

Enological potential of native non-*Saccharomyces* yeasts from vineyards established in Queretaro, Mexico

Potencial enológico de levaduras no-*Saccharomyces* nativas de viñedos establecidos en Querétaro, México

Eunice Ortiz-Barrera; Dalia Elizabeth Miranda-Castilleja; Sofía María Arvizu-Medrano; Juan Ramiro Pacheco-Aguilar; Jesús Alejandro Aldrete-Tapia; Montserrat Hernández-Iturriaga; Ramón Álar Martínez-Peniche*

¹División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro. Centro Universitario s/n, colonia las Campanas, Querétaro, C.P. 76010, MÉXICO.

Correo-e: alvar@uaq.mx, tel. y fax: +52 442 19 21 304 (*Autor para correspondencia).

Abstract

Currently, the state of Queretaro is a major wine producer in Mexico; however, marketing these wines is difficult due to their lack of quality and typicity, factors in which wine yeasts play an essential role. *Saccharomyces* are responsible for ethanol production and non-*Saccharomyces* (nS) can provide metabolites that enhance wine quality, so their use in mixed cultures is of great interest. In this study, yeasts isolated from the spontaneous fermentation of grape musts from three local vineyards were differentiated as nS in lysine medium. Their β -glucosidase activity and SO_2 (30 mg·L⁻¹) and ethanol (6 %) tolerances were evaluated. Outstanding yeasts were tested in mixed microvinifications along with *S. cerevisiae* (K1-V1116) and identified through analysis of the 26S gene. Of 197 isolated strains, 146 were differentiated as nS; 90 showed β glucosidase activity and eight (NB1, NA4, NB27, NB31, NB39, NR77, NR90, NB108) were selected based on tolerance tests, being identified as belonging to the genus *Hanseniaspora*. The nS did not interfere with the fermentative activity of K1-V1116, finding no differences in the parameters evaluated between the wines obtained by mixed cultures and the control (K1-V1116). The values obtained for pH, total acidity, volatile acidity and alcohol were considered to be of acceptable quality for dry wines. The strain NB39 stood out for its glycerol production, obtaining the highest value (7.45 g·L⁻¹). We conclude that there are nS yeast strains in the region with enological potential to be used at a commercial level.

Keywords: native strains, typicity, β -glucosidase, *Hanseniaspora*, microvinification, mixed cultures.

Resumen

Actualmente el estado de Querétaro es un importante productor de vinos en México; sin embargo, éstos difícilmente se comercializan debido a su falta de calidad y tipicidad, factores en que las levaduras vínicas juegan un papel esencial. Las *Saccharomyces* son responsables de la producción de etanol y las no-*Saccharomyces* (nS) pueden aportar metabolitos que mejoren la calidad, por lo que su uso en inóculos mixtos es de gran interés. En este estudio, levaduras aisladas de la fermentación espontánea de mostos de uva de tres viñedos queretanos se diferenciaron como nS en medio-lisina. Se evaluó su actividad β -glucosidasa, su tolerancia a SO_2 (30 mg·L⁻¹) y a etanol (6 %). Aquellas sobresalientes se probaron en microvinificaciones mixtas con *Saccharomyces cerevisiae* (K1-V1116) y se identificaron mediante el análisis del gen 26S. De 197 cepas aisladas, 146 resultaron nS; 90 presentaron actividad β glucosidasa y ocho (NB1, NA4, NB27, NB31, NB39, NR77, NR90, NB108) se seleccionaron con base en los ensayos de tolerancia, identificándose como pertenecientes al género *Hanseniaspora*. Las nS no interfirieron en la actividad fermentativa de K1-V1116; ya que no se encontraron diferencias en las variables evaluadas entre los vinos elaborados con cultivos mixtos y el control (K1-V1116). Se obtuvieron valores de pH, acidez total, acidez volátil y alcohol, considerados de calidad aceptable para vinos secos. La cepa NB39 destacó en su producción de glicerol obteniendo el mayor valor (7.45 g·L⁻¹). Se concluye que en la región existen cepas de levaduras nS con potencial enológico para ser utilizadas a nivel comercial.

Palabras clave: cepas nativas, tipicidad, β -glucosidasa, *Hanseniaspora*, microvinificación, cultivos mixtos.



Introduction

The state of Queretaro occupies 2nd place in wine production in Mexico, with vineyards established on an estimated 212 h (de la Cruz, Martínez, Becerril, & Chávaro, 2012). Currently, producers are making significant efforts to increase vineyard area and improve wine quality.

Wine quality is based on sensory attributes conferred by consumers, so it is a complex and difficult concept to objectively define (Charters & Pettingrew, 2007). However, these attributes are due to the chemical compounds present and their proportions; some of these compounds are regulated, or have recommendations and classifications, depending on the amount in which they are found (International Organisation of Vine and Wine [OIV], 2015). In turn, wine composition is determined by many factors, including the variety of grape used, environmental and growing conditions, and the microorganisms present from the fruit to the fermentative processes, among others (Fleet, 2003).

Wine making is based on alcoholic fermentation, an anaerobic phenomenon mainly conducted by yeasts, which are often divided into two groups: *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* (nS) (Pérez et al., 2011). The latter mainly includes the genera *Candida*, *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Zygosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora*, *Brettanomyces*, *Saccharomycodes*, *Pichia* and *Williopsis*. Because of their low tolerance to ethanol, they prevail mainly in grapes and recently-processed must, while *S. cerevisiae* predominates in advanced stages of fermentation (Raynal et al., 2011).

The contribution of nS yeasts to wine quality can take various forms. Production of glycerol by *Candida stellata* and esters by *C. pulcherrima* has been reported (Jolly, Augustyn, & Pretorius, 2003). Other nS yeasts are also widely recognized for producing glucosidase enzymes (Zironi, Romano, Suzzi, Battistutta, & Comi, 1993), which, by hydrolyzing such bonds, are capable of releasing volatile compounds linked to sugars, giving greater complexity to the wine's aromatic profile (Arévalo, Úbeda, Cordero, & Briones, 2005). Conversely, others such as *Kloeckera apiculata* are associated with the production of acetic acid, which lowers wine quality (Ocón et al., 2010). Because nS yeasts are not efficient in converting sugars to ethanol, applying them for oenological purposes is usually done in mixed cultures with *Saccharomyces*, so that the latter is the one which performs the fermentative process and the nS contribute positively to the sensory profile (Comitini et al., 2011). Therefore, to determine the potential of nS yeasts to be used in the wine industry, it is necessary to check that their activity in mixed culture does not affect the development of *Saccharomyces*, or produce compounds that may harm wine quality.

Introducción

El estado de Querétaro ocupa el 2° lugar en producción de vino en México, estimándose la superficie establecida con viñedos en 212 ha (de la Cruz, Martínez, Becerril, & Chávaro, 2012). Actualmente, los productores realizan importantes esfuerzos para incrementar la superficie vitícola y mejorar la calidad de los vinos.

La calidad de los vinos se basa en aptitudes sensoriales atribuidas por sus consumidores, por lo que es un concepto complejo y difícil de definir objetivamente (Charters & Pettingrew, 2007). No obstante, dichos atributos se deben a los compuestos químicos presentes y sus proporciones; algunos de estos compuestos están regulados, o cuentan con recomendaciones y clasificaciones, según la cantidad en la que se encuentren (Organización internacional de la vid y el vino [OIV], 2015). A su vez, la composición del vino está determinada por gran cantidad de factores, incluyendo la variedad de uva empleada, las condiciones ecológicas y de cultivo, así como los microorganismos presentes desde el fruto hasta los procesos fermentativos, entre otros (Fleet, 2003).

La elaboración del vino se basa en la fermentación alcohólica, fenómeno anaeróbico producido fundamentalmente por levaduras, las cuales suelen dividirse en dos grupos: el de las *Saccharomyces* y el de no-*Saccharomyces* (nS) (Pérez et al., 2011). Estas últimas incluyen principalmente a los géneros *Candida*, *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Zygosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora*, *Brettanomyces*, *Saccharomycodes*, *Pichia* y *Williopsis*. Debido a su poca tolerancia al etanol, éstas prevalecen principalmente en las uvas y en el mosto recién procesado; mientras que, en etapas avanzadas de la fermentación predomina *S. cerevisiae* (Raynal et al., 2011).

La contribución de las nS a la calidad del vino puede ser de diversas formas. Se ha reportado la producción de glicerol por *Candida stellata*, y de ésteres por *C. pulcherrima* (Jolly, Augustyn, & Pretorius, 2003). Otras son, también, ampliamente reconocidas por producir enzimas glucosidasas (Zironi, Romano, Suzzi, Battistutta, & Comi, 1993); las cuales, al hidrolizar este tipo de enlaces, son capaces de liberar compuestos volátiles ligados a azúcares, dando mayor complejidad al perfil aromático del vino (Arévalo, Úbeda, Cordero, & Briones, 2005). Por el contrario, otras como *Kloeckera apiculata* están asociadas a la producción de ácido acético, que disminuye la calidad del vino (Ocón et al., 2010). Debido a que las levaduras nS no son eficientes en la conversión de azúcares a etanol, la aplicación de éstas con fines enológicos suele llevarse a cabo en cultivos mixtos con *Saccharomyces*, para que esta última sea quien realice el proceso fermentativo y las nS contribuyan positivamente al perfil sensorial (Comitini et al., 2011). Por lo tanto, para determinar el potencial

Spontaneous wine fermentations carry a high risk of deterioration, but they are usually rewarded with better texture and integration of the flavors in the wine, as compared to those inoculated with commercial strains. In addition, it is recognized that native strains may be better suited to the musts of a particular region, and that they can improve the sensory profile of the wines, giving them unique characteristics which highlight their typicity (Romano, Fiore, Paraggino, Caruso, & Capece, 2003).

The predominance of *S. cerevisiae*, along with a notable growth rate of native nS yeasts during the first days of fermentation, can contribute significantly to the aromatic properties of wines; therefore, adding nS yeasts to a starter culture with *S. cerevisiae* is an original strategy to improve wine quality (Raynal et al., 2011).

In the Mexican wine industry, the yeasts used to inoculate musts are imported, implying technological dependence and capital flight. Mexico apparently does not have any studies related to the selection of native enological yeasts, so the aim of this work was to isolate and evaluate the enological potential of native nS strains selected in the wine region of Querétaro.

Materials and methods

Experimental site and biological material

Fruits of grape (*Vitis vinifera*) cvs 'Cabernet Franc,' 'Syrah,' 'Merlot' and 'Cabernet Sauvignon' obtained from three commercial vineyards established in the state of Querétaro were used: "El Rosario" (municipality of El Marqués), "El Barreno" (municipality of San Juan del Río) and "Viñedos Azteca" (municipality of Ezequiel Montes). In addition, yeasts isolated from these fruits were used, and *Saccharomyces cerevisiae* K1-V1116 (Lallemand, Ontario, Canada) was utilized as a reference strain.

Isolation and differentiation of yeasts

Grapes were collected at technological maturity, based on sugar content (average 20 °Bx). A random sampling of clusters using three rows of plants per variety was performed, without discriminating on the basis of health status and taking about 1 kg of grapes per cultivar in each vineyard.

The yeasts were obtained from spontaneous fermentation of the previously collected fruits, without addition of sulfur dioxide (SO₂). Aliquots of the fermenting must were taken every 48 hours and decimal dilutions were made from which 0.1-mL samples were taken; they were placed in Petri dishes with potato dextrose agar (PDA), supplemented with rose bengal (60 µg·mL⁻¹) and ampicillin (100 µg·mL⁻¹), and incubated at 25 °C for three days. The colonies grown

de levaduras nS, para ser utilizadas en la industria vinícola, es necesario verificar que su actividad, en cultivo mixto, no afecte el desarrollo de *Saccharomyces*, ni produzcan compuestos que perjudiquen la calidad de los vinos.

Las fermentaciones espontáneas de vino conllevan alto riesgo de deterioro, pero son generalmente recompensadas con mejor textura e integración de los sabores en el vino, en comparación con aquellos inoculados con cepas comerciales. Además, se reconoce que las cepas nativas pueden estar mejor adaptadas a los mostos de una región en particular, y que pueden mejorar el perfil sensorial de los vinos dándoles características únicas, que destaquen su tipicidad (Romano, Fiore, Paraggino, Caruso, & Capece, 2003).

La predominancia de *S. cerevisiae*, junto con la tasa de crecimiento notable de levaduras nS nativas durante los primeros días de la fermentación, puede contribuir significativamente a las propiedades aromáticas de los vinos; por lo que la adición de levaduras nS a un cultivo iniciador con *S. cerevisiae* constituye una estrategia original para mejorar la calidad del vino (Raynal et al., 2011).

En la industria vinícola mexicana, las levaduras utilizadas para inocular los mostos provienen de importación, lo que implica dependencia tecnológica y fuga de divisas. Aparentemente en México no se cuenta con estudios relacionados con la selección de levaduras nativas enológicas, por lo que el objetivo de este trabajo fue aislar y evaluar el potencial enológico de cepas nS nativas seleccionadas en la región vitivinícola de Querétaro.

Materiales y métodos

Sitio experimental y material biológico

Se utilizaron frutos de vid (*Vitis vinifera*) cvs 'Cabernet Franc,' 'Syrah,' 'Merlot' y 'Cabernet Sauvignon' obtenidos de tres viñedos comerciales establecidos en el estado de Querétaro: "El Rosario" (municipio de El Marqués), "El Barreno" (municipio de San Juan del Río) y "Viñedos Azteca", (municipio de Ezequiel Montes). Asimismo se utilizaron levaduras aisladas de esos frutos y, como cepa de referencia, se empleó *Saccharomyces cerevisiae* K1-V1116 (Lallemand. Ontario, Canadá).

Aislamiento y diferenciación de las levaduras

Se recolectaron uvas en su madurez tecnológica, basándose en el contenido de azúcares (en promedio 20 °Bx). Se realizó un muestreo aleatorio de los racimos utilizando tres hileras de plantas por variedad, sin discriminar la condición sanitaria y tomando, aproximadamente, 1 kg de uva por cada cultivar en cada viñedo.

in the dishes were isolated based on their morphology by transferring them to nutrient yeast dextrose agar (NYDA) plates, supplemented with ampicillin solution (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ medium) (Sandoval-Chávez, Martínez-Peniche, Hernández-Iturriaga, Fernández-Escartín, Arvizu-Medrano, & Soto-Martínez, 2011).

Differentiation of the nS yeasts was performed by incubating all the isolated yeasts in lysine medium (Oxoid, Hampshire, UK) at 25 °C for four days, considering as nS positive those capable of developing after two consecutive reseeds (Jolly et al., 2003).

Determination of β -glucosidase activity

Then 10 μL of a yeast inoculum, previously cultured (48 h at 25 °C) on nutrient yeast dextrose broth (NYDB), were placed, dropwise, on esculin-glycerol agar (EGA) medium with pH adjusted to 6.0, which was incubated at 25 °C for three days. The strains were considered positive for β -glucosidase activity when, around the colony, there were color changes in the medium towards brown (Pérez et al., 2011).

Ethanol tolerance and sulfur dioxide

Yeast population dynamics was determined using an automated turbidimetric analyzer (Bioscreen® C), in which the different strains were inoculated in the individual wells of the plate (1 x 10⁵ CFU) containing YPD (yeast-peptone-dextrose adjusted to pH 3.5 and 20 °Bx) liquid medium, and incubated at 25 °C for 72 h. To determine ethanol tolerance, 6 % of this compound was added into the medium, while in the case of SO₂, 30 mg of total SO₂ were added per liter. The evaluated parameter was the detection time of the yeasts using the optical density (OD) measurement at a wavelength of 600 nm.

Yeast identification

Strains selected from the tolerance tests were identified using polymerase chain reaction (PCR), amplifying the D1/D2 domain of the gene encoding the subunit 26S rRNA, followed by sequencing. Extraction of genomic DNA was performed by taking 1 mL of yeast culture (in the period from 24-48 h), whose cells were lysed by the standard heat method (95 °C for 10 min), followed by purification using the phenol-chloroform technique. For amplification of the D1/D2 domain, the primers NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAC-3') and NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') were used under the following conditions (Cano, Guarro, & Gené, 2004): 2 min at 95 °C, 35 cycles (30 s at 95 °C, 1 min at 56.75 °C and 1 min at 72 °C) and 10 min at 72 °C. For sequencing, the amplified fragments were sent to the Synthesis and Sequencing Unit of the Institute of Biotechnology at the National Autonomous University of Mexico

Las levaduras se obtuvieron de la fermentación espontánea de los frutos previamente recolectados, sin adición de anhídrido sulfuroso (SO₂). Se tomaron alícuotas del mosto en fermentación cada 48 horas y se realizaron diluciones decimales de las cuales se tomaron 0.1 mL de muestra; éstas se colocaron en cajas Petri con agar papa dextrosa (APD), adicionado con rosa de bengala (60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y ampicilina (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); incubándose a 25 °C durante tres días. Las colonias desarrolladas en las cajas se aislaron con base en su morfología mediante transferencia a placas de agar nutritivo-dextrosa para levaduras (NYDA), adicionado con solución de ampicilina (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de medio) (Sandoval-Chávez, Martínez-Peniche, Hernández-Iturriaga, Fernández-Escartín, Arvizu-Medrano, & Soto-Martínez, 2011).

La diferenciación de las levaduras nS se realizó incubando todas las cepas aisladas en medio lisina (Oxoid, Hampshire, UK) a 25 °C durante cuatro días, considerando como nS positivas aquellas capaces que desarrollaron después de dos resiembra consecutivas (Jolly et al., 2003).

Determinación de la actividad β -glucosidasa

De un inóculo de levadura, previamente cultivado (48 h a 25 °C) en caldo nutritivo-dextrosa para levaduras (NYDB), se colocaron, en forma de gota, 10 μL sobre medio agar esculina-glicerol (EGA) con pH ajustado a 6.0, el cual se incubó a 25 °C durante tres días. Las cepas fueron consideradas como positivas para la actividad β -glucosidasa cuando, alrededor de la colonia, presentaron cambios de color del medio hacia el marrón (Pérez et al., 2011).

Tolerancia a etanol y anhídrido sulfuroso

Se llevó a cabo una dinámica poblacional de levaduras en el analizador turbidimétrico automatizado (Bioscreen® C); en el cual, las distintas cepas fueron inoculadas en las fosas individuales de placas (1 x 10⁵ UFC) que contenían medio líquido YPD (levadura-peptona-dextrosa ajustado a pH 3.5 y 20 °Bx), e incubadas a 25 °C, durante 72 h. Para determinar la tolerancia a etanol, se agregó en el medio 6 % de este compuesto; mientras que para el caso del SO₂ se agregaron 30 mg de SO₂ total por litro. La variable evaluada fue el tiempo de detección de las levaduras utilizando la medición de la densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 600 nm.

Identificación de las levaduras

Las cepas seleccionadas a partir de las pruebas de tolerancia se identificaron haciendo uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificando el dominio D1/D2 del gen que codifica la subunidad 26S del ARNr,

(UNAM). With the data received, homology was sought with the sequences reported in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database using the Blast program (Aldrete-Tapia, Escobar-Ramírez, Tamplin, & Hernández-Iturriaga, 2014).

Microvinification trials

Microvinification trials were conducted in 1 L flasks containing 700 mL of must from healthy grapes harvested in 2012 at technological maturity, which was based on the sugar/acid ratio of the varieties 'Cabernet Sauvignon' and 'Merlot' (maturation indices: 26 and 30 g sugar/g tartaric acid, respectively). A randomized block experimental design, considering the varieties as replications, was used. Prior to inoculation, the must was thermovinified (60 °C for 20 min, reaching 20 °C in less than 5 min) (Ribéreau-Gayon, Dubordieu, Donèche, & Lonvaud, 2006) and adjusted to a pH of 3.5 and 21°Bx. In each of the flasks, and for each cultivar, 3×10^6 CFU·mL⁻¹ of the nS strain to analyze were inoculated, and an hour later 1×10^6 CFU·mL⁻¹ of the yeast *Saccharomyces* K1-V1116. The flasks were incubated at 25 °C for 10 days, during which time plate counts were performed using NYDA (*Saccharomyces*) and lysine (nS) media, and follow-up was given to the fermentation by determining the density, which was calculated by measuring the weight of the liquid within the flask (subtracting the weight of the flask measured prior to filling it) and its corresponding volume for each sampling (subtracting the milliliters used in the sampling).

To determine the overall quality of the wines obtained, the following determinations were made: a) pH, by means of a Conductronic-brand potentiometer; b) total soluble solids (TSS, °Bx), using an ATAGO-brand manual refractometer (range of 0 - 32 °Bx); c) alcoholic strength, by direct distillation and pycnometry; d) Total titratable acidity (TTA), by titration with 0.1 N sodium hydroxide (NaOH), reported in g·L⁻¹ tartaric acid; e) volatile acidity (García-Tena method); f) residual sugars (Fehling Causse Bonnans) and g) glycerol (spectrophotometry).

Data analysis

For the microvinification trials, a randomized block design with nine treatments (eight yeast strains + one reference) and two replications (grape cultivars) was used. With the data obtained from the physical and chemical variables, analysis of variance and Tukey's test ($P \leq 0.05$) were performed using JMP 9.0 statistical software.

Results and discussion

Isolation and differentiation

A total of 198 yeasts were isolated, with the "El Barreno" ranch having a greater number (106) compared to "El Rosario" (71) and "Viñedos Azteca" (21), which may be

seguido de su secuenciación. La extracción del ADN genómico se realizó tomando 1 mL de cultivo de levadura de 24 a 48 h, cuyas células se lisaron mediante el método estándar con calor (95 °C por 10 min), seguido de una purificación mediante la técnica de Fenol-Cloroformo. Para la amplificación del dominio D1/D2, se emplearon los iniciadores NL1 (5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAC-3') y NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') utilizando las siguientes condiciones (Cano, Guarro, & Gené, 2004): 2 min a 95 °C, 35 ciclos (30 s a 95 °C, 1 min a 56.75 °C y 1 min a 72 °C) y 10 min a 72 °C. Para la secuenciación, los fragmentos amplificados se enviaron a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), y con los datos recibidos se buscó homología con las secuencias reportadas en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, por sus siglas en inglés) mediante el programa Blast (Aldrete-Tapia, Escobar-Ramírez, Tamplin, & Hernández-Iturriaga, 2014).

Ensayos de microvinificación

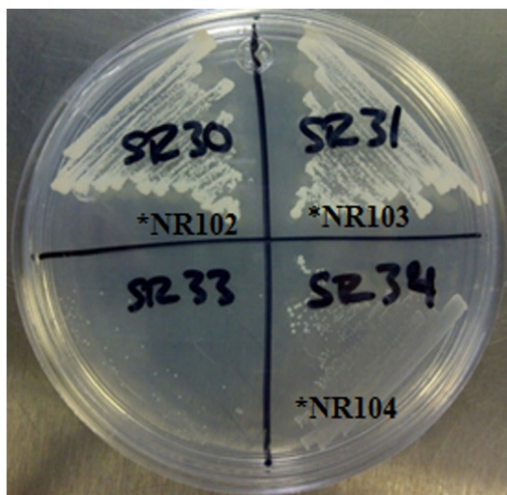
Se realizaron en matraces de 1 L conteniendo 700 mL de mosto de uvas sanas de la cosecha 2012, en su madurez tecnológica; lo anterior basándose en la relación azúcares/acidez de las variedades 'Cabernet Sauvignon' y 'Merlot' (índices de maduración: 26 y 30 g azúcar por g ácido tartárico, respectivamente) utilizando un diseño experimental de bloques al azar, considerando a las variedades como repeticiones. Previo a la inoculación, el mosto se termovinificó (60 °C por 20 min, pasando en menos de 5 min a 20 °C) (Ribéreau-Gayon, Dubordieu, Donèche, & Lonvaud, 2006) y se ajustó a pH de 3.5 y 21 °Bx. En cada uno de los matraces, y para cada cultivar, se inocularon 3×10^6 UFC·mL⁻¹ de la cepa nS a analizar, y una hora después 1×10^6 UFC·mL⁻¹ de la levadura *Saccharomyces* K1-V1116. Los matraces se incubaron a 25 °C durante 10 días; periodo durante el cual se realizaron recuentos en placa utilizando medio NYDA (*Saccharomyces*) y lisina (nS), y se dio seguimiento a la fermentación mediante la determinación de la densidad; la cual se calculó con medición del peso del líquido dentro del matraz (restando el peso del matraz medido previo a su llenado) y su volumen correspondiente para cada muestreo (restando los mililitros utilizados en el muestreo).

Para determinar la calidad general de los vinos obtenidos se realizaron las siguientes determinaciones: a) pH, por medio de un potenciómetro marca Conductronic; b) sólidos solubles totales (SST, °Bx), utilizando un refractómetro manual marca ATAGO (rango de 0 a 32 °Bx); c) grado alcohólico, por destilación directa y picnometría; d) acidez total titulable (ATT), por titulación con hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N, reportada en g·L⁻¹ de ácido tartárico; e) acidez volátil (método García-Tena); f) azúcares residuales (Fehling Causse Bonnans) y g) glicerol (espectrofotometría).

due to the higher sugar content, on average, in the first vineyard (21 °Bx), at least compared to “El Rosario” (18 °Bx). The health status was similar in these two vineyards, but not so in the case of “Viñedos Azteca” where, at the time of the samplings, it had problems with fungal diseases, which probably contributed to the fewer number of yeasts isolated from this vineyard.

The test in lysine medium allowed the identification of 146 nS (74 %) from the total number of isolates, confirming what was previously reported by several authors (Fernández, Úbeda and Briones 2000; Fleet, 2003; Ricci, Martini, Bonechi, Trbalzini, Santucci, & Rossi, 2004), in the sense that in the early stages of musts in spontaneous fermentation, the nS yeasts predominate due to their abundance from the fruits. Of these, 58 % came from “El Barreno”, 28 % from “El Rosario” and 14 % from “Viñedos Azteca.”

Figure 1 shows the development of some strains in the lysine medium, where SR30 and SR31 stand out. In others such as SR34, less intense development can be seen, and, finally, there was none in SR33. The strains that were positive were assigned, from that moment on, the letter “N” instead of “S” for belonging to the group of non-*Saccharomyces*.



*The name originally given to the Petri dish was modified to match the genus.

*El nombre originalmente etiquetado en la caja de Petri fue modificado para su correspondencia en género.

Figure 1. Observed growth in lysine medium, for the differentiation of the non-*Saccharomyces* group, of four of the strains isolated from Querétaro grape musts in spontaneous fermentation.

Figura 1. Crecimiento observado en medio lisina, para la diferenciación del grupo no-*Saccharomyces*, de cuatro de las cepas aisladas de mostos de uvas queretanas en fermentación espontánea.

Análisis de los datos

Para los ensayos de microvinificación se empleó un diseño de bloques al azar con nueve tratamientos (ocho cepas de levaduras + una de referencia) y dos repeticiones (los cultivares de vid). Con los datos de las variables físicas y químicas se realizaron análisis de varianza y pruebas de comparación múltiple de medias de Tukey ($P \leq 0.05$), mediante el programa estadístico JMP 9.0.

Resultados y discusión

Aislamiento y diferenciación

Se aislaron un total de 198 levaduras, teniendo mayor número de la finca “El Barreno” (106) comparando con “El Rosario” (71) y “Viñedos Azteca” (21); lo cual, puede deberse al mayor contenido de azúcares, en promedio, en el primer viñedo (21 °Bx), al menos en comparación con “El Rosario” (18 °Bx). El estado sanitario era similar en estos dos viñedos; no así para el caso de “Viñedos Azteca”, donde al momento de los muestreos se tenían problemas con enfermedades fúngicas, lo que probablemente influyó en que se tuviera menor número de levaduras aisladas de este viñedo.

La prueba en medio lisina permitió la identificación de 146 nS (74 %) del total de aislamientos, confirmando lo previamente reportado por diversos autores (Fernández, Úbeda y Briones 2000; Fleet, 2003; Ricci, Martini, Bonechi, Trbalzini, Santucci, & Rossi, 2004); en el sentido de que en etapas tempranas de mostos en fermentación espontánea predominan las levaduras nS, debido a su abundancia desde los frutos. De éstas, 58 % procedían de “El Barreno”, 28 % de “El Rosario” y 14 % de “Viñedos Azteca”.

En la Figura 1 se observa el desarrollo de algunas cepas en el medio lisina, donde destacan SR30 y SR31. En otras como SR34 se aprecia menor intensidad de desarrollo y, finalmente, en SR33 no se manifiesta éste. A las cepas que resultaron positivas se les asignó, a partir de ese momento, la letra “N” en lugar de “S” por pertenecer al grupo de no-*Saccharomyces*.

Actividad β -glucosidasa

De acuerdo con las pruebas realizadas en medio EGA, de las 146 cepas nS 90 (62 %) resultaron β glucosidasa positivas. Los porcentajes de levaduras nS con esta actividad varían en función del viñedo, correspondiendo 68 % a “El Barreno”, 51 % a “El Rosario” y 50 % a “Viñedos Azteca”. En todos los casos los valores superaron el 50 %, el cual es elevado si se compara con trabajos como el de Arroyo, Cordero-Bueso, Serrano, y Valero (2010), donde 29 % de las

β -glucosidase activity

According to the tests conducted in EGA medium, of the 146 nS strains, 90 (62 %) were β -glucosidase positive. The percentages of nS yeasts with this activity vary depending on the vineyard, with 68 % corresponding to “El Barreno,” 51 % to “El Rosario” and 50 % to “Viñedos Azteca.” In all cases the values exceeded 50 %, which is high when compared with other studies such as that of Arroyo, Cordero-Bueso, Serrano, and Valero (2010), where 29 % of the yeasts studied showed this activity. It should also be remembered that part of the positive impact attributed to nS yeasts is their greater ability to produce glucosidase enzymes, which can favor the aromatic profile of wines (Jolly, Augustyn, & Pretorius, 2006).

Ethanol tolerance and sulfur dioxide

The detection time ranges for the yeasts assessed in the medium containing ethanol ranged from 18.2 h (NR90) to 72.0 h (NR107) (Figure 2). The selection criteria for this test was based on a limited (but not absent) resistance to this compound, which would result in high detection times (over 18 h). In principle, this feature would reduce the viability of the must in the early stages of fermentation, thereby avoiding competition with the *Saccharomyces* but allowing them to develop enough to

levaduras estudiadas presentaron esta actividad. Así mismo, cabe recordar que una parte del impacto positivo que se atribuye a las levaduras nS es su mayor capacidad de producir enzimas glucosidasas, que pueden favorecer al perfil aromático de los vinos (Jolly, Augustyn, & Pretorius, 2006).

Tolerancia a etanol y anhídrido sulfuroso

Los rangos de tiempo de detección para las levaduras evaluadas en el medio conteniendo etanol fluctuaron entre 18.2 h (NR90) y 72.0 h (NR107) (Figura 2). El criterio de selección respecto a esta prueba se basó en una limitada (pero no ausente) resistencia a este compuesto, lo que se traduciría en tiempos de detección elevados (superiores a 18 h). En principio, esta característica reduciría la viabilidad del mosto en las primeras etapas de la fermentación, evitando la competencia con las *Saccharomyces*, pero permitiéndoles desarrollar lo suficiente como para producir los metabolitos de interés (Álvarez, Zamora, & Acedo, 2009). Algunas levaduras que mostraron elevados tiempos de detección, y que no fueron elegidas por no cumplir el resto de los criterios de selección, fueron NB65 y NB75.

En lo que respecta a la tolerancia al anhídrido sulfuroso, las levaduras que presentaron menores

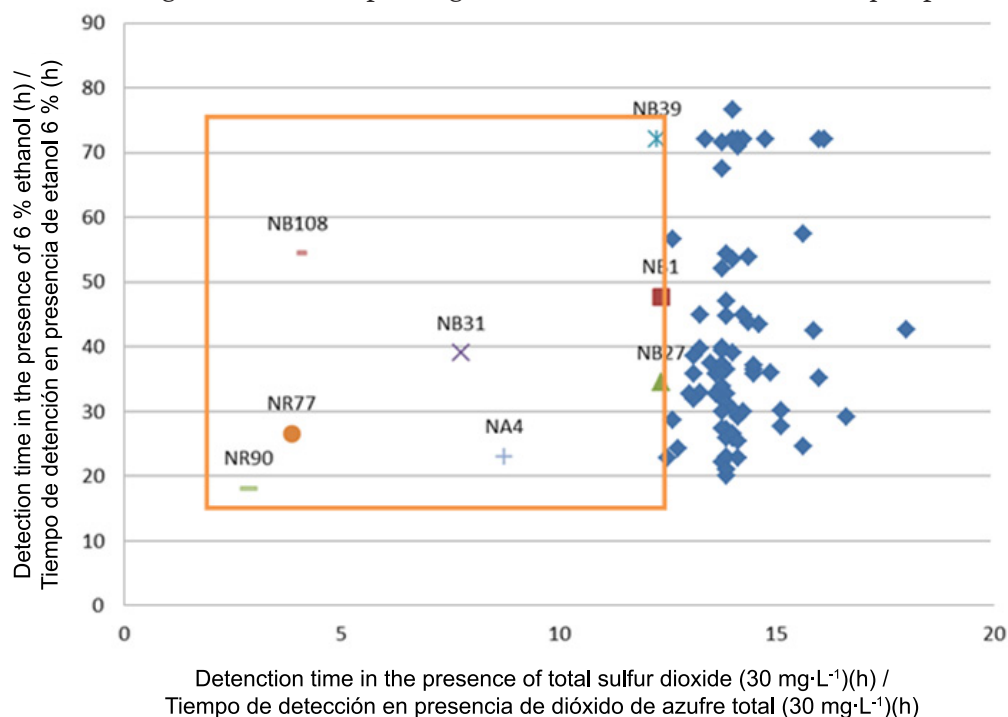


Figure 2. Detection times of the kinetics of 90 non-*Saccharomyces* yeasts in two YPD liquid media adjusted to pH 3.5, 20 °Bx, containing ethanol (6 %) and SO₂ (30 mg·L⁻¹), with selected strains shown in inset.

Figura 2. Tiempos de detección de las cinéticas de 90 levaduras no-*Saccharomyces* en dos medios YPD líquido ajustados a pH 3.5, 20 °Bx, conteniendo etanol (6 %) y SO₂ (30 mg·L⁻¹) señalándose con un recuadro las cepas seleccionadas.

produce the metabolites of interest (Álvarez, Zamora, & Acedo, 2009). Some yeasts that showed high detection times, and that were not chosen for failing to meet the rest of the selection criteria, were NB65 and NB75.

Regarding tolerance to sulfur dioxide, the yeasts that had lower detection times (greater SO₂ tolerance) were: NB1 (12.37 h), NB27 (12.37 h) and NR90 (2.9 h), contrasting with NB73 that obtained 96.1 h. It is known that moderate amounts of total SO₂ (30-100 mg·L⁻¹) lengthen the lag phase of yeasts by one or two days, while high amounts (greater than 200 mg·L⁻¹) can inhibit it (Ribéreau-Gayon et al., 2006). One of the desirable features in nS, as a potential commercial yeast, is its tolerance to SO₂ concentrations typically added during vinification (30-50 mg·L⁻¹), allowing it to survive the sulfating and make its eventual contribution before the alcohol concentrations are increased (Navarre & Navarre, 1998).

Based on the combined behaviors exhibited by all yeasts, we selected, for further testing, those eight that are framed within the inset of Figure 2. Of these, and in terms of their origin, five (NB1, NB27, NB31, NB39 and NB108) come from "El Barreno," two (NR77 and NR90) from "El Rosario" and one from "Viñedos Azteca" (NA4), proportions that substantially match the percentages of β-glucosidase positive nS strains.

Identification of selected yeasts

The eight selected yeasts were identified by amplification and sequencing of the D1/D2 domain, as mentioned in the methodology. All were identified as belonging to the genus *Hanseniaspora*; NR90 was *H. guilliermondii* and the rest *H. uvarum* (Table 1).

The genus *Hanseniaspora* is considered ethanol-sensitive, being able to ferment grape must up to 5 % alcohol, which coincides with the behavior observed in tolerance tests obtained by Bioscreen®. On the other hand, it has been reported that *Hanseniaspora guilliermondii* can produce greater concentrations of higher alcohols, esters and glycerol than *Saccharomyces*, and its production of acetic acid varies at strain level (Zironi et al., 1993). For their part, Medina et al. (2008) report that wines obtained from mixed microvinifications, using one strain of the genus *Hanseniaspora* together with one *Saccharomyces*, show greater aromatic complexity (more fruity and intense), also improving their sensory acceptance. This suggests that the isolates obtained in this study, by belonging to the genus *Hanseniaspora*, can modify the sensory profile of the wines, provided that they are able to act together with a fermentative yeast such as *Saccharomyces*, without any inhibition in the early stages of fermentation by either of the two (Raynal et al., 2011).

tiempos de detección (mayor tolerancia a SO₂) fueron: NB1 (12.37 h), NB27 (12.37 h) y NR90 (2.9 h), contrastando con NB73 que obtuvo 96.1 h. Se sabe que cantidades moderadas de SO₂ total (30 a 100 mg·L⁻¹) alargan la fase de adaptación (lag) de las levaduras hasta en uno o dos días; mientras que cantidades elevadas (mayores a 200 mg·L⁻¹) pueden llegar a inhibirla (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Una de las características deseables en nS, como potencial levadura comercial, es que sea tolerante a las concentraciones de SO₂ típicamente adicionadas durante la vinificación (de 30 a 50 mg·L⁻¹), lo que le permitirá sobrevivir al sulfitado y realizar su eventual aporte, antes de que las concentraciones de alcohol se incrementen (Navarre & Navarre, 1998).

Con base en los comportamientos combinados por la totalidad de las levaduras, se seleccionaron, para las pruebas ulteriores, aquellas ocho que se encuentran enmarcadas dentro del recuadro de la Figura 2. De éstas, según su origen, cinco (NB1, NB27, NB31, NB39 y NB108) provienen de "El Barreno", dos (NR77 y NR90) de "El Rosario" y una de "Viñedos Azteca" (NA4), proporciones que concuerdan sensiblemente con los porcentajes de cepas nS βglucosidasas positivas.

Identificación de las levaduras seleccionadas

Las ocho levaduras seleccionadas fueron identificadas mediante amplificación y secuenciación del dominio D1/D2, como se mencionó en la metodología. Todas fueron pertenecientes al género *Hanseniaspora*; NR90 resultó *H. guilliermondii* y el resto *H. uvarum* (Cuadro 1).

El género *Hanseniaspora* se considera sensible al etanol, siendo capaz de fermentar el mosto de uva hasta un máximo de 5 % de alcohol; lo que coincide con el comportamiento observado en las pruebas de tolerancia obtenidas mediante el Bioscreen®. Por otro lado, se ha reportado que *Hanseniaspora guilliermondii* puede producir concentraciones más elevadas de alcoholes superiores, ésteres y glicerol que *Saccharomyces*, y su producción de ácido acético varía a nivel cepa (Zironi et al., 1993). Por su parte, Medina et al. (2008) reportan que vinos obtenidos a partir de microvinificaciones mixtas, utilizando una cepa del género *Hanseniaspora* junto con una *Saccharomyces*, muestran mayor complejidad aromática (más frutados e intensos), mejorando también su aceptación sensorial. Lo anterior sugiere que los aislados obtenidos en este estudio, al pertenecer al género *Hanseniaspora*, pueden modificar el perfil sensorial de los vinos, siempre y cuando éstos sean capaces de actuar en conjunto con una levadura fermentativa como *Saccharomyces*, sin que exista inhibición en etapas tempranas de la fermentación por parte de ninguna de las dos (Raynal et al., 2011).

Table 1. Native non-*Saccharomyces* yeasts of Queretaro selected and identified by their similarity to BLAST sequences.

Cuadro 1. Levaduras no-*Saccharomyces* nativas de Querétaro seleccionadas e identificadas por su similitud con secuencias del BLAST.

Strain/Cepa	Query coverage / Cobertura de consulta	Identity Percentage / Porcentaje de Identidad	Access No. to sequence with maximum homology / Núm. de acceso a secuencia con máxima homología
NB39	99 %	99	JX049424.1
NR90	97 %	95	JQ690243.1
NB108	99 %	98	GU080043.1
NB31	99 %	98	JX049424.1
NA4	84 %	92	KC798406.1
NR77	99 %	98	GU080043.1
NB27	99 %	99	GU080043.1
NB1	88 %	97	JQ678681.1

Fermentative behavior

Taking the decrease in density over time as a measure of the progress of fermentation (Ribéreau-Gayon et al., 2006), it was observed that each of the eight mixed cultures evolved in a similar manner to that obtained in the musts inoculated only with the yeast K1-V1116 (*Saccharomyces cerevisiae*) (Figure 3); this shows that none of the selected yeasts delay fermentation under these conditions, or compete with the fermentative strain (K1-V1116).

According to the region's wine producers, one of the factors in Queretaro that undermine the quality of their wines is the low alcoholic strength that occasionally occurs (about 10 %) (de la Cruz et al., 2012), resulting from limited sugar accumulation in cold years; therefore, if this type of mixed cultures, nS + *Saccharomyces*, is to be implemented, it is imperative to verify that the speed of fermentation, and especially the alcohol produced by the action of the latter, is not affected by the action of the former.

Kinetics of the yeasts

In general, and as expected, in all mixed fermentations the predominant yeast was *S. cerevisiae* (K1-V1116), which remained until the end of fermentation, there

Comportamiento fermentativo

Tomando la disminución de la densidad a lo largo del tiempo como medida del avance de la fermentación (Ribéreau-Gayon et al., 2006), se observó que cada uno de los ocho inóculos mixtos evolucionó de manera similar al obtenido en los mostos inoculados únicamente con la levadura K1-V1116 (*Saccharomyces cerevisiae*) (Figura 3); lo anterior muestra que ninguna de las levaduras seleccionadas retrasa la fermentación en estas condiciones, ni compete con la cepa fermentativa (K1-V1116).

Según los productores de la región, en Querétaro uno de los aspectos que merman la calidad de sus vinos es la baja graduación alcohólica que ocasionalmente se presenta (alrededor de 10 %) (de la Cruz et al., 2012), derivada de una limitada acumulación de azúcares en años fríos; por lo que, si se pretende implementar este tipo de cultivos mixtos, nS + *Saccharomyces*, resulta imperante verificar que la velocidad de fermentación y, en sí, el alcohol producido por acción de esta última, no se vea afectado por la acción de las primeras.

Cinética de las levaduras

De manera general, y como era de esperarse, en todas las fermentaciones mixtas la levadura predominante

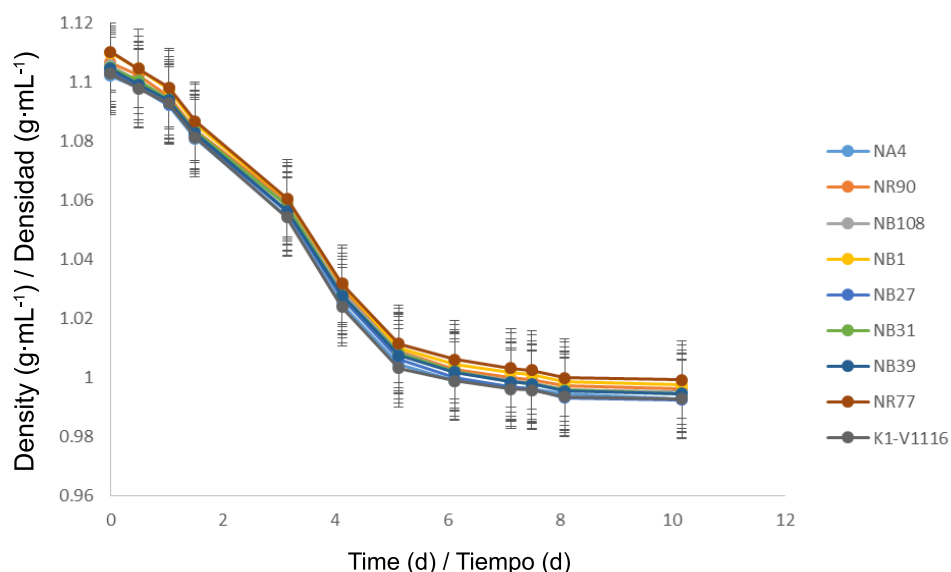


Figure 3. Decrease in density as a measure of the evolution of the fermentation of musts inoculated with different non-*Saccharomyces* yeasts plus K1-V1116 (*Saccharomyces*).

Figura 3. Disminución de la densidad como medida de la evolución de la fermentación de mostos inoculados con diferentes levaduras no-*Saccharomyces* más K1-V1116 (*Saccharomyces*).

not being any observed interference by the nS yeasts on its development, as demonstrated by the similar kinetics of strain K1-V1116 in the presence of different nS (Figure 4).

On the other hand, the same figure shows a different behavior based on the variety of the musts. In 'Merlot' except when inoculated with only K1-V1116, there is a drastic decrease in the populations of all yeasts during the first 36 h of fermentation, which would correspond to the lag stage; this decrease is, in most cases, a log cycle. In inoculations with NA4 and NB108, this decrease was almost four cycles. In all cases the yeast populations were recovered by the second day of fermentation. In the 'Cabernet Sauvignon' musts, the nS strains tend to remain constant during the first three days, and then decrease their populations by the fourth day.

The parameters evaluated to determine fruit maturation (sugars and acidity) show no important differences that allow explaining this differential behavior among varieties. However, although the pH was adjusted prior to inoculation in both musts, the type and proportion of organic acids, as well as other compounds such as fatty and phenolic acids present in the fruit, can be different in type and concentration, and thus some exert more stress on microorganisms (Bauer, Rossington, Mamnum, Kuchler, & Piper, 2003; Lafon-Lafourcade, Geneix, & Ribéreau-Gayon, 1984).

Most nS reached their peak population about two days after their inoculation, increasing slightly with respect

fue *S. cerevisiae* (K1-V1116); la cual permaneció hasta el final de la fermentación, no habiéndose observado ninguna interferencia por parte de las levaduras nS en su desarrollo, lo que se demostró con cinéticas similares de la cepa K1-V1116 en presencia de distintas nS (Figura 4).

Por otro lado, en la misma figura se observa un comportamiento distinto en función de la variedad de los mostos. En 'Merlot', salvo cuando se inoculó sola a K1-V1116, hay una drástica disminución de las poblaciones de todas las levaduras durante las primeras 36 h de la fermentación, que corresponderían a la etapa de adaptación; siendo dicha disminución, en la mayoría de los casos, de un ciclo logarítmico. En las inoculaciones con NA4 y NB108 esta disminución fue de casi cuatro ciclos. En todos los casos las poblaciones de levaduras se recuperaron hacia el segundo día de fermentación. En los mostos de 'Cabernet Sauvignon', las cepas nS tienden a mantenerse constantes durante los primeros tres días, para después disminuir sus poblaciones hacia el cuarto día.

Las variables evaluadas para determinar la maduración de los frutos (azúcares y acidez) no muestran diferencias importantes que permitan explicar este comportamiento diferencial entre variedades. Sin embargo, aunque el pH fue ajustado, previo a la inoculación en ambos mostos, el tipo y proporción de ácidos orgánicos, al igual que otros compuestos como ácidos grasos y fenólicos presentes en los frutos,

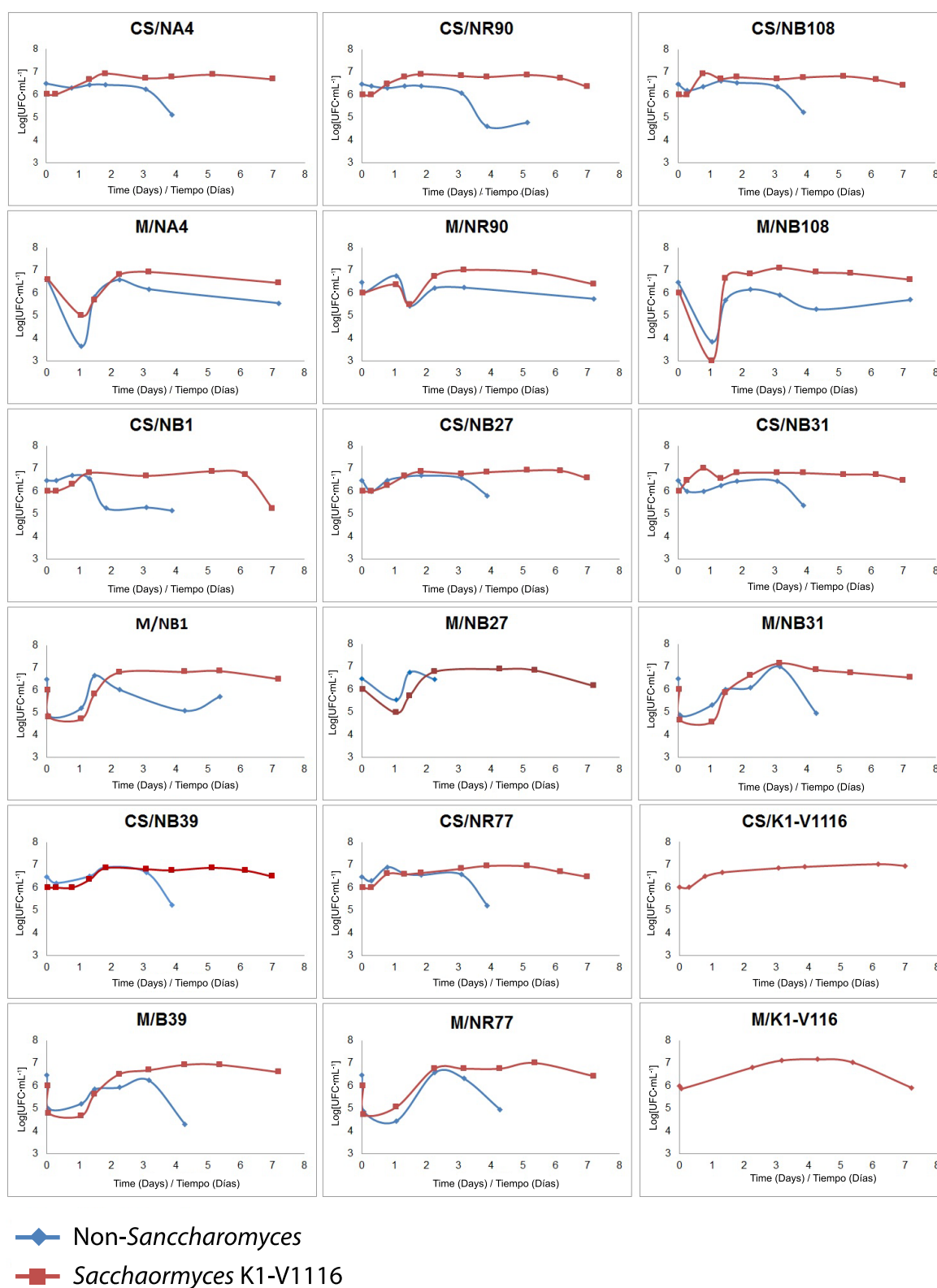


Figure 4. Population kinetics of non-Saccharomyces yeasts in mixed cultures with K1-116 and the latter alone during microvinifications.

Figura 4. Cinética poblacional de levaduras no-Saccharomyces en cultivos mixtos con K1-116 y esta última sola durante las microvinificaciones.

to the initial inoculum (1 Log [CFU·mL⁻¹]), and then decreased dramatically by the fourth day, at which time the fermentation was nearly over and therefore would have a high alcoholic strength (above 8 %, based on density). This was what was expected to be obtained based on the selection made (growth in the presence of 6 % ethanol) and the genus to which the tested strains belong, agreeing with previous studies such as that reported by Comitini et al. (2011).

However, some nS yeasts were detected even after five days in the musts of both varieties, as in the case of strains NB1, NB27, NB31, NB39 and NR77 and, only in the case of the must of the variety 'Merlot,' NR90, NB108 and NA4. Of these, based on the results of the ethanol tolerance test, NR90 and NA4 showed shorter detection times (18.17 and 24 h); therefore, this result is consistent with greater tolerance to this compound, which is usually the main constraint towards the end of fermentation (Jolly et al., 2003). In contrast to the above, the other yeasts showed little ethanol tolerance in the Bioscreen® tests, with times exceeding 35 h; for this reason, populations were not expected to remain in the advanced stages of fermentation as occurred. It should be remembered that in the ethanol (6 %) tolerance tests, it was present from the beginning, whereas in the must, the yeasts had time to activate mechanisms that allow them to gradually adapt to increasing concentrations of alcohol in the medium (Bauer & Pretorius, 2000).

Physical and chemical analysis of the wines obtained

No differences for pH, total soluble solids, TTA, volatile acidity, residual sugars, alcohol percentage, and total and free sulfur dioxide were obtained among the wines made with eight different nS strains in the presence of K1-V1116, or by comparing them with those obtained in fermentations only with the *Saccharomyces* reference strain, which shows that the nS strains do not adversely affect the most general quality aspects. The ranges of pH (3.44 to 3.51), TTA (6.3 to 7.5 g·L⁻¹ tartaric acid), volatile acidity (0.10 to 0.21 g·L⁻¹ acetic acid), alcoholic strength (11.2 to 13.6 % ethanol) and residual sugars (2.5 to 3.5 g·L⁻¹) obtained are within normal parameters (Table 2) (OIV, 2012).

On the other hand, it is noteworthy that strain NB39 obtained a glycerol concentration in the wine higher than that of most of the other yeasts (Figure 5). Glycerol contributes to the visual aspect, smoothness and viscosity of wines when it is in appropriate concentrations (greater than 5.2 g·L⁻¹). The yeast strains used during winemaking are one of the most important factors determining the abundance of this compound in the final product (Ribéreau-Gayon et al., 2006), so the superior performance of NB39 is notable.

pueden ser diferentes en su tipo y concentración, y así alguno ejercer mayor estrés sobre los microorganismos (Bauer, Rossington, Mamnum, Kuchler, & Piper, 2003; Lafon-Lafourcade, Geneix, & Ribéreau-Gayon, 1984).

La mayoría de las nS alcanzó su población máxima alrededor de dos días después de su inoculación, incrementando poco con respecto al inóculo inicial (1 Log [UFC·mL⁻¹]), para posteriormente disminuir drásticamente hacia el cuarto día, momento en el cual se estaba llegando al final de la fermentación y por lo tanto, habría un grado alcohólico elevado (superior a 8 %, de acuerdo con la densidad). Esto era lo que se esperaba obtener de acuerdo con la selección realizada (desarrollo en presencia de 6 % de etanol) y el género al que pertenecen las cepas probadas, concordando con estudios previos como el reportado por Comitini et al. (2011).

No obstante, algunas levaduras nS fueron detectadas aún después de cinco días, en los mostos de ambas variedades, tal es el caso de las cepas NB1, NB27, NB31, NB39 y NR77 y, solamente en el caso del mosto de la variedad 'Merlot', NR90, NB108 y NA4. De éstas, retomando los resultados de la prueba de tolerancia a etanol, tenemos que NR90 y NA4 mostraron tiempos de detección más cortos (18.17 y 24 h); por lo que este resultado es consistente con mayor tolerancia a este compuesto, que suele ser la principal limitante hacia el final de la fermentación (Jolly et al., 2003). Contrastando con lo anterior, el resto de las levaduras mostraron poca tolerancia a etanol en las pruebas en Bioscreen®, con tiempos superiores a 35 h; por ello, no se esperaba que permanecieran poblaciones en estadios avanzados de la fermentación como se presentaron. Cabe recordar que en las pruebas de tolerancia el etanol (6 %) estaba presente desde el inicio; mientras que en el mosto, las levaduras tuvieron tiempo de activar mecanismos que les permitieran adaptarse poco a poco a las concentraciones crecientes de alcohol en el medio (Bauer & Pretorius, 2000).

Análisis físicos y químicos de los vinos obtenidos

No se obtuvieron diferencias para pH, sólidos solubles totales, ATT, acidez volátil, azúcares residuales, porcentaje de alcohol, anhídrido sulfuroso total y libre, entre los vinos elaborados con las ocho distintas cepas de nS en presencia de K1-V1116, ni al compararlos con los obtenidos en fermentaciones únicamente con la cepa de referencia de *Saccharomyces*; lo que muestra que las primeras no afectan negativamente en los aspectos más generales de calidad. Los rangos de pH (3.44 a 3.51), ATT (6.3 a 7.5 g·L⁻¹ de ácido tartárico), acidez volátil (0.10 a 0.21 g·L⁻¹ de ácido acético), grado alcohólico (11.2 a 13.6 % etanol) y azúcares residuales

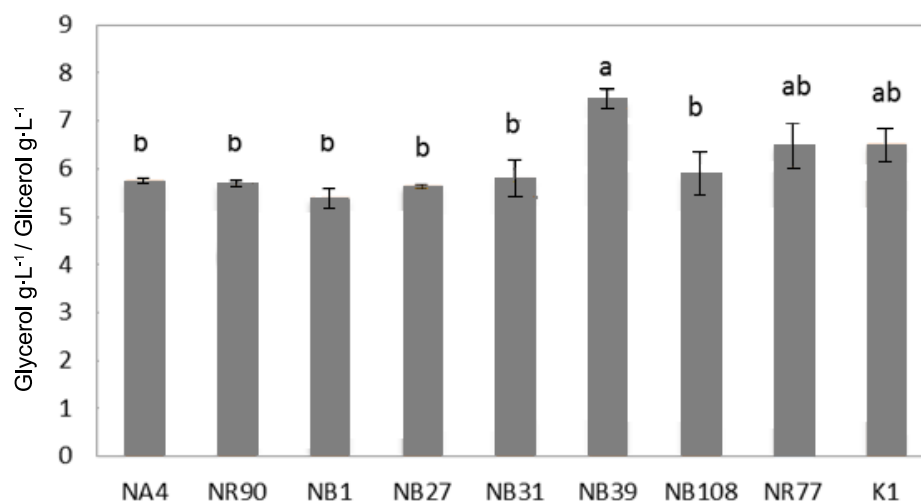
Table 2. Physical and chemical variables evaluated in wines obtained by fermentation of eight nS yeasts in mixed culture with *Saccharomyces cerevisiae* K1.

Cuadro 2. Variables físicas y químicas evaluadas en los vinos obtenidos por la fermentación de ocho levaduras nS en cultivo mixto con *Saccharomyces cerevisiae* K1.

Yeast culture / Cultivo de levaduras	Grado alcohólico / Alcoholic strength	ATT Ac. Tartárico (g·L ⁻¹) / TTA Tartaric Ac. (g·L ⁻¹)	pH	AV Ac. Acético (g·L ⁻¹) / VA Acetic Ac. (g·L ⁻¹)	Azúcares residuales (g·L ⁻¹) / Residual sugars (g·L ⁻¹)
NA4+ K1	13.37a	6.70a	3.44a	0.210a	2.877a
NR90+ K1	11.23a	6.34a	3.51a	0.164a	3.004a
NB108+ K1	13.56a	6.61a	3.45a	0.155a	3.030a
NB1+ K1	10.74a	6.79a	3.43a	0.128a	2.608a
NB27+ K1	11.37a	7.48a	3.47a	0.118a	2.447a
NB31+ K1	11.6a	7.30a	3.46a	0.128a	2.702a
NB39+ K1	11.39a	6.75a	3.52a	0.109a	3.367a
NR77+ K1	13.38a	7.14a	3.46a	0.100a	3.379a
K1-V1116	11.31a	6.89a	3.35a	0.155a	2.819a
DMSH/HSD	2.82	1.14	0.165	0.058	0.38
Valor F/F value	0.39	3.27	2.1	0.68	1.4

HSD: Honest significant difference. Means based on two observations (varieties). Different letters denote significant differences (Tukey at $P \leq 0.05$).

DMSH: diferencia mínima significativa honesta. Medias provenientes de dos observaciones (variedades). Cifras con la misma letra dentro de columnas no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$).



*M stands for the variety 'Merlot' and CS for the variety 'Cabernet Sauvignon,' and the name of the nS strain is given after the slash.

*Las letras indican la variedad correspondiente M para 'Merlot' y CS para 'Cabernet Sauvignon', y separada por la barra diagonal el nombre de la cepa nS.

Figure 5. Glycerol content in wines produced with mixed cultures of native nS with K1-V1116. Means based on two observations. Different letters denote statistical significance (Tukey, $P \leq 0.05$).

Figura 5. Contenido de glicerol en los vinos producidos con cultivos mixtos de nS nativas con K1-V1116. Medias provenientes de dos observaciones. Letras diferentes denotan significancia estadística (Tukey, $P \leq 0.05$).

Conclusions

Most of the yeasts isolated from fermenting musts belonged to the non-*Saccharomyces* group, of which the majority turned out to be β -glucosidase positive. Of these, eight (9 %) showed a desirable behavior in the presence of 30 mg·L⁻¹ total SO₂ and 6 % ethanol. Seven selected yeasts belonged to the species *Hanseniaspora uvarum*, and the strain NR90 was identified as *H. guilliermondii*. No adverse effects were observed in the physical and chemical parameters evaluated in the wines produced with nS mixed cultures and commercial K1-V1116, behavior that demonstrates the potential to be used in mixed cultures in wine production. Finally, the strain NB39 stood out by producing the highest concentration of glycerol in the wine.

Acknowledgements

The authors thank the following for allowing the use of their facilities for this research: Antonino Sierra, owner of El Rosario farm; Alejandro Zendejas, owner of the El Barreno Ranch; Jorge Ferreira, owner of Azteca Vineyards and Alberto Rodríguez, owner of CIA. Vinícola San Patricio S.A. de C.V.

End of English version

References / Referencias

- Aldrete-Tapia, J. A., Escobar-Ramírez, M. C., Tamplin, M. L., & Hernández-Iturriaga, M. (2014). High-throughput sequencing of microbial communities in Poro cheese, an artisanal Mexican cheese. *Food Microbiology*, 44, 136-141. doi: 10.1016/j.fm.2014.05.022
- Álvarez, A., Zamora, M. A., & Acedo, E. F. (2009). Perspectivas para el uso de levaduras nativas durante la elaboración de bacanora. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 51(1-2), 58-63. Recuperado de: http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2009/mi091_2h.pdf
- Arévalo, V. M., Úbeda, J. F., Cordero, R. R., & Briones, A. I. (2005). Optimization of a rapid method for studying the cellular location of β -glucosidase activity in wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 99(3), 558-564. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02627.x
- Arroyo, T., Cordero-Bueso, G., Serrano, A., & Valero, E. (2010). β -glucosidase production by non-*Saccharomyces* yeast isolated from vineyards. *Expression of Multidisciplinary Flavour Science. Winterthur, Switzerland*, 359-362. Recuperado de <https://home.zhaw.ch/yere/pdf/Teil90%20-%20Expression%20of%20Multidisciplinary.pdf>
- Bauer, F. F., & Pretorius, I. S. (2000). Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive winemaking – A review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21, 27-51. Recuperado de <http://www.sawislibrary.co.za/dbtextimages/76343.pdf>
- (2.5 a 3.5 g·L⁻¹), obtenidos se encuentran dentro de lo considerado normal (Cuadro 2) (OIV, 2012).
- Por otra parte, es de resaltar el hecho de que la cepa NB39 obtuvo la concentración de glicerol en el vino superior al de la mayoría de las otras levaduras (Figura 5). El glicerol contribuye al aspecto visual, suavidad y viscosidad de los vinos en las concentraciones adecuadas (superiores a los 5.2 g·L⁻¹). Las cepas de levadura empleadas durante la vinificación son uno de los factores más importantes que determinará la abundancia de este compuesto en el producto final (Ribéreau-Gayon et al., 2006), por lo que es destacable el desempeño superior de esta última cepa.

Conclusiones

La mayor cantidad de las levaduras aisladas de los mostos en fermentación perteneció al grupo no-*Saccharomyces*; de las cuales, la mayor parte resultó β -glucosidasa positivas. De éstas, ocho (9%) manifestaron comportamiento deseable en presencia de 30 mg·L⁻¹ de SO₂ total, así como 6 % de etanol. Siete levaduras seleccionadas pertenecieron a la especie *Hanseniaspora uvarum*, y la cepa NR90 resultó *H. guilliermondii*. No se observaron efectos negativos en las variables físicas y químicas evaluadas entre los vinos producidos con cultivos mixtos nS y la comercial K1-V1116; comportamiento que evidencia el potencial para ser utilizadas en cultivos mixtos durante la producción de vinos. Finalmente, la cepa NB39 destacó produciendo la mayor concentración de glicerol en el vino.

Agradecimientos

Al Arq. Antonino Sierra, propietario de la Finca El Rosario, al Ing. Alejandro Zendejas, propietario del Rancho El Barreno, al Ing. Jorge Ferreira propietario de Viñedos Azteca y al Ing. Alberto Rodríguez propietario de la CIA. Vinícola San Patricio S.A. de C.V., por las facilidades prestadas para la realización de este trabajo.

Fin de la versión en español

- Bauer, B. E., Rossington, M. M., Mamnum, Y., Kuchler, K., & Piper, P. W. (2003) Weak organic acid stress inhibits aromatic amino acid uptake by yeast, causing a strong influence of amino acid auxotrophies on the phenotypes of membrane transporter mutants. *European Journal of Biochemistry*, 270(15), 3189-3195. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03701.x
- Cano, J., Guarro, J., & Gené, J. (2004). Molecular and morphological identification of *Colletotrichum* species of clinical interest. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(6), 2450-2454. doi: 10.1128/JCM.42.6.2450-2454.2004
- Charters, S., & Pettigrew, S. (2007). The dimensions of wine quality. *Food Quality and Preference*, 18(7), 997-1007. doi:10.1016/j.foodqual.2007.04.003
- Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C. Lencioni, L. Mannazzu, I., & Ciani, M. (2011). Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*, 28(5), 873-882. doi: 10.1016/j.fm.2010.12.001
- de la Cruz, M. A., Martínez, R. A., Becerril, E., & Chávaro, M. S. (2012). Caracterización de vinos tintos producidos en Querétaro. *Revista Fitotecnia Mexicana*, Núm. Especial 5 (35), 61-67. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61024388012>
- Fernández, M., Úbeda, J. F., & Briones, A. I. (2000). Typing of non-*Saccharomyces* yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making. *International Journal of Food Microbiology*, 59, 29-36. doi: 10.1016/S0168-1605(00)00283-X
- Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 11-22. doi:10.1016/S0168-1605(03)00245-9
- Jolly, N. P., Augustyn, O. P. H., & Pretorius, I. S. (2003). The effect of non-*Saccharomyces* yeasts on fermentation and wine quality. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 24(2), 55-62. Recuperado de <http://www.sawislibrary.co.za/dbtextimages/17136.pdf>
- Jolly, N. P., Augustyn, O. P. H., & Pretorius, I. S. (2006). The role and use of non-*Saccharomyces* yeast in wine production. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 27, 15-38.
- Lafon-Lafourcade, S., Geneix, C., & Ribéreau-Gayon, P. (1984). Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeasts and their elimination by yeast ghosts. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(6), 1246-1249.
- Medina, K., Ferreri, L., Fariña, L., Boido, E., Dellacassa, E., Gaggero, C., & Carrau, F. (2008). Aplicación de la levadura *Hanseniaspora vineae* en cultivos mixtos con *Saccharomyces cerevisiae* en la vinificación. *Enología*, 4, 1-6.
- Navarre, J. P., & Navarre, C. (1998). *Manuel d'oenologie*. París, Francia: Lavoisier.
- Ocón, E., Gutiérrez, A. R., Garijo, P., Tenorio, C., López, I., López, R., & Santamaría, P. (2010). Quantitative and qualitative analysis of non-*Saccharomyces* yeasts in spontaneous alcoholic fermentations. *European Food Research and Technology*, 230(6), 885-891. doi: 10.1007/s00217-010-1233-7
- Organización internacional de la vid y el vino (OIV) (2015). *Compendium of international methods of analysis*. París, Francia: Autor.
- Organización internacional de la vid y el vino (OIV) (2012). *International standard for labelling of wine*. París, Francia: Autor.
- Pérez, G., Fariña, L., Barquet, M., Boido, E., Gaggero, C., Dellacassa, E., & Carrau, F. (2011). A quick screening method to identify β -glucosidase activity in native wine yeast strains: application of Esculin Glycerol Agar (EGA) medium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 47-55. doi: 10.1007/s11274-010-0425-4.
- Raynal, C., Wardrop, F., Pillet, O., Languet, P., Heras, J. M., Dumon, A., & Ortiz, A. (2011). Fermentación controlada mediante la inoculación secuencial de una levadura no-*Saccharomyces* y de una levadura *Saccharomyces cerevisiae*, una herramienta innovadora para el enólogo. *Alimentaria*, 428, 83-92. Recuperado de http://www.enoreports.com/enoreports/pdf/lallemmand_jul10.pdf
- Ribéreau-Gayon, P., Dubordieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2006). *Handbook of Enology. Vol.1. The Microbiology of Wine and Vinifications*. (2nd Ed). Burdeos, Franci: John Wiley and Sons, Ltd.
- Ricci, M., Martini, S., Bonechi, C., Trbalzini, L., Santucci, A., & Rossi, C. (2004). Inhibition effects of ethanol on the kinetics of glucose metabolism by *S. cerevisiae*: NMR and modeling study. *Chemical Physics Letters*, 387(46), 377-382. doi: 10.1016/j.cplett.2004.02.041
- Romano, P., Fiore, C., Paragino, M., Caruso, M., & Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1-2), 169-180. doi:10.1016/S0168-1605(03)00290-3
- Sandoval-Chávez, R. A., Martínez-Peniche, R. A., Hernández-Iturriaga, M., Fernández-Escartín, E., Arvizu-Medrano, S., & Soto-Martínez, L. (2011). Control biológico y químico contra control biológico y químico contra *Fusarium stilboides* en pimiento morrón en poscosecha. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 17(2), 161-172.
- Zironi, R., Romano, P., Suzzi, G., Battistutta, F., & Comi, G. (1993). Volatile metabolites produced in wine by mixed and sequential cultures of *Hanseniaspora guilliermondii* or *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 15(3), 235-238. doi: 10.1007/BF00128311