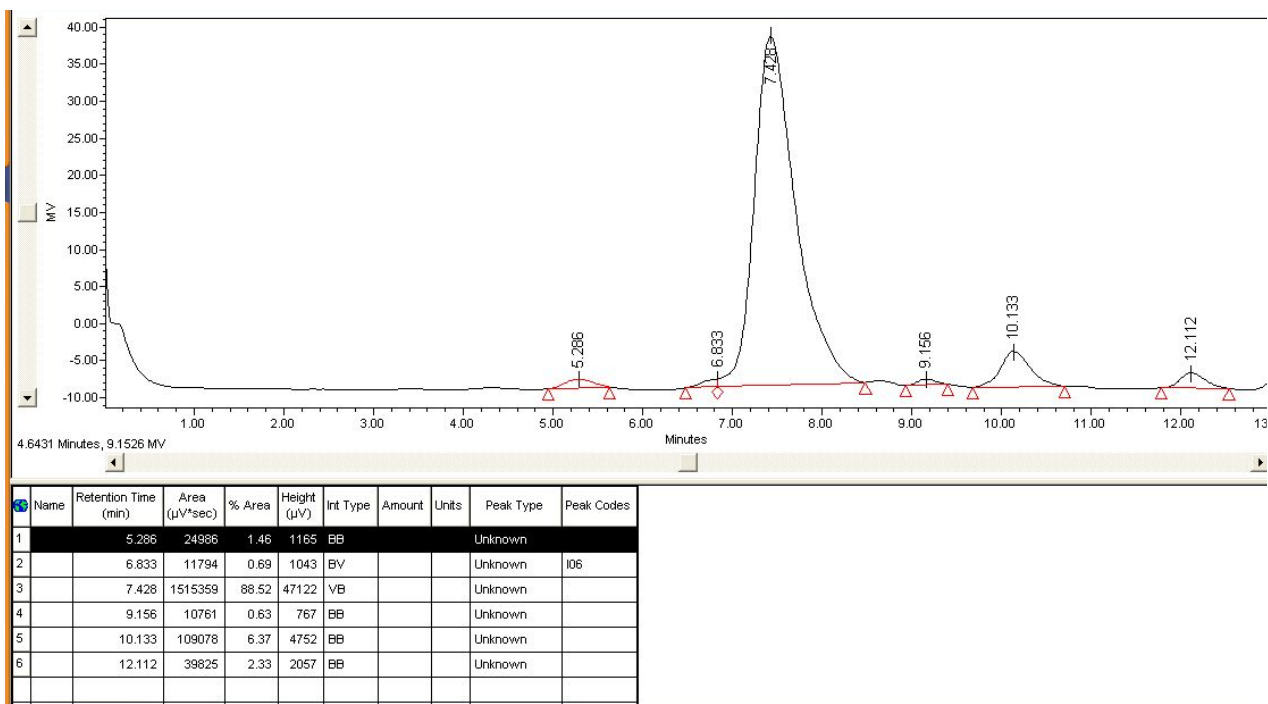


Figura 13. Cromatograma para muestra 13.

Cromatogramas obtenidos por cromatografía de gases

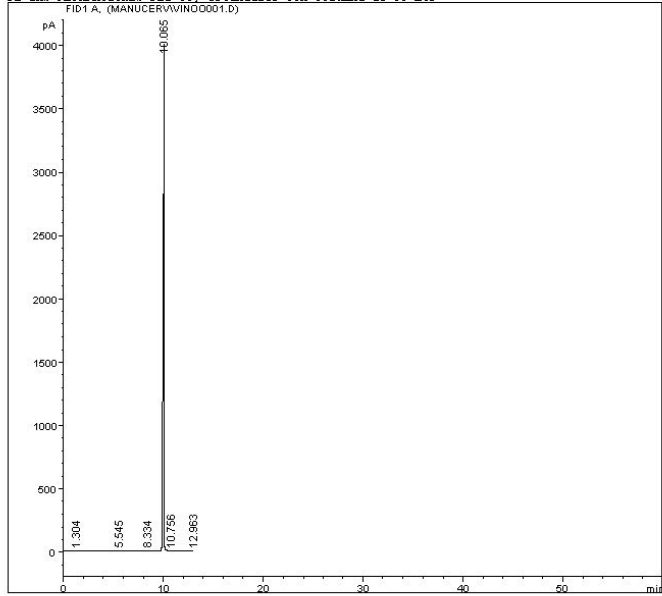
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\MANUCERV\vinoo001.D

Sample Name: 2

```

=====
Injection Date : 24/04/2019 01:29:22 p.m.      Seg. Line : 1
Sample Name    : 2                            Location  : Vial 102
Acq. Operator  : Manuel                       Inj       : 1
                                           Inj Volume: 1 µl

Semence File   : C:\HPCHEM\1\SEQUENCE\DEF GC.S
Method         : C:\HPCHEM\1\METHODS\2018CO-1.M
Last changed   : 14/12/2018 02:12:39 p.m. by Manuel
IDENTIFICACION Y DETERMINACION DE CONGEMERICOS EN BEBIDAS ALCOHOLICAS, ACTUALIZADO DESPUES
DE LAS REPARACIONES DEL GC, estandares con columna de 60 mts
FID1 A, (MANUCERV\VINOO001.D)
    
```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 14/03/2018 02:57:47 p.m.
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
    
```

6890N 24/04/2019 01:42:26 p.m. Manuel

Page 1 of 2

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\MANUCERV\vinoo001.D

Sample Name: 2

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Area %	Name
1	1.304	BP	0.4760	35.10283	0.10960	?
2	5.545	EV	0.0417	3.09290	0.00956	?
3	5.708	VB	0.0799	3.84378	0.01200	Acetaldehido
4	7.118	BB	0.1119	1.45016	0.00453	?
5	8.334	BV	0.0431	10.59565	0.03308	?
6	8.470	VP	0.0439	3.49745e-1	0.00109	Acetato de etilo
7	8.835	PV	0.0797	12.55828	0.03921	?
8	9.018	VB	0.0839	1.36109	0.00425	Metanol
9	10.065	FV	0.1061	3.19420e4	99.72943	Etanol
10	10.756	VB	0.1061	5.38040	0.01680	Diacetilo
11	12.963	BBA	0.0531	12.92382	0.04035	2-Butanol
12	13.180		0.0000	0.00000	0.00000	1-Propanol
13	14.601		0.0000	0.00000	0.00000	Isobutanol
14	14.787		0.0000	0.00000	0.00000	Isobutanoll
15	18.342		0.0000	0.00000	0.00000	Alcohol isoamilico
16	18.393		0.0000	0.00000	0.00000	Alcohol amilico
17	22.267		0.0000	0.00000	0.00000	Lactato de etilo
18	22.542	I	0.0000	0.00000	0.00000	1-Hexanol
19	25.450		0.0000	0.00000	0.00000	Furfural
20	33.063		0.0000	0.00000	0.00000	2-fenil etanol

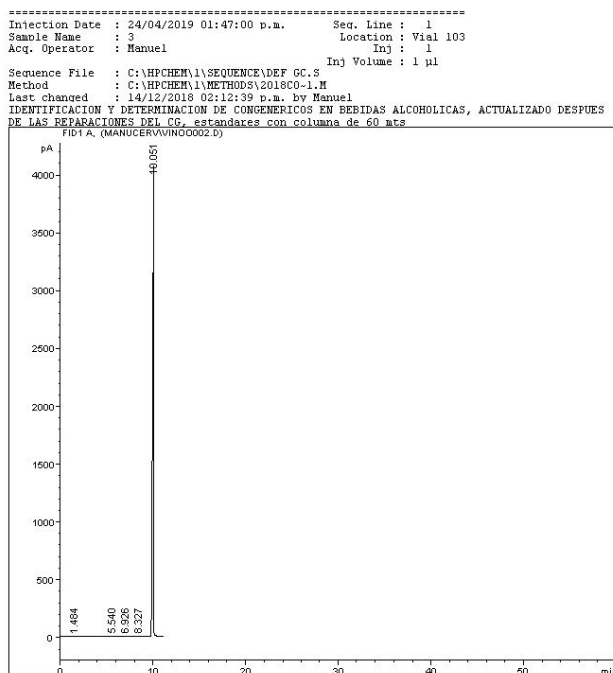
Totals : 3.20287e4

Results obtained with enhanced integrator!
2 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
Warning : ISTD compound(s) not found

*** End of Report ***

Figura 1. Cromatograma obtenido para muestra 2



Area Percent Report

Sorted By : Signal
 Calib. Data Modified : 14/03/2018 02:57:47 p.m.
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [dA*s]	Area %	Name
1	1.484	BE	0.2407	25.36625	0.07579	?
2	5.540	BV	0.0496	3.49292	0.01044	?
3	5.696	VE	0.0663	3.22653	0.00964	Acetaldehido
4	6.926	BV	0.0542	3.01204	0.00900	?
5	7.110	VE	0.0690	1.17791	0.00352	?
6	8.327	BV	0.0462	9.04589	0.02703	?
7	8.466	VE	0.0448	3.06501e-1	0.00092	Acetato de etilo
8	8.814	PV	0.0925	12.19293	0.03643	?
9	9.007	VE	0.1026	2.51819	0.00752	Metanol
10	10.051	PE	0.1058	3.34085e4	99.81972	Etanol
11	11.006		0.0000	0.00000	0.00000	Diacetilo
12	12.766		0.0000	0.00000	0.00000	2-Butanol
13	13.180		0.0000	0.00000	0.00000	1-Propanol
14	14.601		0.0000	0.00000	0.00000	Isobutanol
15	14.787		0.0000	0.00000	0.00000	Isobutanol
16	18.342		0.0000	0.00000	0.00000	Alcohol isoamilico
17	18.393		0.0000	0.00000	0.00000	Alcohol amilico
18	22.267		0.0000	0.00000	0.00000	Lactato de etilo
19	22.542	I	0.0000	0.00000	0.00000	1-Hexanol
20	25.450		0.0000	0.00000	0.00000	Furfural
21	33.063		0.0000	0.00000	0.00000	2-fenil etanol

Totals : 3.34689e4

Results obtained with enhanced integrator!

2 Warnings or Errors :

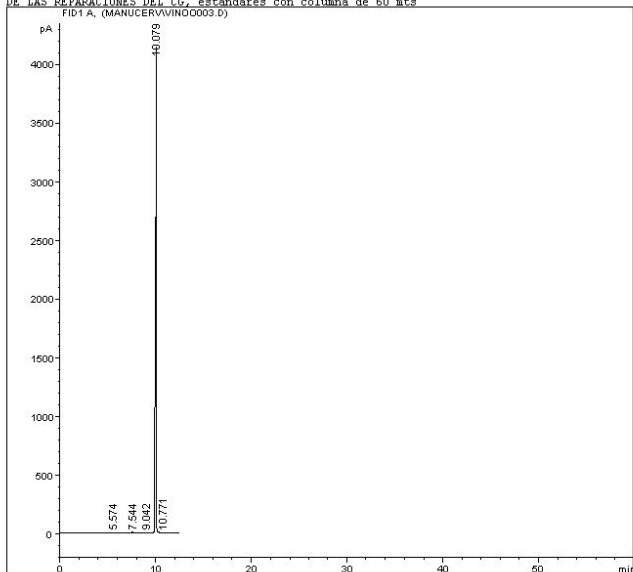
Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)

Warning : ISTD compound(s) not found

*** End of Report ***

Figura 2. Cromatograma obtenido para muestra 3.

=====
 Injection Date : 24/04/2019 02:02:35 p.m. Ser. Line : 1
 Sample Name : 7 Location : Vial 104
 Acq. Operator : Manuel Inj : 1
 Inj Volume : 1 µl
 Sequence File : C:\HPCHEM\1\SEQUENCE\DEF GC.S
 Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\2018C0-1.M
 Last changed : 14/12/2018 02:12:39 p.m. by Manuel
 IDENTIFICACION Y DETERMINACION DE CONGENERICOS EN BEBIDAS ALCOHOLICAS, ACTUALIZADO DESPUES
 DE LAS REPARACIONES DEL CG, estandares con columna de 60 mts
 FID1 A, (MANUCERV\VINOO003.D)



=====
 Area Percent Report
 =====

Sorted By : Signal
 Calib. Data Modified : 14/03/2018 02:57:47 p.m.
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [nA*s]	Area %	Name
1	5.574	PV	0.0496	2.85490	0.00840	?
2	5.728	VB	0.0626	2.06283	0.00607	Acetaldehido
3	6.973	EV	0.0626	4.96252	0.01459	?
4	7.140	VV	0.1710	17.34743	0.05102	?
5	7.544	VB	0.2194	127.04257	0.37362	?
6	8.211	PP	0.0664	4.13864e-1	0.00122	?
7	8.360	VB	0.0459	5.91695	0.01740	?
8	8.737	PV	0.0436	4.00624e-1	0.00118	Acetato de etilo
9	8.844	VV	0.0913	13.63646	0.04010	?
10	9.042	VV	0.1087	3.22670	0.00949	Metanol
11	9.236	VB	0.0622	6.10331e-1	0.00179	?
12	10.079	EV	0.1044	3.38175e4	99.45490	Etanol
13	10.771	VB	0.1053	6.43553	0.01893	Diacetilo
14	11.767	VB	0.0583	4.39346e-1	0.00129	?
15	12.766		0.0000	0.00000	0.00000	2-Butanol
16	13.180		0.0000	0.00000	0.00000	1-Propanol
17	14.601		0.0000	0.00000	0.00000	Isobutanol
18	14.787		0.0000	0.00000	0.00000	Isobutanoll
19	18.342		0.0000	0.00000	0.00000	Alcohol isoamilico
20	18.393		0.0000	0.00000	0.00000	Alcohol amilico
21	22.267		0.0000	0.00000	0.00000	Lactato de etilo
22	22.542	I	0.0000	0.00000	0.00000	1-Hexanol
23	25.450		0.0000	0.00000	0.00000	Furfural
24	33.063		0.0000	0.00000	0.00000	2-fenil etanol

Totals : 3.40029e4

Results obtained with enhanced integrator!

2 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
 Warning : ISTD compound(s) not found

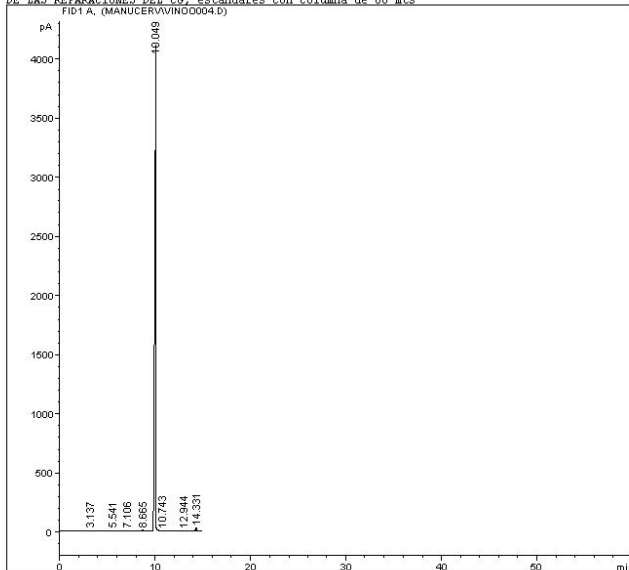
=====
 *** End of Report ***

Figura 3. Cromatograma obtenido para muestra 7.

```

=====
Injection Date : 24/04/2019 02:19:56 p.m.   Ser. Line : 1
Sample Name   : 8                           Location  : Vial 105
Acq. Operator : Manuel                       Inj       : 1
                                           Inj Volume: 1 µl
Sequence File : C:\HPCHEM\1\SEQUENCE\DEF GC.S
Method        : C:\HPCHEM\1\METHODS\201800-1.M
Last changed  : 14/12/2018 02:12:39 p.m. by Manuel
IDENTIFICACION Y DETERMINACION DE CONGENERICOS EN BEBIDAS ALCOHOLICAS, ACTUALIZADO DESPUES
DE LAS REPARACIONES DEL CG, estandares con columna de 60 mts
FID1 A. (MANUCERV\VINOO004.D)

```



```

=====
Area Percent Report
=====
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 14/03/2018 02:57:47 p.m.
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000

```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [µA*s]	Area %	Name
1	3.137	BB	0.2671	11.81342	0.03465	?
2	5.541	BV	0.0499	2.86848	0.00841	?
3	5.697	VB	0.0668	2.05363	0.00602	Acetaldehido
4	6.926	PV	0.0419	2.55304e-1	0.00075	?
5	6.998	VV	0.0506	3.65656e-1	0.00107	?
6	7.106	VB	0.0816	1.31511	0.00386	?
7	8.324	BV	0.0970	28.26732	0.08292	?
8	8.665	VV	0.1389	91.38451	0.26806	Acetato de etilo
9	8.793	VB	0.0913	28.61917	0.08395	?
10	9.048		0.0000	0.00000	0.00000	Metanol
11	10.048	BV	0.1070	3.37123e4	98.88850	Etanol
12	10.743	VB	0.1504	11.01800	0.03232	Diacetilo
13	12.944	PF	0.0679	14.39206	0.04222	2-Butanol
14	13.289	PB	0.0514	4.25317e-1	0.00125	1-Propanol
15	14.216	BV	0.0658	33.33949	0.09780	?
16	14.331	VB	0.0759	140.21838	0.41130	Isobutanol
17	14.777	BB	0.0735	12.58785	0.03692	Isobutanoll
18	18.342		0.0000	0.00000	0.00000	Alcohol isoamilico
19	18.393		0.0000	0.00000	0.00000	Alcohol amilico
20	22.267		0.0000	0.00000	0.00000	Lactato de etilo
21	22.542	I	0.0000	0.00000	0.00000	1-Hexanol
22	25.450		0.0000	0.00000	0.00000	Furfural
23	33.063		0.0000	0.00000	0.00000	2-fenil etanol

Totals : 3.40912e4

Results obtained with enhanced integrator!

2 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)

Warning : ISTD compound(s) not found

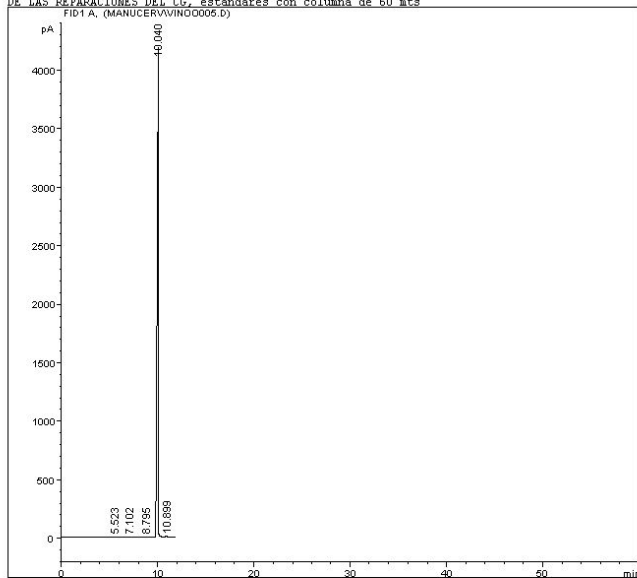
*** End of Report ***

Figura 4. Cromatograma obtenido para muestra 8.

```

=====
Injection Date : 24/04/2019 02:40:45 p.m.      Seq. Line : 1
Sample Name    : 12                            Location  : Vial 106
Acq. Operator  : Manuel                       Inj      : 1
                                           Inj Volume: 1 µl
Sequence File  : C:\HPCHEM\1\SEQUENCE\DEF GC.S
Method         : C:\HPCHEM\1\METHODS\2018CO-1.M
Last changed   : 14/12/2018 02:12:39 p.m. by Manuel
IDENTIFICACION Y DETERMINACION DE CONGENERICOS EN BEBIDAS ALCOHOLICAS, ACTUALIZADO DESPUES
DE LAS REPARACIONES DEL CG, estandares con columna de 60 mts
FID1 A, (MANUCERV\VINOO005.D)

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 14/03/2018 02:57:47 p.m.
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000

```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [nA*s]	Area %	Name
1	5.523	BV	0.0537	3.38551	0.00969	?
2	5.689	VB	0.0745	2.55581	0.00731	Acetaldehido
3	7.102	BV	0.1430	2.97502	0.00851	?
4	7.308	VP	0.0530	5.29205e-1	0.00151	?
5	8.309	FB	0.0514	6.21393	0.01778	?
6	8.578		0.0000	0.00000	0.00000	Acetato de etilo
7	8.795	BV	0.0972	14.15163	0.04050	?
8	9.003	VV	0.1271	4.23529	0.01212	Metanol
9	9.216	VP	0.0685	1.02838	0.00294	?
10	10.040	BV	0.1057	3.47196e4	99.36191	Etanol
11	10.713	VV	0.1036	43.93953	0.12575	?
12	10.899	VB	0.1212	143.95108	0.41196	Diacetilo
13	12.766		0.0000	0.00000	0.00000	2-Butanol
14	13.180		0.0000	0.00000	0.00000	1-Propanol
15	14.601		0.0000	0.00000	0.00000	Isobutanol
16	14.787		0.0000	0.00000	0.00000	Isobutanoll
17	18.342		0.0000	0.00000	0.00000	Alcohol isoamilico
18	18.393		0.0000	0.00000	0.00000	Alcohol amilico
19	22.267		0.0000	0.00000	0.00000	Lactato de etilo
20	22.542	I	0.0000	0.00000	0.00000	1-Hexanol
21	25.450		0.0000	0.00000	0.00000	Furfural
22	33.063		0.0000	0.00000	0.00000	2-fenil etanol

Totals : 3.49426e4

Results obtained with enhanced integrator!

2 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)

Warning : ISTD compound(s) not found

*** End of Report ***

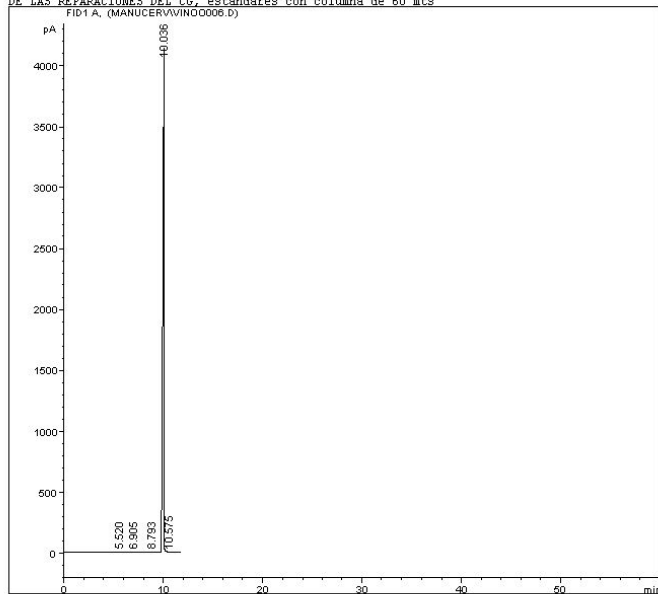
Figura 5. Cromatograma obtenido para muestra 12.

```

=====
Injection Date : 24/04/2019 03:06:44 p.m.      Seg. Line : 1
Sample Name    : 13                            Location  : Vial 107
Acq. Operator  : Manuel                        Inj      : 1
                                                Inj Volume: 1 µl

Sequence File  : C:\HPCHEM\1\SEQUENCE\DEF GC.S
Method         : C:\HPCHEM\1\METHODS\2018CO-1.M
Last changed   : 14/12/2018 02:12:39 p.m. by Manuel
IDENTIFICACION Y DETERMINACION DE CONGENERICOS EN BEBIDAS ALCOHOLICAS, ACTUALIZADO DESPUES
DE LAS REPARACIONES DEL GC, estandares con columna de 60 mts
=====

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 14/03/2018 02:57:47 p.m.
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000

```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [µA*s]	Area %	Name
1	5.520	BV	0.0545	3.33304	0.00973	?
2	5.691	VB	0.0677	1.91416	0.00559	Acetaldehido
3	6.905	BV	0.1271	4.37401	0.01276	?
4	7.100	VB	0.0786	1.35060	0.00394	?
5	8.306	PB	0.0502	6.78425	0.01980	?
6	8.793	PV	0.0932	14.40521	0.04204	Acetato de etilo
7	9.001	VV	0.1175	3.81242	0.01112	Metanol
8	9.203	WB	0.0538	5.55679e-1	0.00162	?
9	9.634	PV	0.1405	1.52195	0.00444	?
10	10.036	VV	0.1067	3.42034e4	99.80797	Etanol
11	10.575	VV	0.0839	13.26004	0.03869	?
12	10.730	WB	0.1631	14.49551	0.04230	?
13	11.006		0.0000	0.00000	0.00000	Diacetilo
14	12.766		0.0000	0.00000	0.00000	2-Butanol
15	13.180		0.0000	0.00000	0.00000	1-Propanol
16	14.601		0.0000	0.00000	0.00000	Isobutanol
17	14.787		0.0000	0.00000	0.00000	Isobutanol
18	18.342		0.0000	0.00000	0.00000	Alcohol isoamilico
19	18.393		0.0000	0.00000	0.00000	Alcohol amilico
20	22.267		0.0000	0.00000	0.00000	Lactato de etilo
21	22.542	I	0.0000	0.00000	0.00000	1-Hexanol
22	25.450		0.0000	0.00000	0.00000	Furfural
23	33.063		0.0000	0.00000	0.00000	2-fenil etanol

Totals : 3.42692e4

```

Results obtained with enhanced integrator!
2 Warnings or Errors :

```

```

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
Warning : ISTD compound(s) not found

```

```

=====
*** End of Report ***

```

Figura 6. Cromatograma obtenido para muestra 13.