

## ORIGINAL

# Identificación de levaduras y bacterias aisladas en la elaboración de vinos tintos de la bodega Abadía Retuerta en la región del Duero español

## Evolución durante la vendimia y los procesos de vinificación

A. Anocíbar Beloqui<sup>1\*</sup>, O. López Portela<sup>1</sup>, I. González<sup>2</sup>, G. Naharro<sup>2</sup>, G. J. M. Luengo<sup>3</sup>

<sup>1</sup> *Abadía Retuerta Bodega. Sardón de Duero, Valladolid, España.*

<sup>2</sup> *Unidad de Microbiología e Inmunología Facultad de Veterinaria, Universidad de León, España.*

<sup>3</sup> *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de León, España.*

\* *Autor de Contacto: A. Anocíbar Beloqui - Email: angel.anocibar@abadia-retuerta.es*

Recibido 07 de enero de 2021 / Aceptado 13 de enero de 2021 / Publicado 1 de septiembre de 2021

### RESUMEN

La variedad de uva utilizada en nuestra investigación fue el tempranillo, muy implantado en España y la principal variedad de las Denominaciones de Origen más prestigiosas, entre las que destacan Rioja y Ribera del Duero y lo es también en Bodega Abadía Retuerta, ubicada en Sardón de Duero.

Se analizaron los microorganismos existentes en las cubas de uva recolectadas, el primer y último día de vendimia, durante todos los procesos de vinificación, en tres añadas, 2004, 2005 y 2006. Hubo una gran variabilidad de levaduras el primer día de vendimia, cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y no-*Saccharomyces*. No se encontraron levaduras distintas de *Saccharomyces cerevisiae*, en la última cuba de la vendimia, debido a una selección natural espontánea en la bodega, a medida que avanzaban las fermentaciones. Las poblaciones de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* encontradas el último día de vendimias fueron muy elevadas, por lo que parece difícil implantar otro tipo de microorganismos para iniciar la fermentación.

La fermentación alcohólica tardó unos días en iniciarse en la primera cuba. En la última, con una población elevada de *Saccharomyces cerevisiae*, se inició casi de inmediato. La duración de la fermentación fue más larga para las primeras cubas llenadas y la acidez volátil fue algo mayor.

Hubo poblaciones de bacterias acéticas en el encubado, pero no durante la fermentación alcohólica (FA) y fermentaciones maloláctica (FML), debido a la falta de oxígeno. Se encontraron varias cepas de bacterias lácticas

en diferentes etapas de la vinificación, pero nunca *Oenococcus oeni*; sin embargo, es esta bacteria la que logra la FML.

### PALABRAS CLAVES

Vino tinto, tempranillo, levaduras, bacterias, evolución vendimia, vinificación.

### ABSTRACT

The grape variety used in our research was tempranillo, widely established in Spain and the main variety of the most prestigious Denominations of Origin in Spain, among which Rioja and Ribera del Duero stand out. Tempranillo is also the grape variety used in Abadía Retuerta Winery, located in Sardón de Duero.

The microorganisms existing in the collected grape vats were analysed, on the first and last day of harvest, during all the vinification processes, in three vintages, 2004, 2005 and 2006. There was a great variability of yeasts on the first day of harvest, strains *Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces*. No yeasts other than *Saccharomyces cerevisiae* were found in the last vat of the vintage, due to a spontaneous natural selection in the winery, as the fermentations progressed. The *Saccharomyces cerevisiae* yeast populations found were very high, so it seems difficult to implant other types of microorganisms to initiate fermentation.

Alcoholic fermentation took a few days to start in the first vat. In the last, with a high population of *Saccharomyces cerevisiae*, it started almost immediately. The duration of fermentation was longer for the first filled vats and the

volatile acidity was somewhat higher. There were populations of acetic bacteria in analysis of the tank filling, but not during alcoholic fermentations and malolactic fermentations, due to the lack of oxygen. Several strains of lactic acid bacteria were found at different stages of winemaking, but never *Oenococcus oeni*; however, it is this bacterium that achieves MLF.

## KEYWORDS

Red wine, tempranillo, yeasts, bacteria, harvest evolution, winemaking.

## INTRODUCCIÓN

El vino tinto es una bebida elaborada a partir de mosto de uva que se somete a fermentaciones alcohólica y maloláctica. La fermentación alcohólica (FA) es realizada por levaduras. Tradicionalmente las fermentaciones de los mostos se realizaban de forma espontánea hasta que en los años 80 se empezaron a comercializar starter de levaduras denominadas LSA (levaduras secas activas), todas ellas del género *Saccharomyces cerevisiae* (SC) que se inoculaban en los mostos. Los compuestos aromáticos positivos de estas levaduras son bien conocidos (Bertrand, 1981) y también los considerados negativos (Chattonnet et al. 1993), (Anocibar Beloquiet et al. 1996). Estas cualidades de las diferentes de cepas, hace que actualmente existan numerosas marcas de LSA, en función de lo que se desee obtener.

En los últimos años se han aislado y estudiado levaduras no-*Saccharomyces*, lo que antiguamente se denominaban levaduras de primera fase, de un poder alcohólico sensiblemente inferior a SC, Vigentini et al., 2017, Padilla et al., 2017. Estos estudios realizados sobre uvas recogidas en la viña de forma estéril y fermentadas en laboratorio o en pequeños volúmenes, mostraron que las principales especies de levaduras encontradas fueron *Hanseniaspora*, *Candida* y *Metschnikowia*.

La fermentación maloláctica (FML) es una fermentación que ocurre habitualmente después de la FA y es conducida por bacterias del ácido láctico (BAL), comúnmente *Oenococcus oeni*, aunque otras BAL como *Lactobacillus plantarum* tienen el potencial de transformar el ácido málico en ácido láctico (Bravo-Ferrada et al., 2013; Sumbly et al., 2014).

Tanto las levaduras como las BAL, juegan un papel fundamental en la calidad del vino y las preferencias de los consumidores. El aroma puede provenir de la variedad de uva (aromas varietales), fermentaciones alcohólica y maloláctica (aromas fermentativos) y del proceso de crianza (aromas de crianza) (Belda et al., 2017; Polaskova et al., 2008).

Hoy en día, enólogos y viticultores saben que las poblaciones microbianas asociadas a la fermentación del vino se encuentran en los suelos de los viñedos y en los hollejos de la vid y de la uva y juegan un papel clave en la calidad del vino, convirtiéndose así en un tema de investigación a nivel mundial (Taylor et al., 2014; Morrison Whittle et al., 2015; Liu et al., 2015). Este ecosistema microbiano, (*Saccharomyces*, no-*Saccharomyces* y BAL) que se encuentran en la vid y las uvas, por lo tanto, están influenciadas por las variedades de uva, la ubicación geográfica, el clima y las prácticas agrícolas, estableciendo colectivamente el concepto de terruño. (Bokulich et al., 2014; Gilbert et al., 2014; Bokulich et al., 2016)

Muchos productores utilizan LSA de *Saccharomyces cerevisiae* como iniciadores de la FA. Sin embargo, hay estudios que muestran que la FA se desarrolla de forma espontánea, gracias a una sucesión de especies de levaduras presentes de forma natural, que luego se seleccionan según factores orgánicos y parámetros tecnológicos (Capozzi et al., 2015).

Hoy en día, muchos productores muestran un gran interés en preservar las cepas de levadura autóctonas (*Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*), realizando las FA de forma espontánea, sin adición de ninguna levadura comercial para obtener una tipicidad propia en los vinos elaborados a partir de diversas variedades de uva dentro de un determinado el terruño Gilbert et al., 2014; Bokulich, et al., 2016).

Empiezan a comercializarse levaduras no-*Saccharomyces* utilizar para realizar vinificaciones de forma secuencial, junto con *Saccharomyces cerevisiae* para mejorar la complejidad del vino (Belda, I. et al., 2016; Renault, P.A.G. et al., 2015; González-Arenzana et al., 2017).

La mayoría de estos estudios se realizan a partir de fermentaciones en laboratorio, o en pequeños volúmenes en bodegas. El objetivo de nuestro estudio fue monitorear la evolución de real de diferentes microorganismos, levaduras y bacterias durante el proceso de vinificación en una bodega a lo largo de la vendimia. Para ello se tomaron muestras de la primera cuba llenada el primer día y de la última llenada tras varios días de vendimia. Los muestreos se realizaron en el encubado, fin FA y fin FML. Las fermentaciones se desarrollaron de forma espontánea.

Este experimento se realizó durante tres añadas consecutivas (2004, 2005 y 2006).

En esta investigación, se aislaron e identificaron los microorganismos encontrados, levaduras *Saccharomyces*, no-*Saccharomyces* y así como bacterias del ácido láctico (BAL) y bacterias del ácido acético (BAA).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Vinificación

Las uvas de la variedad tempranillo proceden de la bodega Abadía Retuerta en Sardón de Duero (que aúna tradición y modernidad y está reconocida como una de las bodegas de calidad de España), está ubicada en el corazón del valle del Duero, en la llamada Milla de Oro (41° 37' 0,84" N, 4° 24' 38,59" W) a 780 m de altitud. Se recogieron muestras de mosto de encubado y vino en tres añadas consecutivas: 2004, 2005 y 2006 el primer y el último día de la vendimia.

Las uvas recolectadas que llegaban en cajas, se clasificaban en la mesa de selección antes de despallillarlas y estrujarlas. Después de la adición de 5 g de SO<sub>2</sub> por 100 kg de uva, con una solución de bisulfito de potasio al 15%, se llenó una cuba de 17.000 litros de capacidad con 14.000 kg de uva. El mismo protocolo se aplicó el primer y último día de cosecha de las tres añadas.

En cada uno de estos tres años se corrigió la acidez de los mostos añadiendo 1,2 g de ácido tartárico por kg de uva. En este caso no se realizó ninguna adición de microorganismos exógenos. La fermentación alcohólica se inició de forma espontánea. Los remontados se realizaron dos veces al día durante los primeros 3 días, luego una vez al día hasta el final de la fermentación alcohólica. La fermentación/maceración se prolongó durante 12 días a una temperatura de 26°C aproximadamente.

El vino de gota resultante se sangró a una cuba de 5.600 litros. La fermentación maloláctica fue totalmente espontánea y tuvo lugar a 22 °C. Una vez finalizadas las fermentaciones, el vino se trasiega y se le adicionan 30 mg/L de anhídrido sulfuroso.

### Análisis químicos clásicos

Se midieron los parámetros habituales en mosto y vino. La cantidad de azúcares se determinó por densidad con corrección de temperatura. El grado alcohólico se midió por destilación. La acidez volátil (expresada en g/L de ácido acético) se analizaron con métodos estándar (García BJ, 1976).

### Toma de muestras

El procedimiento de muestreo fue el siguiente:

- 1) Mosto de un depósito lleno de 17.000 litros, después de la adición de anhídrido sulfuroso y ácido tartárico y antes del inicio de la fermentación alcohólica (FA).
- 2) Vino del tanque mencionado al tras la FA y antes de

la fermentación maloláctica (FML).

3) Vino después de la FML.

Las muestras se llevaron al laboratorio y se procesaron inmediatamente. Se tomaron muestras similares el primer y el último día de cosecha en tres añadas consecutivas (2004, 2005 y 2006).

### Aislamiento microbiano

Se aislaron levaduras de 100 µL de cada muestra y se inocularon en placas de agar YPD (extracto de levadura, 10 g/L; peptona, 20 g/L; dextrosa, 20 g/L; Agar, 15 g/L) suplementadas con 50 µg/mL de cloranfenicol e incubados a 28 °C durante 3 días (Gayevskiy V et al., 2012). Las bacterias del ácido láctico (BAL) se aislaron colocando 200 µL de cada muestra en agar MRS (Darmstadt, Alemania) suplementado con 100 µg/mL de pimaricina y se incubaron a 28 °C durante 5 días en condiciones aeróbicas o anaeróbicas (Nisiotou AA et al., 2015). Se aislaron bacterias de ácido acético (BAA) de muestras de 200 µL inoculadas en agar YPD suplementado con 100 µg/mL de pimaricina y 100 µg/mL de penicilina y se incubaron a 28 °C durante cinco días (Valera, M. et al., 2015; Du Toit et al., 2002). Todas las muestras se diluyeron si fue necesario.

### Conteo de microorganismos

Se contaron las colonias cultivadas en las placas específicas para el crecimiento de cada microorganismo. En el caso de las bacterias, se utilizó el tinte GRAM (Gram, C. 1884) para comprobar si eran bacterias lácticas o acéticas.

### Identificación microbiana

Se identificaron especies de *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* (White et al., 1990).

Las células de levadura se identificaron a nivel de género o especie mediante la amplificación de la región de ADNr 5.8S-ITS utilizando los cebadores ITS1 (5'-TCCG-TAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCGCTTATT-GATATGC-3').

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se purificaron utilizando un kit de purificación de PCR "Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System" (Promega, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuenciación del gen ITS se llevó a cabo con un kit de secuenciación de ciclos ABI PRISM Big Dye Terminator v3.1 en un analizador genético ABIPRISM modelo 3130 (Applied Biosystems, Foster, CA, EE UU). La comparación de secuencias se realizó uti-

A. Anocibar Beloqui, O. López Portela, I. González, G. Naharro, G. J. M. Luengo

	2004	2005	2006
Integral Térmica Winkler & Amerine	1.446	1.594	1.657
Lluvia (mm) 1-05 a 30-09	121	54	120
Inicio de vendimia	27-sep	13-sep	08-sep
Fin de vendimia	11-oct	05-oct	05-oct

Tabla 1. Datos climáticos y de vendimia de las diferentes añadas.

2004	Levaduras, log cfu/ml	BAA, log cfu/ml	BAL, log cfu/ml
Mosto de la primera cuba llenada	4	2	2
Mosto de la primera cuba llenada antes FML	4	nd	2
Mosto de la primera cuba llenada después FML	nd	nd	5
Mosto de la última cuba llenada	5	2	2
Mosto de la última cuba llenada antes FML	5	nd	nd
Mosto de la última cuba llenada después FML	nd	nd	7

Tabla 2. Conteo de microorganismos encontrados en la añada 2004.

lizando el programa de herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST), que es una marca registrada de la Biblioteca Nacional de Medicina de NCBI de Estados Unidos

BAL y BAA se identificaron mediante amplificación por PCR de la región espaciadora transcrita intergénica de rDNA16S-23S utilizando los cebadores hibridados con regiones conservadas de genes rDNA 16S y 23S. Los cebadores de ITS-PCR son: L1 (5'-CAAGGCATCCACCGT-3') y G1 (5'-3GAAGTCGTAACAAGG-3'). Los productos de PCR se analizaron y secuenciaron como se mencionó anteriormente.

### Resultados

De acuerdo a la integral térmica de Winkler & Amerine (Winkler, AJ et al. 1974) (tabla 1), la cosecha 2006 fue la más cálida, seguida de 2005 y 2004. Las fechas de vendimia ocurrieron antes en las cosechas más cálidas. La cosecha de 2005 fue la más seca, mientras que 2004 y 2006 registraron lluvias considerables.

Los resultados obtenidos de la cosecha 2004 se muestran en la tabla 2. El primer día de vendimia solo se detectaron en la cuba dos especies de levadura, *Saccharomyces cerevisiae* y *Metschnikowia pulcherrima*. Algunas cepas de *M. pulcherrima* son capaces de producir vinos de bajo contenido alcohólico cuando se coi-

noculan o se inoculan secuencialmente con *S. cerevisiae* (Contreras A et al. 2014). Además, *M. pulcherrima* se ha demostrado que mejora los atributos sensoriales positivos en varios vinos (Parapouli, M et al.2014; Benito, S. et al. 2015).

En cambio, los resultados que obtuvimos de las muestras del último día de cosecha solo mostraron *Saccharomyces cerevisiae*. La cantidad total de levaduras en el mosto fue de aproximadamente 4 Log ufc/ml. La población de la cuba llenada el último del último día de cosecha llegó a 5 Log ufc/ml.

Tras la FA y justo antes de FML, *Saccharomyces cerevisiae* fue detectada en unas concentraciones de 4 log ufc/ml. No se detectaron levaduras tras la FML del vino. La alta frecuencia de *Saccharomyces cerevisiae* al inicio de la FA y la baja diversidad encontrada en la cosecha 2004, puede deberse a la presencia de uvas dañadas, como se observó en varios viñedos del norte de Apulia (Italia). (Nisiotou AA et al. 2007; Barata A et al. 2012; Oro L. et al.2014), aunque en nuestro caso es posible que se encontrasen en las mesas de selección de la bodega.

En términos de población de bacterias, la mayoría de los estudios se han centrado en las bacterias cultivables que causan un impacto económico negativo en el rendimiento de la uva y comprometen la producción de vino.

Dichos estudios se centraron en patógenos causantes de enfermedades y bacterias de interés enológico. Estas últimas se agruparon en tres tipos (Barata A et al. 2012): Bacterias fácilmente controlables que no tienen un gran efecto en la calidad del vino si se siguen las buenas prácticas enológicas; bacterias fermentadoras que transforman el ácido málico en ácido láctico; y bacterias que afectan seriamente la calidad del vino.

Nuestros estudios se han centrado en las bacterias del ácido acético (BAA) y las bacterias del ácido láctico (BAL). En la primera cuba llenada, dentro del grupo de BAA, se identificaron siete especies dentro del género *Acetobacter*: *A. liquefaciens*, *A. tropicalis*, *A. malorum*, *A. pasteurianus*, *A. aceti*, *A. cerinus*, *A. cerevisiae*; tres especies pertenecían al género *Gluconobacter*: *G. oxydans*, *G. cerinus* y *G. diazotrophicus*. La población total de BAA fue de alrededor de 2 log ufc/ml. donde *A. Tropicalis* Predominó el primer día de cosecha. No se detectaron BAA ni antes de la FML ni después de la FML, debido a las condiciones de anaerobiosis de estos procesos. Las poblaciones encontradas el último día de cosecha fueron similares.

Las bacterias LAB son muy importantes en la elaboración del vino, ya que transforman el ácido málico en ácido láctico durante la FML. En la primera cuba llenada se aislaron cinco especies de LAB pertenecientes a tres géneros en diferentes: *Lactobacillus yamanashiensis* ss. *mali*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, y *Oenococcus oeni*. Predominaron *Lactobacillus yamanashiensis* ss. *mali* y *L. plantarum* y *Leuconostoc mesenteroides*. Las poblaciones rondaron una concentración de 2 log ufc/ml. Ningún *Lactobacillus* ni *Leuconostoc mesenteroides* se aislaron antes de la FML. *Oenococcus oeni* sólo se detectaron después de la FML. La FML Se obtuvieron resultados similares el último día de cosecha.

En la añada 2005 en la cuba llenada el primer día de cosecha aislaron once especies de levaduras, pertenecientes a ocho géneros. *Hanseniaspora uvarum*, *Torulospira delbrueckii*, *Pichia holstii*, *Cryptococcus bestiolae*, *C. bacillisporus*, *C. adeliensis*, *Rhodotorula lanthofagi*, *R. slooffiae*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Aureobasidium pullulans*, y *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo, todas estas especies predominantes en la primera cuba fueron sustituidas al final de la FA por *S. cerevisiae*. Algunas cepas de *T. delbrueckii* se han utilizado en la inoculación secuencial con *S. cerevisiae* para obtener vinos con acidez volátil reducida y bajo contenido en ácido acético (Puertas B. et al. 2017; Renault, P et al. 2015;). También algunas cepas de *T. delbrueckii*

son productores de etanol bajo y son capaces de sobrevivir a concentraciones altas de etanol (Bely, M. et al. 2018), también pueden producir vinos con un contenido de alcohol más bajo. *Hanseniaspora uvarum* también se ha utilizado en coinoculación secuencial con *S. cerevisiae* ya que es importante en el desarrollo de compuestos volátiles en el vino y puede ser de interés enológico (Ciani, M. et al. 2016; Tristezza M. et al. 2016; Mingorance-Cazorla L et al. 2003). No se detectaron levaduras cultivables después de FML. Las concentraciones encontradas durante los procesos se muestran en la [tabla 3](#).

*S. Cerevisiae* fue la única levadura detectada en el último día de fermentaciones, en contraste con el primer día de la vendimia cuando hubo una gran diversidad.

Los BAA aislados en la cosecha 2005 estuvieron presentes en cantidades bajas el primer día de cosecha a una tasa de 2 Log ufc/mL. Se aislaron cuatro especies principales: *Gluconobacter cerinus*, *Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter liquefaciens* y *Acetobacter pasteurianus*. Al igual que en 2004, no se encontraron después de la FA. Se encontraron cuatro especies de BAL en el primer día de cosecha 2005: *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis* una tasa de 3 Log ufc/mL manual. Cabe señalar que nuevamente, *O. oeni* se detectó, solo al final de FML.

Podemos concluir que hubo una alta diversidad de levaduras en la cosecha 2005. Sin embargo, solo *S. cerevisiae* se detectó en el último tanque, al igual que en 2004. La diversidad de BAA y BAL fue menor en comparación con 2004.

En la primera cuba llenada de 2006, se aislaron nueve especies de levaduras pertenecientes a seis géneros: *Pichia anomala*, *P. membranaefaciens*, *Torulospira delbrueckii*, *Hanseniaspora uvarum*, *H. osmophila*, *S. cerevisiae*, *Candida oleophila*, *Kluyveromyces thermotolerans*. Al final de la FA, *S. cerevisiae* fue la única especie de levadura detectada que se elevó hasta 6 Log ufc/ml. Cabe destacar que en la añada 2006 *S. cerevisiae* estuvo presente en el vino después de la FML, con recuentos de aproximadamente 4 log ufc/ml. Restos de azúcares reductores tras la FA, pueden haber permanecido al final del FML alimentando a estas levaduras. La añada 2006 fue la más cálida de las tres en estudio y el grado alcohólico fue superior en 2006 que en las otras dos añadas, 2004 y 2005. Nuevamente solo *S. cerevisiae* se detectó en la última cuba llenada.

En la cosecha de 2006 [Tabla 4](#), se aislaron BAA en mayor

2005	Levaduras, log cfu/ml	BAA, log cfu/ml	BAL, log cfu/ml
Mosto de la primera cuba llenada	4	2	2
Mosto de la primera cuba llenada antes FML	5	nd	nd
Mosto de la primera cuba llenada después FML	nd	nd	4
Mosto de la última cuba llenada	6	3	2
Mosto de la última cuba llenada antes FML	6	nd	nd
Mosto de la última cuba llenada después FML	nd	nd	5

Tabla 3. Conteo de microorganismos encontrados en la añada 2005.

2006	Levaduras, log cfu/ml	BAA, log cfu/ml	BAL, log cfu/ml
Mosto de la primera cuba llenada	4	2	nd
Mosto de la primera cuba llenada antes FML	6	nd	nd
Mosto de la primera cuba llenada después FML	4	nd	5
Mosto de la última cuba llenada	6	3	nd
Mosto de la última cuba llenada antes FML	5	nd	nd
Mosto de la última cuba llenada después FML	4	nd	6

Tabla 4. Conteo de microorganismos encontrados en la añada 2006.

número que en 2005. Nueve especies de pertenecientes a tres géneros fueron encontradas: *Acetobacter*: *A. acetii*, *A. xylinum*, *A. pasterianus*; *Gluconobacter*: *G. oxydans*, *G. frauterii*, *G. cerinus*, *G. albidus*; *Kozakia*, *K.*

*baliensis* y *Swaminathania*, *S. salitolerans*. No se detectaron BAA después de FA en ninguna muestra. Curiosamente, las BAL solo se aislaron en una muestra de mosto tomada el último día de cosecha y en pequeñas

## PUBLICIDAD 1/3

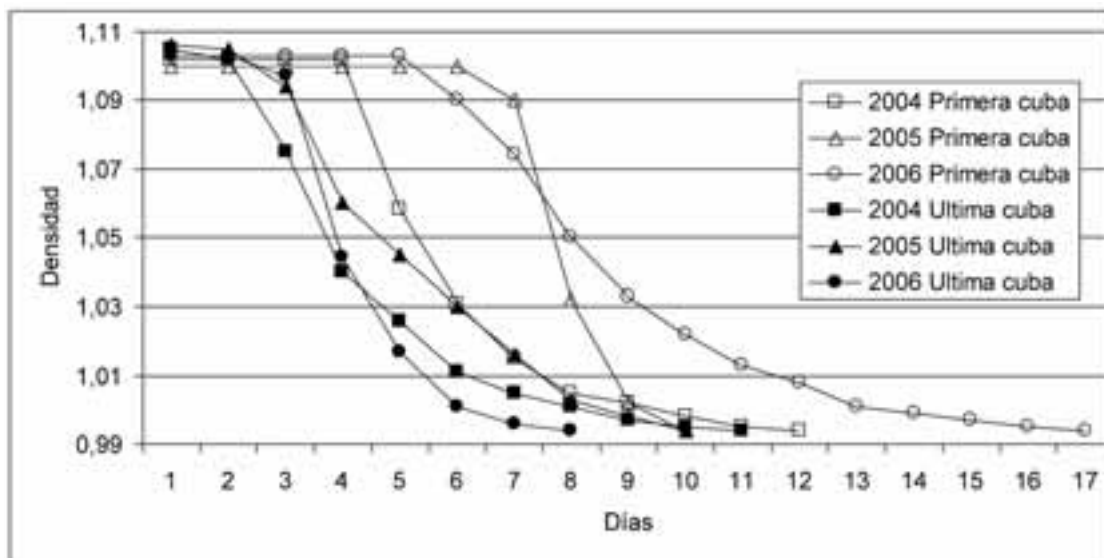


Figura 1. Cinética de las fermentaciones.

cantidades, 3 log ufc/mL, principalmente *Lactobacillus sakei*, que no es muy común aislarlo en mosto o vino. Este microorganismo puede influir positivamente en el aroma del vino (Mtshali PS et al. 2010). Como en años anteriores, *Oenococcus oeni* se aisló solo al final de la FML.

Cinética de fermentación (figura 1). La fermentación en la primera cuba tardó algunos días en comenzar. El mismo resultado se obtuvo en las tres añadas en estudio. La fermentación de las últimas cubas, en todos los casos comenzó prácticamente al día siguiente.

En las tres añadas, la fermentación se completó después de 8 a 10 días. Sin embargo, la primera cuba llenada mostró un comportamiento variable. En 2004, la fermentación se produjo rápidamente, pero en 2006 tomó 17 días, presentando el riesgo de que la fermentación no termine y quede con restos de azúcares. Los análisis químicos mostraron que en las cubas que contenían el primer vino fermentado, la acidez volátil era consistentemente más alta comparada con la del primer día (tabla 5)

### CONCLUSIÓN

La presencia de microorganismos el primer día y el último día de vendimia en tres añadas, 2004, 2005 y 2006. Esta experiencia se desarrolló a escala real.

Hubo una gran variabilidad de levaduras (*Cerevisiae* y no-*Cerevisiae*) el primer día de cosecha, pero después de una selección natural solo *S. Cerevisiae* estuvo presente el último día. Si se produce una fermentación espontánea, las características de los vinos en la primera y en la

última cuba de fermentación serán diferentes. Las técnicas modernas de coinoculación con levaduras no-*Sacharomyces* tiene más opciones de éxito en los primeros días de vendimia, ya que al final las poblaciones de *Sacharomyces* son elevadas y dificultarían su implantación. La fermentación alcohólica tardó unos días en iniciarse en la primera uva recolectada. En el último, con una alta población de *S. Cerevisiae*, comenzó casi de inmediato. La fermentación tomó más tiempo en las primeras cubas llenas y la acidez volátil fue mayor.

Hubo poblaciones de BAA en el momento de llenar las cubas, pero no durante la FA y la FML por falta de oxígeno. Se encontraron varias cepas de BAL en diferentes etapas de vinificación. A pesar de que *Oenococcus oeni* nunca fue detectada durante el encubado y al final de la FA, es esta cepa la que desencadena la FML. Las bacterias lácticas no se multiplicaron durante la FA. Si esto hubiera sucedido, el vino habría corrido el riesgo de desviaciones, como ocurre a veces en vinos con un pH elevado. La variabilidad de especies de una añada a otra implica que estos estudios continúen, ya que los resultados pueden ser diferentes, más aún con el cambio climático.

### BIBLIOGRAFÍA

-Anocibar-Beloqui, A., Kotseridis, Y. & Bertrand, A.(1996). Détermination de la teneur en sulfure diméthyle DANS quelques vins rouges. Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 30(3), 167-170.

2004		Azúcar g/l	Acidez volátil g/L exp.	
Cuba primer día de cosecha		234		
Cuba último día de cosecha		242		
		Alcohol %	acet	
Cuba primer día de cosecha fin FA		13.8		0.36
Cuba último día de cosecha fin FA		14.2		0.37
Cuba primer día de cosecha fin FML		13.8		0.48
Cuba último día de cosecha fin FML		14.2		0.46
2005		Azúcar g/l	Acidez volátil g/L exp.	
Cuba primer día de cosecha		230		
Cuba último día de cosecha		243		
		Alcohol %	acet	
Cuba primer día de cosecha fin FA		13.6		0.39
Cuba último día de cosecha fin FA		14.4		0.32
Cuba primer día de cosecha fin FML		13.6		0.46
Cuba último día de cosecha fin FML		14.4		0.38
2006		Azúcar g/l	Acidez volátil g/L exp.	
Cuba primer día de cosecha		235		
Cuba último día de cosecha		236		
		Alcohol %	acet	
Cuba primer día de cosecha fin FA		13.8		0.36
Cuba último día de cosecha fin FA		13.8		0.25
Cuba primer día de cosecha fin FML		13.9		0.48
Cuba último día de cosecha fin FML		13.9		0.37

Tabla 5. Análisis clásico de los vinos.

<https://doi.org/10.20870/oenooone.1996.30.3.1100>

-Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., and Loureiro, V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *Int. J. Food Microbiol.* 153, 243–259. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.025.

-Belda I, Ruiz J, Esteban-Fernández A, Navascués E, Marquina D, Santos A, Moreno-Arribas MV. 2017. Microbial Contribution to Wine Aroma and Its Intended Use for Wine Quality Improvement. *Molecules* 22 (2): 189 doi: 10.3390/molecules22020189

-Belda, I., Conchillo, L.B., Ruis, J., Navascués, E., Marquina, D. and Santos, A. (2016) Selection and use of pectinolytic yeasts for improving clarification and phenolic extrac-

tion in winemaking. *Int J Food Microbiol* 223, 1–8.

-Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarede, I. and Dubourdieu, D. 2008. Impact of mixed *Torulasporadellbrueckii Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *Int J Food Microbiol* 122, 312–320.

-Benito, S., Hofmann, T., Laier, M., Lochbuehler, B., Schuettler, A., Ebert, K., Fritsch, S., Roecker, J., Rauhut, D., 2015. Effect on quality and composition of Riesling wines fermented by sequential inoculation with non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. Food Res. Technol.* 241, 707–717.

-Bertrand A., 1981. Formation des substances volatiles au cours de la fermentation alcoolique. Incidence sur la qualité



- du vin. Colloque Soc. Fr., Microbiol., Reims, pp 251-267.
- Bokulich, N.A.; Thorngate, J.H.; Richardson, P.M.; Mills, D.A. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2014, 111, E139–E148.
- Bokulich NA, Collins TS, Masarweh C, Allen G, Heymann H, Ebeler SE, Mills DA. Associations among Wine Grape Microbiome, Metabolome, and Fermentation Behavior Suggest Microbial Contribution to Regional Wine Characteristics. *MBio*. 2016 Jun 14;7(3). pii: e00631-16. doi: 10.1128/mBio.00631-16.
- Bravo-Ferrada B, Hollmann A, Delfederico L, Valdés La Hens D, Caballero A, Semorile L (2013) Patagonian red wines: selection of *Lactobacillus plantarum* isolates as potential starter cultures for malolactic fermentation. *World J Microbiol Biotechnol* 29(9): 1537–1549.
- Capozzi V, Garofalo C, Chiriatti MA, Grieco F, Spano G. 2015. Microbial terroir and food innovation: The case of yeast biodiversity in wine. *Microbiological research* 181: 75-83.
- Ciani, M., Beco, L., and Comitini, F. 2006. Fermentation behavior and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 239–245. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005. 11.012
- Chatonnet P., Barbe C., Boidron J. N., Dubourdiou D., 1993. "Origines et incidences organoleptiques de phénols volatils dans les vins application à la maîtrise de la vinification et de l'élevage". *Connaissance aromatique des cépages et qualités des vins*, pp 179-287.
- Contreras, A., Hidalgo, C., Henschke, P.A., Chambers, P.J., Curtin, C., Varela, C., 2014. Evaluation of non-Saccharomyces yeasts for the reduction of alcohol content in wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 1670–1678
- Dec M., Urban-Chmiel R., Gnat S., Puchalski A. and Wernicki A. 2014. Identification of *Lactobacillus* strains of goose origin using MALDI-TOF mass spectrometry and 16S rDNA intergenic spacer PCR analysis. *Research in Microbiology* 165, 190-201.
- Du Toit, W. J. y Lambrechts, M. G. (2002). The enumeration and identification of acetic acid bacteria from South African red wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 74, 57-64.
- García B J (1976) *Metodología de Análisis de Vinos y Derivados*. Ed Sepsa. Vilafranca del Penedés. España. 92 p.
- Gayevskiy V and Goddard MR. 2012. Geographic delineations of yeast communities and populations associated with vines and wines in New Zealand. *The ISME*.
- Gilbert, J.A.; van der Lelie, D.; Zorraonandia, I. Microbial terroir for wine grapes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2014, 111, 5–6.
- González-Arenzana L, Garijo P, Berlanas C, López-Alfaro I, López R, Santamaría P, Gutiérrez AR. 2017. Genetic and phenotypic intraspecific variability of non-Saccharomyces yeasts populations from La Rioja winegrowing region (Spain). *J Appl Microbiol.* 122(2):378-388.
- Gram, C. (1884). The differential staining of Schizomyces in tissue sections and in dried preparations. *Fortschritte der Medizin*, 2, 185-9.
- Grangeteau C, Gerhards D, von Wallbrunn C, Alexandre N, Rousseaux S, Guilloux-Benatier M. 2016. Persistence of two non-Saccharomyces yeasts (*Hanseniaspora* and *Starmerella*) in the cellar. *Front Microbiol* 7: 11
- Liu, Y.; Rousseaux, S.; Tourdot-Marechal, R.; Sadoudi, M.; Gougeon, R.; Schmitt-Kopplin, P.; Alexandre, H. Wine microbiome, a dynamic world of microbial interactions. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2015, 57, 856–873.
- Mingorance-Cazorla L, Clemente-Jiménez JM, Martínez-Rodríguez S, Heras-Vázquez FJL, Rodríguez-Vico F. 2003. Contribution of different natural yeasts to the aroma of two alcoholic beverages. *World J Microbiol Biotechnol* 19:297–304. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1023662409828>.
- Morrison-Whittle P, Goddard MR. 2015. Quantifying the relative roles of selective and neutral processes in defining eukaryotic microbial communities. *ISME J* 9: 2003–2011.
- Mtshali PS, Divol B, van Rensburg P, du Toit M. 2010. Genetic screening of wine-related enzymes in *Lactobacillus* species isolated from South African wines. *Journal of Applied Microbiology* 108:1389-1397. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04535.x
- Nisiotou AA, Dourou D, Filippousi ME, Diamantea E, Fragkoulis P, Tassou C, Banilas G. 2015. Genetic and technological characterisation of vineyard- and winery-associated lactic acid bacteria. *Biomed Res Int*. doi: 10.1155/2015/508254. *Journal* 6, 1281–1290.
- Nisiotou AA, Spiropoulos AE, Nychas G-JE (2007) Yeast community structures and dynamics in healthy and Botrytis-affected grape must fermentations. *Appl Environ Microbiol* 73:6705–6713.
- Oro L, Ciani M, Comitini F (2014) Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *J Appl Microbiol* 116:1209–1217.
- Padilla B., García-Fernández D., González B., Izidoro L., Esteve-Zarzoso B., Beltran G. and Albert Mas. Yeast Biodiversity from DOQ Priorat. *Uninoculated Fermenta-*

- tions. A. Spano, G., Torriani, S., eds. (2017). *Microbiota of Grapes: Positive and Negative Role on Wine Quality*. p 88-98. Lausanne: Frontiers Media. doi: 10.3389/978-2-88945-121-0
- Parapouli, M., Hatziloukas, E., Drainas, C., Perisynakis, A., 2010. The effect of Debina grapevine indigenous yeast strains of *Metschnikowia* and *Saccharomyces* on wine flavour. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37, 85–93.
- Puertas B, Jiménez MJ, Cantos-Villar E, Cantoral JM, Rodríguez ME. 2017. Use of *Torulaspota delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in semi-industrial sequential inoculation to improve quality of Palomino and Chardonnay wines in warm climates. *J Appl Microbiol* 122(3):733-746.
- Polaskova, P.; Herszage, J.; Ebeler, S.E. Wine flavor: Chemistry in a glass. *Chem. Soc. Rev.* 2008, 37, 2478–2489.
- Renault, P., Coulon, J., de Revel, G., Barbe, J.C. and Bely, M. (2015) Increase of fruity aroma during mixed *T. delbrueckii*/ *S. cerevisiae* in fermentation is linked to specific esters enhancement. *Int J Food Microbiol* 207, 40–48.
- Sumby KM, Grbin PR, Jiranek V. (2014). Implications of new research and technologies for malolactic fermentation in wine. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:8111–8132.
- Taylor MW, Tsai P, Anfang N, Ross HA, Goddard MR. 2014. Pyrosequencing reveals regional differences in fruit-associated fungal communities. *Environ Microbiol* 16: 2848–2858.
- Tristezza M, Tufariello M, Capozzi V, Spano G, Mita G, Grieco F. 2016. The Oenological Potential of *Hanseniaspora uvarum* in Simultaneous and Sequential Co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for Industrial Wine Production. *Front Microbiol.* May 9;7:670. doi: 10.3389/fmicb.2016.00670. e Collection 2016
- Valera, M. J., Laich, F., González, S. S., Torija, M. J., Mateo, E. y Mas, A. (2011). Diversity of acetic acid bacteria present in healthy grapes from the Canary Islands. *International Journal of Food Microbiology*, 151, 105–112.
- Vigentinil., Maghradze D., Maurizio M., F. Mezzapelle V., Valdetara F., Failla, Foschino R. Indigenous Georgian Wine-Associated Yeasts and Grape Cultivars to Edit the Wine Quality in a Precision Oenology Perspective. Spano, G., Torriani, S., eds. (2017). *Microbiota of Grapes: Positive and Negative Role on Wine Quality*. p 75-87. Lausanne: Frontiers Media. doi: 10.3389/978-2-88945-121-0.
- Winkler, A.J.; et al. (1974). *General viticulture*. University of California Press. ISBN 0520025911.
- White et al., 1990 T.J. White, T. Bruns, S. Lee, J.W. Taylor. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White (Eds.), *PCR protocols: A guide to methods and applications*, Academic Press Inc., New-York (1990), pp. 315–322.

**PUBLICIDAD 1/3**