

AISLAMIENTO, SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS *Saccharomyces* spp. NATIVAS DE VIÑEDOS EN QUERÉTARO, MÉXICO

ISOLATION, SELECTION AND IDENTIFICATION OF NATIVE *Saccharomyces* spp. YEASTS FROM VINEYARDS IN QUERÉTARO, MÉXICO

Dalia E. Miranda-Castilleja¹, Eunice Ortiz-Barrera¹, Sofía M. Arvizu-Medrano¹, Juan Ramiro-Pacheco¹,
Jesús A. Aldrete-Tapia¹, Ramón Á. Martínez-Peniche^{1*}

Cuerpo Académico de Inocuidad Microbiana de los Alimentos. División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro. Centro Universitario s/n, Colonia las Campanas. 76010. Querétaro, México. (alvar@uaq.mx).

RESUMEN

Querétaro es el segundo estado productor de vinos en México, pero la comercialización es difícil por la falta de calidad y tipicidad. Una alternativa es tener levaduras nativas seleccionadas para aumentar el potencial de los mostos y dar originalidad a los vinos. El objetivo del presente estudio fue el aislamiento, selección con base en su potencial enológico e identificación de levaduras *Saccharomyces* nativas de viñedos queretanos. Las cepas fueron aisladas en 2012 en el laboratorio de fermentaciones y fisiología de frutos de la Universidad Autónoma de Querétaro, México, durante la fermentación espontánea de mostos de uvas maduras recolectadas aleatoriamente dentro de tres viñedos queretanos, diferenciando las *Saccharomyces* en medio lisina. Su tolerancia al etanol (12 %), sulfitado (200 mg L⁻¹) y fenotipo *killer* fue evaluada usando Bioscreen[®]; su potencial enológico se determinó en pruebas de microvinificación con las variedades Cabernet Sauvignon y Merlot, y se identificaron amplificando el dominio D1/D2. Ocho cepas destacaron en su tolerancia a SO₂, etanol y fenotipo *killer*: *S. cerevisiae* (SR19, SR26, SR27, N05) y *S. paradoxus* (N42, SR25, OB10, OB11). Los vinos producidos con estas levaduras fueron secos (<3.8 g glucosa L⁻¹), con acidez total de 6.5 a 8.4 g L⁻¹ ácido tartárico, acidez volátil de 0.13 a 0.26 g L⁻¹ ácido acético, y pH de 3.56 a 3.74, sin diferencias entre levaduras (Tukey, p>0.05). La nativa N05 y K1 (testigo) obtuvieron los mayores grados alcohólicos (15.2 y 14.9 %), eficiencia de conversión (16.31 y 16.67 g glucosa °alcohólico⁻¹), y eficiencia fermentativa (90.8 y 89.1 %). La cepa SR26 contrastó con OB10 en la velocidad de fermentación (19.2 vs. 18.6 g CO₂ 48 h⁻¹) y SR19 y SR26 obtuvieron las menores producciones de SO₂ (25.6 y 36.8 mg L⁻¹). El presente estudio reveló el potencial de levaduras nativas del

ABSTRACT

Querétaro is the second state in wine production in México, but the commercialization is difficult because of the lack of quality and tipicity. An alternative is to have native yeasts selected to increase the potential of grape juices and provide originality to the wines. The objective of this study was the isolation, selection based on their wine potential, and identification of native *Saccharomyces* yeasts in Querétaro vineyards. The strains were isolated in 2012 at the physiology and fermentations laboratory, Universidad Autónoma de Querétaro, México, during the spontaneous fermentation of juices from mature grapes collected randomly inside three Querétaro vineyards, differentiating the *Saccharomyces* in a lysine medium. Their tolerance to ethanol (12 %), sulfite addition (200 mg L⁻¹) and the *killer* phenotype was evaluated using Bioscreen[®]; their enological potential was determined in microvinification tests with Cabernet Sauvignon and Merlot varieties, and they were identified by amplifying the D1/D2 domain. Eight strains stood out because of their tolerance to SO₂, ethanol and the *killer* phenotype: *S. cerevisiae* (SR19, SR26, SR27, N05) and *S. paradoxus* (N42, SR25, OB10, OB11). The wines produced with these yeasts were dry (<3.8 g glucose L⁻¹), with total acidity of 6.5 to 8.4 g L⁻¹ tartaric acid, volatile acidity of 0.13 to 0.26 g L⁻¹ acetic acid, and pH of 3.56 to 3.74, without differences between yeasts (Tukey, p>0.05). The native N05 and K1 (control) strains obtained the highest alcohol degrees (15.2 and 14.9 %), conversion efficiency (16.31 and 16.67 g glucose °alcohol⁻¹) and fermentative efficiency (90.8 and 89.1 %). The SR26 strain contrasted with OB10 in the fermentation speed (19.2 vs. 18.6 g CO₂ 48 h⁻¹), and SR19 and SR26 obtained the lowest SO₂ production (25.6 and 36.8 mg L⁻¹). This study revealed the potential of native yeasts from the state of Querétaro to be used in the production of regional wines.

*Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: julio, 2014. Aprobado: julio, 2015.

Publicado como ARTÍCULO en Agrociencia 49: 759-773. 2015.

estado de Querétaro para utilizar en la producción de vinos regionales.

Palabras clave: Selección de levaduras, vinificación, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces paradoxus*.

INTRODUCCIÓN

Querétaro es el segundo productor de vinos en México (Estevan, 2013) y existe un creciente interés de los productores por extender la superficie establecida con viñedos y mejorar la calidad de los vinos producidos (AVQ, 2011). La falta de mercados es uno de los factores principales que limita el desarrollo de esta agroindustria, porque los vinos carecen de calidad y tipicidad. Ello se debe, en parte, a una acidez alta e insuficiente graduación alcohólica potencial en los mostos, en particular de uvas tintas, lo cual obliga a retrasar la vendimia para aumentar la concentración de los azúcares, causando la pérdida de compuestos aromáticos y la formación de sabores indeseables (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006).

La calidad del vino está fundamentada en el aspecto sensorial, relacionado con los compuestos químicos presentes y su equilibrio, para derivar en una experiencia organoléptica agradable al consumidor (Charters y Pettingrew, 2007). Este concepto está sujeto al criterio personal de los consumidores y es difícil enfocarlo objetivamente, pero se reconocen y se han establecido rangos aceptables de concentración de ciertos compuestos que inciden directamente en la calidad, tales como etanol, acidez volátil, SO₂, así como clasificaciones y recomendaciones para el contenido de azúcares residuales y acidez total (OIV, 2009).

En la elaboración de los vinos, una etapa fundamental es la fermentación alcohólica (FA) la cual es una conversión bioquímica de los azúcares en etanol por acción de las levaduras (Pasteur, 1857). Durante este proceso intervienen géneros de levaduras, como *Hanseniaspora*, *Brettanomyces* y *Candida*, aportando distintas características sensoriales al vino. El género *Saccharomyces* destaca por su mayor eficiencia en la conversión de azúcares y su tolerancia a concentraciones elevadas de etanol y SO₂, y es el género fermentativo por excelencia (Rainieri y Pretorius, 2000).

La FA puede ocurrir de tres formas: 1) Espontánea, desde la microbiota presente de manera natural

Key words: yeast selection, vinification, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces paradoxus*.

INTRODUCTION

Querétaro is the second wine producer in México (Estevan, 2013) and there is growing interest from producers to expand the surface established with vineyards and improve the quality of the wines produced (AVQ, 2011). The lack of markets is one of the main factors that limit the development of this agroindustry, because the wines lack quality and authenticity. This is due, in part, to a high acidity and insufficient potential alcohol degree in the grape juices, particularly of red grapes, which forces the delay of the grape harvest to increase the concentration of sugars, resulting in the loss of aromatic compounds and the formation of undesirable flavors (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006).

The wine quality is based on the sensory aspect, related to the chemical compounds present and their balance, to produce an organoleptic experience that is pleasant for the consumer (Charters and Pettingrew, 2007). This concept is subject to the personal criterion of consumers and it is difficult to frame objectively, although there are acceptable ranges that have been recognized and established for concentration of certain compounds that directly influence the quality, such as ethanol, volatile acidity, SO₂, as well as classifications and recommendations for the content of residual sugars and total acidity (OIV, 2009).

In the elaboration of wines, a fundamental stage is alcoholic fermentation (AF), which is a biochemical conversion of sugars into ethanol through the action of yeasts (Pasteur, 1857). During this process, different yeast genera intervene, such as *Hanseniaspora*, *Brettanomyces* and *Candida*, contributing different sensory characteristics to the wine. The *Saccharomyces* genus stands out because of its higher efficiency in the conversion of sugars, and its tolerance to high concentrations of ethanol and SO₂, and it is the fermentative genus par excellence (Rainieri and Pretorius, 2000).

AF can take place in three ways: 1) Spontaneously, from the microbiota present naturally in the epicarp of the grape or on equipment and surfaces in the warehouse; this exalts the wine authenticity due

en el epicarpio de la uva o en equipos y superficies de la bodega; ésta realza la tipicidad del vino debido a las características únicas aportadas por los microorganismos nativos; 2) adicionando levadura seca activa (LSA), lo cual brinda un proceso reproducible y controlable, pero le resta tipicidad al producto; 3) inoculación con levaduras nativas seleccionadas, las cuales permitirán procesos controlables y reproducibles, sin que los vinos pierdan el carácter único y típico que los microorganismos nativos proporcionan (Fleet, 2003; Santamaría *et al.*, 2008).

Los criterios de interés general para seleccionar cepas de levaduras enológicas incluyen buena eficiencia fermentativa, baja producción de SO₂ y H₂S, resistencia al factor *killer* o bien presencia de éste y tolerancia a niveles altos de etanol y SO₂ (Pretorius, 2000). Durante el proceso de selección deben considerarse las necesidades particulares de la región y, una vez evaluadas las bondades tecnológicas generales, considerar criterios particulares como la adaptación a bajas temperaturas y producción de aromas (Torija *et al.*, 2003), mostos con concentraciones altas de azúcares (Mercado *et al.*, 2007) o requerimientos bajos de nitrógeno asimilable (Manginot *et al.*, 1998).

Hay interés creciente en el uso de cepas nativas seleccionadas en La Patagonia, Argentina (Lopes *et al.*, 2007), Valencia, España (Viana *et al.*, 2008), y en países con reciente actividad vitivinícola como Sudáfrica (Jolly *et al.*, 2003), Nueva Zelanda y Australia (Swiegers *et al.*, 2006; Serjeant *et al.*, 2008), donde se han seleccionado levaduras nativas y tienen rápida aceptación de sus productos, los cuales se caracterizan por elevada tipicidad y prácticas de última generación.

En contraste con la situación mundial, en México no hay estudios acerca de la selección de levaduras enológicas, por lo cual los productores locales inducen la fermentación con cepas comerciales importadas. Esto implica costos adicionales, fuga de divisas y usar microorganismos que no necesariamente responden a las necesidades de los vitivinicultores locales.

La hipótesis de este estudio fue que es posible obtener levaduras provenientes de viñedos de la región vitivinícola de Querétaro con potencial enológico, para mejorar los rendimientos alcanzados por cepas comerciales. El objetivo del estudio fue aislar, determinar el potencial enológico y fermentativo, e

to the unique characteristics contributed by native microorganisms; 2) by adding active dry yeast (ADY), which provides a reproducible and controllable process, but takes away tipicity from the product; 3) by inoculating with selected native yeasts, which will allow controllable and reproducible processes, without the wines losing their unique and typical character that native microorganisms provide (Fleet, 2003; Santamaría *et al.*, 2008).

The criteria of general interest to select yeast strains include good fermentative efficiency, low production of SO₂ and H₂S, resistance to the *killer* factor or else its presence, and tolerance at high levels of ethanol and SO₂ (Pretorius, 2000). During the selection process, the specific needs of the region should be taken into account and, once the general technological advantages have been evaluated, specific criteria should be considered such as adaptation to low temperatures and aroma production (Torija *et al.*, 2003), grape juices with high sugar concentrations (Mercado *et al.*, 2007) or low requirements of assimilable nitrogen (Manginot *et al.*, 1998).

There is a growing interest in the use of native strains selected in Patagonia, Argentina (Lopes *et al.*, 2007), Valencia, Spain (Viana *et al.*, 2008), and countries with recent wine production activities such as South Africa (Jolly *et al.*, 2003), New Zealand and Australia (Swiegers *et al.*, 2006; Serjeant *et al.*, 2008), where native yeasts have been selected and have had a fast acceptance of their products, characterized by high tipicity and state-of-the-art practices.

In contrast with the global situation, in México there are no studies about the selection of winemaking yeasts, which is why local producers induce fermentation with imported commercial strains. This implies additional costs, currency drains, and using microorganisms that do not necessarily respond to the needs of local wine producers.

The hypothesis of this study was that it is possible to obtain yeasts from vineyards in the wine-producing region of Querétaro with enological potential, to improve the yields attained with commercial strains. The objective of the study was to isolate, to determine the wine production and fermentative potential, and to identify native *Saccharomyces* yeast strains from vineyards in Querétaro.

identificar cepas de levaduras *Saccharomyces* nativas de viñedos de Querétaro.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico y sitio experimental

En el estudio se usaron frutos de vid (*Vitis vinifera*) de los cultivares Merlot y Cabernet Sauvignon cosechados en madurez fisiológica aparente durante 2012 en tres viñedos comerciales en el estado de Querétaro con la siguiente ubicación geográfica (De la Cruz *et al.*, 2012) (Figura 1): El Rosario, ubicado en la carretera La Griega-El Lobo Km 6, El Marqués (20° 58' N, 100° 09' O, 1850 msnm); El Barreno, ubicado en el centro de San Juan del Río (20° 23' N, 99° 59' O, 1920 msnm); Viñedos Azteca, carretera San Juan del Río-Cadereyta Km 40.4, Ezequiel Montes (20° 43' N, 99° 44' O, 1950 msnm).

La cepa de referencia fue *S. cerevisiae* K1 (ICV K1V-1116) (Lallemand Inc., Ontario, Canadá), caracterizada por poseer el fenotipo *killer* (K2), tolerancia alta al etanol (18 %), eficiencia fermentativa de 16.7 g de azúcar por grado alcohólico producido, una fase lag corta, baja producción de SO₂ y acidez volátil, y una velocidad de fermentación moderada.

Aislamiento y diferenciación de cepas *Saccharomyces*

Los frutos se recolectaron en hileras y plantas tomadas al azar, se llevaron al laboratorio de fermentaciones y fisiología de frutos de la Universidad Autónoma de Querétaro, donde se estrujaron e hicieron fermentar de manera espontánea dentro de bolsas plásticas estériles (300 mL de mosto) a 25 °C por 8 d. Cada 2 d se tomaron alícuotas de 1 mL, con las cuales se realizaron tres diluciones decimales consecutivas que se sembraron mediante extensión en superficie sobre agar papa dextrosa (APD) adicionado de rosa de Bengala (60 mg L⁻¹) y ampicilina (100 mg L⁻¹), incubándose 5 d a 25 °C. Las colonias que desarrollaron y presentaron la morfología típica de levaduras se sembraron mediante un asa estéril en medio Agar Nutritivo-Dextrosa para levaduras (NYDA), donde se incubaron 3 d a 25 °C.

Para diferenciar las cepas del género *Saccharomyces*, las levaduras aisladas se sembraron en dos pases consecutivos en medio agar Lisina (Oxoid, Hampshire, UK), selectivo para no-*Saccharomyces* (Medina *et al.*, 2007), incubándose 4 d a 25 °C.

Tolerancia a anhídrido sulfuroso y etanol

Un analizador turbidimétrico Bioscreen[®] fue utilizado y mediante lecturas automatizadas de densidad óptica (DO) (cada

MATERIALS AND METHODS

Biological material and experimental site

In the study, grapevine (*Vitis vinifera*) fruits were used from the Merlot and Cabernet Sauvignon cultivars harvested in apparent physiological maturity during the 2012 harvest in three commercial vineyards in the state of Querétaro, with the following geographic locations (De la Cruz *et al.*, 2012) (Figure 1): El Rosario, located on highway La Griega-El Lobo Km 6, El Marqués (20° 58' N, 100° 09' W, 1850 masl); El Barreno, located in downtown San Juan del Río (20° 23' N, 99° 59' W, 1920 masl); Viñedos Azteca, highway San Juan del Río-Cadereyta Km 40.4, Ezequiel Montes (20° 43' N, 99° 44' W, 1950 masl).

The reference strain was *S. cerevisiae* K1 (ICV K1V-1116) (Lallemand Inc., Ontario, Canada), characterized by having the *killer* phenotype (K2), high tolerance to ethanol (18 %), fermentative efficiency of 16.7 g of sugar per alcohol degree produced, a short lag phase, low SO₂ and volatile acidity production, and a moderate fermentation speed.

Isolation and differentiation of *Saccharomyces* strains

The fruits were collected in rows and plants randomly chosen and taken to the fermentation and fruit physiology



Figura 1. Ubicación geográfica de los viñedos queretanos en estudio.

Figure 1. Geographic location of the Querétaro vineyards in the study.

20 min, por 40 h, a 25 °C) se observó la cinética de crecimiento de las cepas evaluadas. Una concentración de 6Log de UFC de cada levadura se colocó en un total de 200 μ L en pozos individuales, conteniendo caldo nutritivo-dextrosa para levaduras (NYDB) ajustado a pH 3.5 y 25 °Brix, en presencia de: 1) Etanol (12 %) o, 2) SO₂ (200 mg L⁻¹). La viabilidad de las cepas se verificó inoculándolas en el mismo medio NYDB en ausencia de los productos a evaluar.

Además de observar la presencia de crecimiento en el medio correspondiente, las variables cinéticas evaluadas fueron (Métris *et al.*, 2006): 1) Tiempo de detección (h), indica la duración de la fase de adaptación, tiempos más cortos suponen mayor tolerancia al compuesto; 2) velocidad de desarrollo, representa el incremento de DO por unidad de tiempo (DO min⁻¹), calculada de la pendiente de la línea recta durante la fase de crecimiento exponencial y mayores velocidades suponen mayor tolerancia.

Tolerancia al fenotipo *killer*

Obtención del caldo-toxina

La cepa de referencia K1 (*killer*) se incubó 72 h a 25 °C en medio NYDB (pH 3.5). Después el caldo de cultivo se filtró a través de una membrana con tamaño de poro de 0.45 μ m (Millipore) para separar las células de la cepa del caldo-toxina, el cual fue recuperado para ser probado en las cepas aisladas (Izgü *et al.*, 2006).

Prueba de tolerancia

En esta prueba también se usó el analizador Bioscreen® inoculando 6Log de UFC de cada cepa en cada fosa conteniendo: 1) 100 % de caldo-toxina o, 2) 50 % de caldo-toxina y 50 % de medio NYDB (50:50). El equipo se programó para realizar lecturas cada 20 min durante 72 h a 25 °C y evaluar el máximo crecimiento de la levadura, determinado por la máxima DO alcanzada en el tiempo de incubación, el cual se comparó con el obtenido en las pruebas testigo para determinar el porcentaje de inhibición como variable de estudio. Los testigos fueron dos medios diluidos en las proporciones (NYDB:Agua): 1) 1:4 como testigo del caldo-toxina al 100 % y, 2) 1:2 para el caldo 50:50.

Pruebas de microvinificación

Estas pruebas se realizaron con las levaduras seleccionadas en las pruebas de tolerancia ya descritas. Para eliminar las poblaciones de microorganismos naturalmente presentes, uvas despalladas de las dos variedades fueron sometidas a un proceso de

laboratory in Universidad Autónoma de Querétaro, where they were crushed and induced to ferment spontaneously inside sterile plastic bags (300 mL of juice) at 25 °C for 8 d. Every 2 d, aliquots of 1 mL were sampled, with which three consecutive decimal dilutions were made, which were cultured through surface-spreading over potato dextrose agar (PDA) with Rose Bengal (60 mg L⁻¹) and ampicillin (100 mg L⁻¹), and incubated for 5 d at 25 °C. The colonies that developed and presented the typical yeast morphology were isolated in Nutrient Yeast Dextrose Agar (NYDA), where they were incubated for 3 d at 25 °C.

To distinguish the strains of *Saccharomyces* genus, the isolated yeasts were sub-cultured by two consecutive transfers in lysine agar medium (Oxoid, Hampshire, UK), selecting for non-*Saccharomyces* (Medina *et al.*, 2007), and incubating for 4 d at 25 °C.

Tolerance to sulfur anhydride and ethanol

A turbidimetric Bioscreen® analyzer was used and through automatic readings of optic density (OD) (every 20 min, for 40 h, at 25 °C) the growth kinetics of the strains evaluated was observed. A concentration of 6Log of UFC from each type of yeast was placed in a total of 200 μ L in individual wells, containing nutrient yeast dextrose broth (NYDB) adjusted to pH 3.5 and 25 °Brix, in the presence of: 1) Ethanol (12 %) or, 2) SO₂ (200 mg L⁻¹). The viability of the strains was verified by inoculating them in the same NYDB medium in absence of the products to be evaluated.

In addition to observing the presence of growth in the corresponding medium, the kinetic parameters evaluated were (Métris *et al.*, 2006): 1) detection time (h), indicating the duration of the adaptation phase, where shorter time entails greater tolerance to the compound; 2) development speed, representing the OD increase per unit of time (OD min⁻¹), calculated from the slope of the line during the exponential growth phase, where greater speeds entail a higher tolerance.

Tolerance to the *killer* phenotype

Obtaining the toxin-broth

The reference K1 strain (*killer*) was incubated for 72 h at 25 °C in NYDB medium (pH 3.5). Then, the nutrient broth was filtered through a membrane with pore size of 0.45 μ m (Millipore) in order to separate the strain cells from the toxin-broth, which was recovered to be tested on the isolated strains (Izgü *et al.*, 2006).

termovinificación (60 °C, 20 min; Ribereau-Gayon *et al.*, 2006). La eficiencia de este método fue comprobada sembrando alícuotas de 100 μ L del mosto mediante extensión en superficie sobre medio APD, en 12 ocasiones y se observó nulo crecimiento de microorganismos. Después las uvas fueron prensadas manual y asepticamente para obtener los mostos, los cuales fueron ajustados a pH 3.5 y a 25 °Brix, mediante adición de ácido tartárico y sacarosa estériles, respectivamente.

Las cepas de levaduras seleccionadas fueron incubadas 48 h a 25 °C en medio NYDB, después se realizaron recuentos y se ajustaron para obtener una concentración final en el mosto de 5Log de UFC mL⁻¹ (OIV, 2012a). La fermentación se realizó en matraces de 1 L con 700 mL de mosto, a 25 °C, en condiciones estériles y de semianaerobiosis, y se determinó el peso de los matraces cada 24 h, hasta que fuera constante.

El comportamiento fermentativo se determinó con las variables: 1) Grado alcohólico, por destilación directa y picnometría (CEE, 1990); 2) eficiencia fermentativa, porcentaje de alcohol producido con relación al grado alcohólico potencial; 3) conversión azúcar/etanol, gramos de azúcar usados para producir un grado alcohólico; 4) velocidad de fermentación expresada en g de CO₂ desprendido cada 48 h (Hidalgo y Fernández, 2005).

También se determinaron las siguientes variables físicas y químicas de los vinos (OIV, 2009): 1) Azúcares reductores, por el método de Fehling Causse Bonnans; 2) pH, usando un potenciómetro Conductronic calibrado a dos puntos; 3) acidez total titulable (ATT) mediante titulación; 4) acidez volátil (AV) por el método de García-Tena (García, 1976); 5) SO₂ total, por el método de Rippert (CEE, 1990).

Identificación de las levaduras seleccionadas

Para la identificar las levaduras se usó PCR amplificando el dominio D1/D2 del gen que codifica para la subunidad 26S del ARNr en las levaduras. Para la extracción de ADN se usó la técnica con calor y purificación con fenol-cloroformo (Silva *et al.*, 2012). Para la reacción de PCR se usaron los oligonucleótidos universales NL1 (GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) y NL4 (GGTCCGTGTTTCAAGACGG) con las condiciones: 2 min a 95 °C, 35 ciclos (30 s a 95 °C, 1 min a 56.75° y 1 min a 72 °C) y 10 min a 72 °C (Cano *et al.*, en 2004). Los productos obtenidos fueron enviados a la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva de ADN de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los resultados se introdujeron en el banco de datos mediante el programa Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), para buscar homología con secuencias de levaduras reportadas (Guamán y Carbal, 2009).

Tolerance test

The Bioscreen[®] analyzer was also used for this test, inoculating 6Log of UFC from each strain in each well that contained: 1) 100 % toxin-broth or, 2) 50 % toxin-broth and 50 % NYBD medium (50:50). The equipment was programmed to perform readings every 20 min during 72 h at 25 °C and to evaluate the maximum yeast growth, determined by the maximum OD reached in the incubation time, which was compared with the one obtained in control tests to determine the percentage of inhibition as a study variable. The controls were two media diluted in the following proportions (NYBD:Water): 1) 1:4 as control of toxin-broth at 100 % and, 2) 1:2 for the 50:50 broth.

Microvinification assays

These assays were performed with the yeasts selected in the tolerance tests already described. To eliminate the populations of microorganisms naturally present, destemmed grapes of the two varieties were subjected to a thermovinification process (60 °C, 20 min; Ribereau-Gayon *et al.*, 2006). The efficiency of this method was tested by sowing 100 μ L aliquots of the juice through surface-spreading on PDA medium, 12 times, and no microorganism growth was observed. Then, the grapes were pressed manually and aseptically to obtain the juices, which were adjusted to pH 3.5 and 25 °Brix, by adding tartaric acid and sterile sucrose, respectively.

The yeast strains selected were incubated for 48 h at 25 °C, in NYBD medium; then recounts were done and they were adjusted to obtain a final concentration in the juice of 5Log of UFC mL⁻¹ (OIV, 2012a). Fermentation was performed in 1 L flasks with 700 mL of juice, at 25 °C, under sterile and semi-anaerobiosis conditions, and the weight of the flasks was determined every 24 h until it was constant.

The fermentative behavior was determined with the parameters: 1) Alcohol degree, from direct distillation and pycnometer (CEE, 1990); 2) fermentative efficiency, percentage of alcohol produced with regards to the potential alcohol degree; 3) sugar/ethanol conversion, grams of sugar used to produce one alcohol degree; 4) fermentation speed expressed in g of CO₂ given off every 48 h (Hidalgo and Fernández, 2005).

The following physical and chemical parameters of the wines were also determined (OIV, 2009): 1) reducing sugars, with the Fehling Causse Bonnans method; 2) pH, using a Conductronic potentiometer calibrated in two points; 3) total titratable acidity (TTA) through titrating; 4) volatile acidity (VA) with the García-Tena method (García, 1976); 5) total SO₂, with the Rippert method (CEE, 1990).

Análisis estadísticos

Para las pruebas de microvinificación se usó un diseño unifactorial (el factor de estudio fue cepas de levadura) con ocho tratamientos (ocho cepas) más el tratamiento testigo (cepa K1); con dos repeticiones, y la unidad experimental fue un matraz de 1 L con 700 mL de mosto. Con los datos se realizó un AN-DEVA y las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) usando el programa JMP® 9.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN**Aislamiento de levaduras**

De las fermentaciones espontáneas producidas en laboratorio con la uva cosechada, de los tres viñedos se aislaron 198 cepas de levaduras. Las correspondientes al género *Saccharomyces*, de acuerdo con la prueba efectuada en medio lisina (52 equivalente a 26 %), se muestran en el Cuadro 1 de acuerdo con el viñedo de origen. Los porcentajes encontrados en este estudio concuerdan con lo reportado por Jolly *et al.* (2003) quienes observaron un mayor porcentaje de cepas no *Saccharomyces* en aislamientos realizados en frutos. Además, *Saccharomyces* predomina principalmente en ambientes de bodega (Mercado *et al.*, 2007).

Identification of selected yeasts

In order to identify the yeasts, a PCR was used amplifying the D1/D2 domain of the gene that codes for subunit 26S of the RNAr in yeasts. For DNA extraction, the technique with heat and phenol-chloroform purification was used (Silva *et al.*, 2012). For the PCR reaction, the universal nucleotides NL1 (GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) and NL4 (GGTCCGTGTTTCAAGACGG) were used, with the following conditions: 2 min at 95 °C, 35 cycles (30 s at 95 °C, 1 min at 56.75° and 1 min at 72 °C), and 10 min at 72 °C (Cano *et al.*, in 2004). The products obtained were then sent to the Unit of Massive DNA Sequencing at Universidad Nacional Autónoma de México. The results were introduced into the database with the Blast software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) to search for homology with sequences of yeasts reported (Guamán and Carbajal, 2009).

Statistical analyses

For the microvinification assays, a single-factor design was used (the study factor was yeast strains) with eight treatments (eight strains) plus the control treatment (K1 strain), with two replicates, and the experimental unit was one 1 L flask with 700 mL of juice. An ANOVA test was performed with the data, and the means were compared using the Tukey test ($p < 0.05$) using the JMP® 9 software.

Cuadro 1. Nomenclatura, procedencia y proporción en cada viñedo de las 52 cepas de levaduras *Saccharomyces* diferenciadas de tres viñedos establecidos en Querétaro.

Table 1. Nomenclature, origin and proportion in each vineyard of the 52 *Saccharomyces* yeast strains differentiated from three vineyards established in Querétaro.

Viñedo	Total de levaduras aisladas	Porcentaje de <i>Saccharomyces</i> por viñedo	Número de cepas y porcentaje respecto a las 52 <i>Saccharomyces</i>	Cepas <i>Saccharomyces</i>
Viñedos Azteca	21	10 %	2 (4 %)	SA02 [†] y SA18
El Rosario	71	26 %	22 (52 %)	SR05, SR10, SR12, SR14, SR16, SR19, SR21, SR22, SR25, SR26, SR27, SR32, SR33, SR35, SR37, SR40, SR41, OR01, OR06, OR08, N05, N22, N36, N38, N47, N56, N80 y N86
El Barreno	106	31 %	28 (42 %)	SB02, SB13, SB16, SB20, SB23, SB27, SB29, SB39, SB40, OB07, OB08, OB10, OB11, N26, N40, N41, N42, N49, N70, N72, N78 y N84

[†]En la nomenclatura la segunda letra corresponde al viñedo de procedencia y el número a uno asignado al momento de su aislamiento. [‡]In the nomenclature the second letter corresponds to the vineyard of origin and the number to one assigned at the time of its isolation.

Tolerancia a SO₂ y etanol

Todas las levaduras probadas (52) se desarrollaron en el medio testigo, lo cual muestra su viabilidad al momento de la evaluación, mientras que sólo 56 % (29) crecieron en el medio en presencia de 200 mg L⁻¹ de SO₂. En la Figura 2 se muestra que 23 de éstas mostraron comportamientos similares, con tiempos de detección menores a 12 h y velocidades superiores a 0.045 DO min⁻¹ (dentro del recuadro) correspondientes a una elevada tolerancia al compuesto. En contraste, las levaduras SR19, SR26, SR14, SR16 y SB2 tuvieron tiempos mayores a 19 h y velocidades menores a 0.03 DO min⁻¹, mientras que la cepa K1 tuvo un valor intermedio en tiempo de detección (15.5 h) y una velocidad de desarrollo muy baja (0.0073 DO) min⁻¹.

Durante el proceso de vinificación, el SO₂ se adiciona como antioxidante y antiséptico en una operación llamada sulfitado, por lo cual las levaduras seleccionadas para realizar la FA deben tolerar una concentración de SO₂ total superior a 50 mgL⁻¹, usada con frecuencia en vinificación en tinto (Riberau-Gayon *et al.*, 2006; OIV, 2012a). En este caso se probó una concentración mayor (200 mgL⁻¹), por lo cual el desarrollo (en mayor o menor proporción) en este medio las hace aptas para ser seleccionadas.

De las 29 levaduras desarrolladas en presencia de SO₂, tres (SR14, SR16 y SB2) fueron incapaces de desarrollarse en etanol 12 %. A diferencia de la prueba de tolerancia a SO₂, aquí se observaron comportamientos más contrastantes entre las levaduras (Figura 3). Nueve cepas (contenidas en el recuadro) se detectaron con tiempos de detección menores a 30 h y velocidades de desarrollo superiores a 0.006

RESULTS AND DISCUSSION

Yeast isolation

From the spontaneous fermentations produced in the lab with the grapes harvested, 198 yeast strains were isolated from the three vineyards. Those that corresponded to the *Saccharomyces* genus, according to the test performed in lysine medium (52 equivalent to 26 %), are shown in Table 1 based on the vineyard of origin. The percentages found in this study agree with what Jolly *et al.* (2003) reported, who observed a higher percentage of non-*Saccharomyces* strains in isolations performed from fruits. Also, *Saccharomyces* predominates primarily in warehouse environments (Mercado *et al.*, 2007).

Tolerance to SO₂ and ethanol

All the yeasts tested (52) developed in the control medium, which shows their viability at the time of evaluation, while only 56 % (29) grew in the medium in presence of 200 mg L⁻¹ of SO₂. Figure 2 shows that 23 of these showed similar behaviors, with detection times that are under 12 h and speeds that are over 0.045 OD min⁻¹ (inside the box), corresponding to a high tolerance to the compound. In contrast, the yeasts SR19, SR26, SR14, SR16 and SB2 had times of over 19 h and speeds below 0.03 OD min⁻¹, whereas the K1 strain had an intermediate level in the detection time (15.5 h) and a very low development speed time (0.0073 OD) min⁻¹.

During the winemaking process, the SO₂ is added as an antioxidant and antiseptic in an

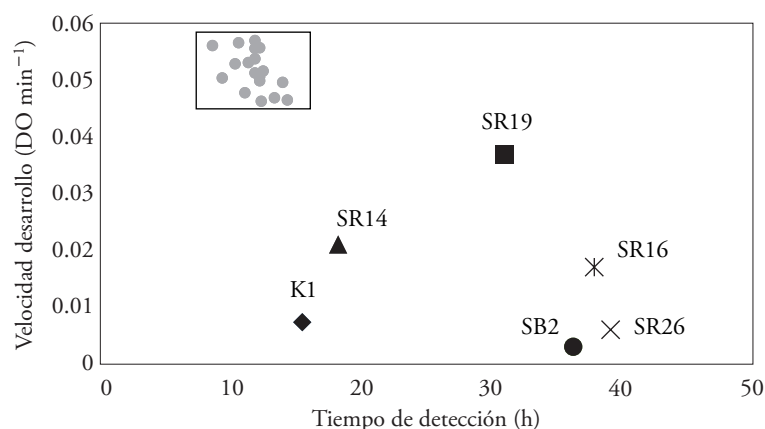


Figura 2. Tolerancia de 29 levaduras a 200 mg de SO₂ L⁻¹ evaluado en Bioscreen®, usando medio NYDB. Sólo aquellas que mostraron un comportamiento distinto de la mayoría están señaladas con nombre. El recuadro enmarca aquellas que tuvieron un desempeño mejor.

Figure 2. Tolerance of 29 yeasts to 200 mg of SO₂ L⁻¹ evaluated in Bioscreen®, using NYBD medium. Only those that showed a different behavior from the majority are singled out with a name. The box shows those that had a better performance.

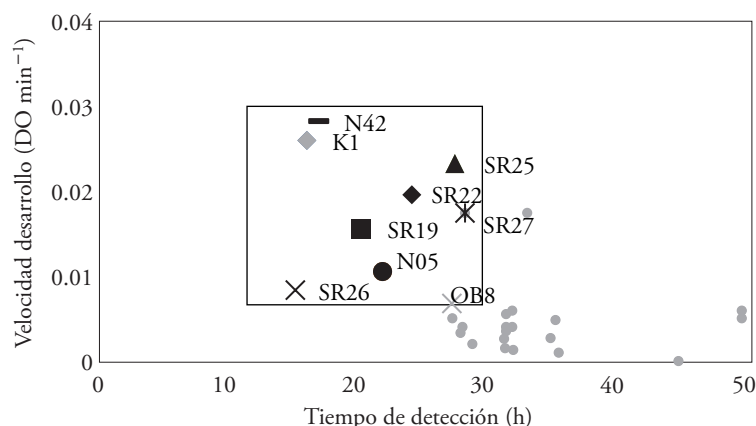


Figura 3. Tolerancia de 26 levaduras a etanol (12 %) evaluado en Bioscreen®, empleando medio NYDB. Con nombre y enmarcadas en el recuadro se señalan aquellas con un mejor comportamiento.

Figure 3. Tolerance of 26 yeasts to ethanol (12 %) evaluated in Bioscreen®, using NYBD medium. The ones with better performance had a name and were framed in the box.

DO min⁻¹: K1 (cepa de referencia) y la nativa N42, con valores similares entre ellas, seguidas de las cepas SR19, SR22, SR25, SR26, SR27, N05 y OB08.

Ramos *et al.* (2013) evaluaron la tolerancia a estos dos compuestos de 66 cepas de levaduras tendientes a la producción de etanol como biocombustible, y encontraron que 30 % crecieron en medios con 400 mg L⁻¹ de SO₂ y 12 % de etanol. En la ficha descriptiva de la patente de dos cepas de *Saccharomyces* para fermentaciones alcohólicas (IMIA 103 e IMIA 277), Hidalgo y Fernández (2005) indican que éstas se pueden desarrollar (resistentes) a 200 mg L⁻¹ de SO₂ total y hasta 14 % de etanol.

Tolerancia al fenotipo *killer*

Con caldo-toxina a 100 % se observó inhibición mayor (superior a 50 %) que con el caldo 50:50 (en torno a 20 %) (Figura 4), un resultado esperado porque en el primer caso la toxina está en mayor concentración y, además, los nutrientes del medio fueron prácticamente consumidos por la levadura K1 durante la preparación del extracto, mientras que el segundo medio cuenta con los nutrientes del medio NYDB y la toxina está diluida.

Asimismo, el fenotipo *killer* es ocasionado por la secreción extracelular de toxinas por las levaduras caracterizadas con este fenotipo (principalmente K1, K2 y K8 para *S. cerevisiae*) (Marquina *et al.*, 2002). Esta secreción implica que la o las toxinas estarán presentes en el caldo de cultivo de una cepa *killer* y ésta se puede extraer para probar su efecto tóxico en otras células. La metodología usada en otros estudios es cualitativa, y consiste en el uso de pruebas en placa donde se determina la sensibilidad (S), neutralidad

operation called sulfite addition, which is why the yeasts selected to carry out the AF must tolerate a total SO₂ concentration higher than 50 mg L⁻¹, used frequently in red winemaking (Riberau-Gayon *et al.*, 2006; OIV, 2012a). In this case, a higher concentration was tested (200 mg L⁻¹), which is why the development (to a higher or lower proportion) in this medium makes them apt to be selected.

Of the 29 yeasts developed in presence of SO₂, three (SR14, SR16 and SB2) were incapable of developing in ethanol 12 %. In contrast with the SO₂ tolerance test, more contrasting behaviors between yeasts were observed here (Figure 3). Nine strains (included in the box) were detected with detection times below 30 h and development speeds above 0.006 OD min⁻¹: K1 (reference strain) and the native N42, with similar values between them, followed by the strains SR19, SR22, SR25, SR26, SR27, N05 and OB08.

Ramos *et al.* (2013) evaluated the tolerance to these two compounds of 66 yeast strains that tend to ethanol production as biofuel, finding that 30 % grew in media with 400 mg L⁻¹ of SO₂ and 12 % of ethanol. In the descriptive card of the patent of two *Saccharomyces* strains for alcoholic fermentations (IMIA 103 and IMIA 277), Hidalgo and Fernández (2005) indicate that these can be developed (resistant) at 200 mg L⁻¹ of SO₂ total and up to 14 % ethanol.

Tolerance to the *killer* phenotype

With toxin-broth at 100 %, a greater inhibition was observed (over 50 %) than with the 50:50 broth (of around 20 %) (Figure 4), an expected outcome because in the first case the toxin is in higher

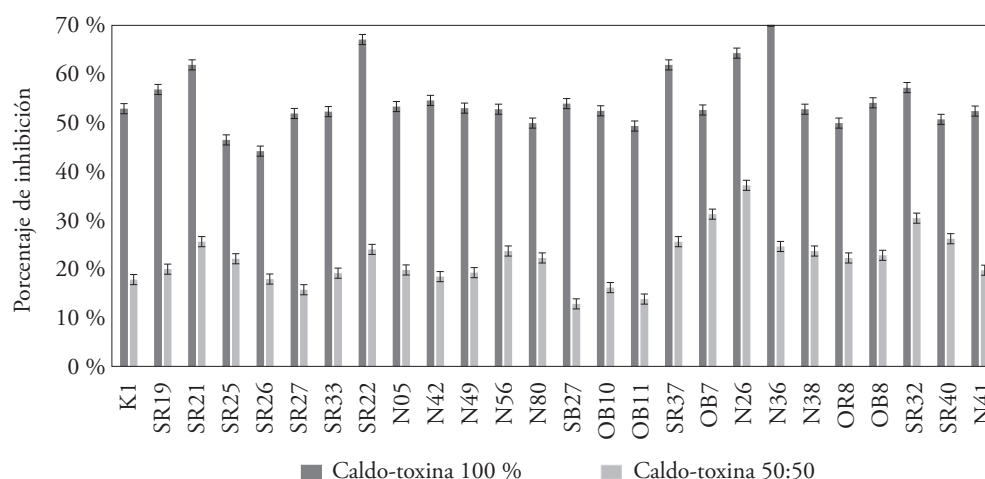


Figura 4. Tolerancia a la toxina *killer* de las 26 levaduras resistentes a etanol y sulfitado, representado como porcentaje de inhibición.

Figure 4. Tolerance to the *killer* toxin by the 26 yeasts resistant to ethanol and sulfite addition, represented as percentage of inhibition.

(N) o resistencia (K) a la toxina *killer* usando cepas de referencia de tipos K y S (Bevan y Makower, 1963). Así, Jacobs *et al.* (1991) observaron, de manera semi-cuantitativa midiendo el tamaño del halo de inhibición formado, diferentes grados de sensibilidad en placa en función de la cepa. En estudios cuya finalidad fue determinar las proporciones de cada fenotipo dentro de cepas aisladas, se observan proporciones superiores a 80 % de cepas N o S (Gutiérrez *et al.*, 1995; Rodríguez *et al.*, 1998).

En el medio caldo-toxina 100 % siete cepas destacaron con menos de 51 % de inhibición, mientras que en el medio caldo-toxina 50:50 doce levaduras presentaron menos de 20 % de inhibición. No se obtuvo una correlación del comportamiento de las levaduras en los dos medios ($R=0.25$), las cepas OB10, OB11, OR08 y SR26 sobresalieron en ambos medios con menor inhibición. En síntesis, de las 52 cepas *Saccharomyces* analizadas, se seleccionaron ocho que desarrollaron en presencia de SO_2 , destacaron en etanol y fueron tolerantes a la toxina *killer* (Cuadro 2).

Pruebas de microvinificación

Comportamiento fermentativo

La cepa N05 obtuvo los mayores valores de grado alcohólico (15.2 %), eficiencia fermentativa (90.8 %) y conversión azúcar/etanol (16.3 g azúcar/grado alcohólico), valores muy similares a los logrados por K1,

concentración and, in addition, nutrients from the medium were practically consumed by the K1 yeast during preparation of the extract, whereas the second medium has the nutrients from the NYDB medium and the toxin is diluted.

Likewise, the *killer* phenotype is caused by the extracellular secretion of toxins from yeasts characterized by this phenotype (primarily K1, K2 and K8 for *S. cerevisiae*) (Marquina *et al.*, 2002). This secretion implies that one or more toxins will be present in the cultivation broth of a *killer* strain and it can be extracted to obtain its toxic effect on other cells. The methodology used in other studies is qualitative and consists of the use of plate tests where the sensitivity (S), neutrality (N) or resistance (K) to the *killer* toxin is determined, using reference strains of the types K and S (Bevan and Makower, 1963). Thus, Jacobs *et al.* (1991) observed, semi-quantitatively by measuring the size of the inhibition halo formed, different degrees of sensitivity on the plate in function of the strain. In studies whose finality was to determine the proportions of each phenotype within isolated strains, proportions greater than 80 % of N or S strains were observed (Gutiérrez *et al.*, 1995; Rodríguez *et al.*, 1998).

In the toxin-broth 100 % medium, seven strains stood out with less than 51 % of inhibition, while in the toxin-broth 50:50 medium, twelve yeasts presented less than 20 % of inhibition. A

Cuadro 2. Cepas seleccionadas para el proceso de microvinificación.**Table 2. Strains selected for the microvinification process.**

Cepa	Tolerancia		
	Etanol 12 %	SO ₂ 200 mg L ⁻¹	Killer
SR19	+++ [†]	+	++
SR25	+++	+++	+++
SR26	+++	+	+++
SR27	+++	+++	+++
N05	+++	+++	++
N42	+++	+++	++
OB10	++	+++	+++
OB11	++	+++	+++

+ = Menor tolerancia; ++ = Tolerancia intermedia; +++ = Mayor tolerancia; ♦ = Lowest tolerance; ++ = Intermediate tolerance; +++ = Highest tolerance.

y superior a SR25 (Cuadro 3). La eficiencia alta de conversión obtenida por estas cepas es de interés para los vinos tintos producidos localmente, debido a la dificultad para alcanzar, con los azúcares acumulados naturalmente en la región, la graduación alcohólica deseada para vinos tintos de calidad. Los resultados con la cepa de referencia (K1) concuerdan con lo reportado en su ficha técnica (ICV K1V-1116), con una

correlation of the behavior of yeasts in the two media was not obtained ($R=0.25$); the strains OB10m OB11, OR08 and SR26 stood out in both media with less inhibition. In sum, of the 52 *Saccharomyces* strains analyzed, eight were selected that developed in the presence of SO₂, which stood out in ethanol and were tolerant to the *killer* toxin (Table 2).

Microvinification tests

Fermentative behavior

The N05 strain obtained the highest values of alcohol degree (15.2 %), fermentative efficiency (90.8 %) and sugar/ethanol conversion (16.3 g sugar/alcohol degree), quite similar values to those achieved by K1, and higher than SR25 (Table 3). The high conversion efficiency obtained by these strains is of interest for red wines produced locally, because of the difficulty to reach the alcohol degrees desired for quality red wines with the sugars accumulated naturally in the region. The results with the reference strain (K1) agree with what is reported on its technical card (ICV K1V-1116), with a conversion of 16.7 g of sugar per alcohol degree and an approximate efficiency of 90 %.

Cuadro 3. Comportamiento fermentativo de las levaduras evaluadas en microvinificación.**Table 3. Fermentative behavior of yeasts evaluated in microvinification.**

Cepa	% Etanol [‡]	Eficiencia fermentativa [‡]	Conversión g azúcar/grado alcohólico	Velocidad de fermentación CO ₂ /48 h
N05	15.22 a	90.8 % a	16.31 a	19.06 ab
K1	14.93 a	89.1 % a	16.67 a	19.16 ab
SR26	14.85 ab	88.6 % ab	16.82 ab	19.22 a
SR19	14.80 ab	88.3 % ab	16.85 ab	19.06 ab
SR27	14.55 ab	86.8 % ab	17.07 ab	18.78 ab
N42	14.54 ab	86.8 % ab	17.09 ab	18.78 ab
OB10	14.37 ab	85.7 % ab	17.30 ab	18.61 b
OB11	14.37 ab	85.7 % ab	17.29 ab	18.72 ab
SR25	13.77 b	82.2 % b	18.17 b	18.94 ab
Valor F	4.5 [†]	4.6 [†]	51.3 [†]	64.7 [†]
DMS	0.012	0.9	1.39	0.54
CV	1.6 [†]	3.3 [†]	9.9 [†]	4.1 [†]

[†]Medias provenientes de dos repeticiones (variedad de *Vitis vinifera*). Letras distintas denotan diferencias significativas ($p \leq 0.05$). [‡]Datos transformados a grados angulares ($\arcsen \sqrt{x}$) y expresados en términos de la variable original. CV: Coeficiente de variación; DMS: Diferencia mínima significativa ♦ Means from two repetitions (*Vitis vinifera* variety). Different letters denote significant differences ($p \leq 0.05$). [‡]Data transformed to angular ($\arcsen \sqrt{x}$) degrees and expressed in terms of the original variable. CV: Coefficient of variation; DMS: Minimum significant difference.

conversión de 16.7 g de azúcar por grado alcohólico y una eficiencia aproximada de 90 %.

Con respecto a la velocidad de fermentación, destaca SR26, contrastando con OB10 ($p \leq 0.05$). Lo deseable en la práctica industrial es una velocidad de fermentación alta, pero se debe tener en cuenta que la producción de compuestos aromáticos es favorecida por fermentaciones lentas (Fleet, 2003), y una fermentación rápida podría ocasionar un aumento excesivo en la temperatura de los tanques fermentadores, una vez que se haya usado volúmenes mayores, lo cual puede producir paros en la fermentación y otras consecuencias indeseables en la producción (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006).

Análisis físicos y químicos de los vinos

La única variable con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) fue la producción de SO_2 (Cuadro 4), donde las cepas con los valores menores fueron SR19 y SR26, lo cual coincide con una tolerancia baja en la prueba de sulfitado. Además, la cepa SR26 ya había destacado por su velocidad durante la fermentación.

En las otras variables, los valores de azúcares residuales variaron de 2.7 a 3.8, lo cual indica que son vinos secos (menores a 5 g L^{-1}) con fermentaciones completas (OIV, 2012b), característica deseable en cualquier levadura fermentativa. La acidez volátil fue de 0.13 a $0.26 \text{ g ácido acético L}^{-1}$, valores muy inferiores al límite máximo legal fijado por la OIV

With regard to the fermentation speed, SR26 stands out compared with OB10 ($p \leq 0.05$). What is desirable for industrial usefulness is a high fermentation speed, but it should be taken into account that the production of aromatic compounds is favored by slow fermentation (Fleet, 2003), and a fast fermentation could cause an excessive increase in the temperature of fermenting tanks, once greater volumes have been used, which could produce halts in the fermentation and other undesirable consequences in production (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006).

Physical and chemical analyses of wines

The only variable with significant difference ($p \leq 0.05$) was SO_2 production (Table 4), where the strains with lowest values were SR19 and SR26, which agrees with the low tolerance in the sulfite addition test. Additionally, the SR26 strain had already stood out from its speed during fermentation.

In the other variables, the residual sugars varied from 2.7 to 3.8, which indicates that they are dry wines (with under 5 g L^{-1}) with complete fermentations (OIV, 2012b), a characteristic desirable in any fermentative yeast. The volatile acidity varied from 0.13 to $0.26 \text{ g acetic acid L}^{-1}$, values that are much lower than the legal maximum limit fixed by the OIV (2012b) for quality wines (less than $1.1 \text{ g acetic acid L}^{-1}$). For the pH (of 3.6 to 3.7) and ATT (of 6.5 to 7.9 g L^{-1} of tartaric acid), the values were

Cuadro 4. Análisis físicos y químicos de los vinos obtenidos por microvinificación de ocho cepas de levaduras nativas y una testigo.

Table 4. Physical and chemical analyses of the wines obtained through microvinification of eight native yeast strains and one control.

Cepas	pH	ATT (g L^{-1} ácido tartárico)	Ácido volátil (g L^{-1} ácido acético)	Azúcar residual (g L^{-1} sacarosa)	SO_2 total (mg L^{-1})
K1	3.71 a	7.7 a	0.23 a	2.7 a	80.0 ab
N42	3.74 a	6.8 a	0.21 a	3.5 a	62.4 ab
N05	3.67 a	7.4 a	0.19 a	2.8 a	62.4 ab
OB10	3.74 a	7.3 a	0.26 a	3.5 a	67.2 ab
OB11	3.69 a	6.7 a	0.24 a	3.5 a	67.2 ab
SR19	3.56 a	8.4 a	0.15 a	2.9 a	25.6 b
SR25	3.65 a	6.5 a	0.15 a	2.7 a	67.2 ab
SR26	3.58 a	7.9 a	0.17 a	2.8 a	36.8 b
SR27	3.68 a	6.6 a	0.13 a	3.8 a	115.2 a
Valor F	2.79 NS	2.79 NS	2.79 NS	1.14 NS	5.72
DMS	0.49	0.7	0.18	1.9	77.9
CV %	2.9	11.1	30.5	16.9	37.6

Medias de dos repeticiones (variedad de *Vitis vinifera*). Letras distintas denotan diferencias significativas ($p \leq 0.05$) ♦ Means of two repetitions (*Vitis vinifera* variety). Different letters show significant differences ($p \leq 0.05$).

(2012b) para vinos de calidad (menor a 1.1 g ácido acético L⁻¹). Para el pH (de 3.6 a 3.7) y ATT (de 6.5 a 7.9 g L⁻¹ de ácido tartárico), los valores estuvieron dentro de los rangos normales, pero es deseable que para vinos tintos los valores de ATT estén alrededor de 4 g L⁻¹ de ácido tartárico (Jackson, 2008). Esto podría lograrse induciendo una fermentación maloláctica, la cual disminuye la ATT en los vinos y mejora sus aspectos sensoriales (Lonvaud-Funel, 1999).

Identificación de las levaduras

En el Cuadro 5 se muestra el nombre de la cepa aislada, la especie a la que pertenece y la cepa referida (NCBI) con la cual se obtuvieron las otras variables de identificación. Los valores de cero para el e-valor, los porcentajes cercanos a 100 en identificación y cobertura de consulta indican lo certero y confiable que fue el proceso de alineación para identificar las cepas. En siete de los ocho casos los valores fueron óptimos, y para la cepa SR27 la cobertura de consulta fue baja, la cual indica el porcentaje de secuencia usado para la alineación de la cepa, es decir 29 % de la secuencia introducida no fue utilizada para la alineación, lo cual se debe a que el dominio amplificado en esta cepa tiene pares de bases que no coinciden con las de las cepas reportadas en la base de datos.

Respecto a las especies, resaltan aquellas que además de presentar tolerancia a los compuestos probados (etanol, SO₂, toxina *killer*), tuvieron características destacables durante las microvinificaciones, como N05 en su comportamiento fermentativo, o SR19 y SR26 por su baja producción de SO₂, pertenecientes a la especie *S. cerevisiae*, lo cual era esperado por ser la que tiene más reportes y es la más usada para procesos fermentativos y producción de etanol (Pretorius,

within the normal ranges, but it is desirable for the ATT values to be around 4 g L⁻¹ of tartaric acid for red wines (Jackson, 2008). This could be achieved by inducing a malolactic fermentation, which decreases the ATT in wines and improves their sensory aspects (Lonvaud-Funel, 1999).

Identification of yeasts

Table 5 shows the name of the isolated strain, the species it belongs to, and the strain referenced (NCBI) with which the other identification variables were obtained. The zero values for the e-value, the percentages close to 100 in identification, and the consultation coverage indicate how accurate and reliable the aligning process was to identify the strains. In seven of the eight cases the values were optimal, and for the SR27 strain the consultation coverage was low, indicating the percentage of sequence used for aligning the strain, that is 29 % of the sequence introduced was not used for the alignment, which is because the amplified dominion in this strain has base pairs that do not coincide with those of the strains reported in the database.

With regard to these species, those that in addition to presenting tolerance to the compounds tested (ethanol, SO₂, *killer* toxin) had noteworthy characteristics during the microvinifications, stood out, such as N05 in its fermentative behavior, or SR19 and SR26 because of their low SO₂ production, belonging to the *S. cerevisiae* species, which was expected because it is the one that has the most reports and is the one most frequently used for fermentative and ethanol production processes (Pretorius, 2000; Mas *et al.*, 2002). Also, it is novel that four of the eight strains identified belong to the *S. paradoxus*

Cuadro 5. Identificación y confiabilidad obtenida para las ocho cepas de levaduras.

Table 5. Identification and reliability obtained for the eight yeast strains.

Cepa	Especie	No. de acceso (NCBI)	e-valor	Porcentaje de identificación	Cobertura de consulta
N05	<i>S. cerevisiae</i>	GU080046.1	0	99 %	99 %
SR26	<i>S. cerevisiae</i>	GU080048.1	0	99 %	99 %
SR19	<i>S. cerevisiae</i>	HM101472.1	0	99 %	99 %
OB10	<i>S. paradoxus</i>	JF916455.1	0	99 %	98 %
OB11	<i>S. paradoxus</i>	EU669466.1	0	99 %	99 %
SR25	<i>S. paradoxus</i>	BR000309.1	0	99 %	98 %
N42	<i>S. paradoxus</i>	EU145758.1	0	98 %	98 %
SR27	<i>S. cerevisiae</i>	HM101473.1	0	96 %	71 %

2000; Mas *et al.*, 2002). Además, es novedoso que cuatro de las ocho cepas identificadas pertenezcan a la especie *S. paradoxus*, la cual se presenta en campo pero no es reconocida su participación durante la vinificación, aunque está reportada por sus características enológicas deseables (Orlic *et al.*, 2007; Orlic *et al.*, 2009).

Finalmente, respecto al origen de los microorganismos, tres cepas seleccionadas provinieron de la finca El Barreno (OB10, OB11 y N42) y fueron identificadas como *S. paradoxus*. Las otras cinco cepas identificadas provinieron de la finca El Rosario; cuatro de ellas (N05, SR26, SR 19 y SR27) corresponden a *S. cerevisiae* y una más a *S. paradoxus* (SR25).

CONCLUSIONES

Sólo 26 % de las levaduras aisladas pertenecieron al género *Saccharomyces* y dentro de éstas se seleccionaron ocho cepas (SR19, SR25, SR26, SR27, OB10, OB11, N42 y N05). La cepa nativa N05 produjo el mayor grado alcohólico, eficiencia de fermentación y conversión azúcar-etanol, comparable con el de la cepa comercial K1. Los valores de pH, ATT, AV y azúcares residuales obtenidos en las microvinificaciones de las ocho cepas evaluadas están dentro de los intervalos normales y dentro de los límites establecidos por los organismos reguladores de la calidad en vinos. La técnica de amplificación mediante PCR del dominio D1/D2 y su secuenciación permitió una identificación confiable de los microorganismos estudiados.

LITERATURA CITADA

AVQ (Asociación de vitivinicultores de Querétaro) 2011. Estudio de impacto productivo de un viñedo. Estado de Querétaro. Querétaro, México. 111 p.

Bevan, E. A., and M. Makower 1963. The physiological bases of the killer character in yeasts. *In: Proceedings of the XI International Congress of Genetics*. Delft, The Netherlands 1: 202-203.

Cano, J., J. Guarro, and J. Gené 2004. Molecular and morphological identification of *Colletotrichum* species of clinical interest. *J. Clin. Microbiol.* 42: 2450-2454.

CEE (Comunidad Económica Europea) 1990. Analyses des mouts et des vins. Office des Publications Officielles des Communautés Européennes. Paris, France. 192 p.

Charters, S., and S. Pettigrew 2007. The dimensions of wine quality. *Food Qual. Prefer.* 18: 997-1007.

De la Cruz, M. A., R. Á. Martínez-Peniche, A. E. Becerril-Román, y M. S. Chávaro-Ortiz, 2012. Caracterización física

species, which are found in the field although their participation is not recognized during vinification, even if it is reported because of its desirable wine-producing characteristics (Orlic *et al.*, 2007; Orlic *et al.*, 2009).

Finally, regarding the origin of the microorganisms, three strains selected came from the El Barreno farm (OB10, OB11 and N42) and were identified as *S. paradoxus*. The other five strains identified came from the El Rosario farm; four of them (N05, SR26, SR19 and SR27) correspond to *S. cerevisiae* and one more to *S. paradoxus* (SR25).

CONCLUSIONS

Only 26 % of the yeasts isolated belonged to the *Saccharomyces* genus and among them eight strains were selected (SR19, SR25, SR26, SR27, OB10, OB11, N42 and N05). The native N05 strain produced the highest alcohol degree, fermentation efficiency and sugar-ethanol conversion, comparable to the commercial K1 strain. The values of pH, ATT, VA and residual sugars obtained in the microvinifications of the eight strains evaluated are within the normal intervals and inside the limits established by the organisms that regulate wine quality. The technique of PCR amplification of the D1/D2 dominion and its sequencing allowed a reliable identification of the microorganisms studied.

—End of the English version—



y química de vinos producidos en Querétaro. *Rev. Fitotec. Mex.* 35: 61-67.

Estevan, M. C. 2013. El mercado del vino en México, estudios de mercado. Exportaciones e inversión. Oficina económica y comercial de la embajada de España en México. D.F. México, 60 p.

Fleet, G. H. 2003. Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 86: 11-22.

García, B. J. 1976. Metodología de Análisis de Vinos y Derivados. Ed. Sepsa. Vilafranca del Penedés. España. 92 p.

Guamán, C., y J. Carbajal 2009. Caracterización e identificación de aislados de levaduras carotenogénicas de varias zonas naturales del Ecuador. *Universitas Scientiarum* 14: 187-197.

Gutiérrez V., A. R., M. P. Santamaría A., R. M. López M., y M. J. Sevilla 1995. Selección de levaduras vínicas en la denominación de Origen Calificada Rioja. *ZUBÍA Monográfico* 7: 103-111.

Hidalgo, P., y K. Fernández 2005. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* CECT 11774 y CECT 11775 y su empleo en

- la elaboración, por fermentación alcohólica, de bebidas alcohólicas y otros productos alimenticios. Solicitud de patente. Oficina Española de Patente y Marcas. ES 2 222 088 A1. Madrid, España. 9 p.
- Izgü F., D. Altinbay, and T. Acun 2006. Killer toxin of *Pichia anomala* NCYC 432; purification, characterization and its exo- β -1,3-glucanase activity. *Enzyme Microb. Tech.* 39: 669-676.
- Jackson, R. 2008. *Wine Science Principles and Applications. Postfermentation Treatments and Related Topics.* Elsevier. London, UK. 419 p.
- Jacobs C. J., I., Fourie, and H. J. J. van Vuuren 1991. Characterization of killer yeast isolates from Chenin blanc grapes and grape skins. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 12: 57-63.
- Jolly, N. P., O. P. H. Augustyn, and I. S. Pretorius 2003. The occurrence of Non-*Saccharomyces cerevisiae* yeast species over three vintages in four vineyards and grape must from four production regions of the Western Cape, South Africa. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 24: 35-42.
- Lonvaud-Funel, A. 1999. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie van Leeuw* 76: 317-331.
- Lopes, C. A., M. E. Rodríguez, M. Sangorri, A. Querol, and A. C. Caballero 2007. Patagonian wines: The selection of an indigenous yeast starter. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34: 539-546.
- Manginot, C., J. Roustan, and J. Sablayrolles 1998. Nitrogen demand of different yeast strains during alcoholic fermentation. Importance of stationary phase. *Enzyme Microbiol. Tech.* 23: 511-517.
- Marquina, D., A. Santos, and J. M. Peinado 2002. Biology of killer yeasts. *Int. Microbiol.* 5: 65-71.
- Mas, A., J. Torija, G. Beltrán, M. Novo, N. Hierro, M. Poblet, N. Rozés, y J. Guillamón 2002. Selección de levaduras. *Tecnología del vino, Fermentos* 1: 39-44.
- Medina, K., L. Ferreri, L. Fariña, E. Boido, E. Dellacassa, C. Gaggero, y F. Carrau 2007. Aplicación de la levadura *Hanseniaspora vineae* en cultivos mixtos con *Saccharomyces cerevisiae* en la vinificación. *Enología* 6: 1-6.
- Mercado, L., A. Dalcero, R. Masuelli, and M. Combina 2007. Diversity of *Saccharomyces* strains on grapes and winery surfaces: analysis of their contribution to fermentative flora of Malbec wine from Mendoza (Argentina) during two consecutive years. *Food Microbiol.* 24: 403-412.
- Métris, A., S. M. George, and J. Baranyi 2006. Use of optical density detection times to assess the effect of acetic acid on single-cell kinetics. *Appl. Microbiol. Environ.* 72: 6674-6679.
- OIV (Organización internacional de la vid y el vino). 2009. Compendium of international methods of analysis-OIV, reducing substances (OIV-OENO 377-2009). OIV. París, Francia. 5 p.
- OIV (Organización internacional de la vid y el vino) 2012a. Directrices para la caracterización de levaduras de vino del género *Saccharomyces* aisladas de ambientes vitivinícolas (OIV-OENO 370-2012). Organización internacional de la vid y el vino. París, Francia. 30 p.
- OIV (Organización internacional de la vid y el vino) 2012b. International standard for labeling of wine. Organización internacional de la vid y el vino. París, Francia. 14 p.
- Orlic, S., S. Radzepovic, A. Jeromel, S. Herjavec, and L. Iacumin 2007. Influence of indigenous *Saccharomyces paradoxus* strains on Chardonnay wine fermentation aroma. *Int. J. Food Sci. Tech.* 42: 95-101.
- Orlic, S., F. N. Arrollo-Lopez, K. Huic-Babic, I. Lucilla, A. Querol, and E. Barrio 2009. A comparative study of the wine fermentation performance of *Saccharomyces paradoxus* under different nitrogen concentrations and glucose/fructose ratios. *J. Appl. Microbiol.* 108: 73-80.
- Pasteur L. 1857. Mémoire sur la fermentation alcoolique. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences.* 45: 1032-1036.
- Pretorius, I. S. 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16: 675-729.
- Rainieri, S., and I. Pretorius 2000. Selection and improvement of wine yeast. *Ann. Microbiol.* 50: 15-31.
- Ramos, C. L., W. Ferreira, A. L. Freire, D. R. Dias, E. C. Araújo, and R. F. Schwan 2013. Evaluation of stress tolerance and fermentative behavior of indigenous *Saccharomyces cerevisiae*. *Braz. J. Microbiol.* 44: 935-944.
- Ribereau-Gayon, P., D. Dubordieu, B. Donéche, and Lonvaud 2006. *Handbook of Enology. Vol. 1. The Microbiology of Wine and Vinifications.* 2nd ed. John Wiley and Sons, Ltd. Bordeaux, France. 497 p.
- Rodríguez, L. A., D. Abad, J. Gómez, J.B. Casanova, y C. Lema 1998. Fenotipo killer. Distribución en la Comarca de la Ribiera Sacra en las poblaciones de *Saccharomyces cerevisiae*. *Ciencia Tecnol. Aliment.* 2: 33-37.
- Santamaría, P., R. López, E. López, P. Garijo, and A. Gutiérrez 2008. Permanence of yeast inocula in the winery ecosystem and presence in spontaneous fermentations. *Eur. J. Food Res. Tec.* 227: 1563-1567.
- Serjeant, K., R. Tang, N. Anfang, J. R. Beggs, and M. R. Goddard 2008. Yeasts associated with the New Zealand nothofagus honeydew system. *NZ J. Ecol.* 32: 209-213.
- Silva, G. A., T. L. Bernardi, P. D. Carvalho S., M. Menegotto, and P. Valente 2012. Rapid yeast DNA extraction by boiling and freezing-thawing without using chemical reagents and DNA purification. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 55: 319-327.
- Swiegers, J. H., I. L. Francis, M. J. Herderich, and I. S. Pretorius 2006. Meeting the consumer expectations through management in vineyard and winery the choice of yeast for fermentation offers a great potential to adjust the aroma of Sauvignon Blanc wine. *Wine Ind. J.* 21: 34-42.
- Togores, J. H. 2006. *La Calidad del Vino desde el Viñedo.* Ed. Mundi-Prensa Libros. Barcelona, España. 390 p.
- Torija, M. J., G. Beltran, M. Novo, M. Poblet, J. Guillamón, A. Mas, and N. Rozés 2003. Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. *Int. J. Food Microbiol.* 85: 127-136.
- Viana, F., J.V. Gil, S. Genovés, S. Vallés, and P. Manzanares 2008. Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. *Food Microbiol.* 25: 778-785.