

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN-TACNA

FACULTAD DE CIENCIAS

Escuela Académico Profesional de Biología Microbiología

**“Selección de *Saccharomyces cerevisiae* nativas procedentes
de tres variedades de *Vitis vinífera* “uva” y su aplicación
en la mejora de la calidad del vino”**

TESIS

Presentada por:

Bach. Mirella Verónica Yllanes Huanacuni

Para optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO MICROBIÓLOGO

TACNA – PERÚ

2016

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN – TACNA
FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS N°269

TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO – MICROBIÓLOGO

El Secretario Académico Administrativo de la Facultad de Ciencias certifica que con la Resolución de Facultad N° 8340-2015-FACI-UNJBG, ha designado como jurados para la sustentación de la Tesis: **“Selección de *Saccharomyces cerevisiae* nativas procedentes de tres variedades de *Vitis vinifera* “uva” y su aplicación en la mejora de la calidad del vino”**, el mismo que está conformado por:

PRESIDENTE : MGR. ISABEL ANCO OLIVA
SECRETARIO : DR. CÉSAR JULIO CÁCEDA QUIROZ
VOCAL : MGR. ÁNGELA CHOQUE MIRANDA

Para examinar y calificar el trabajo de Tesis sustentado en acto público el día 23 de Diciembre del 2015.

Presentado por la señorita Bachiller: **MIRELLA VERÓNICA YLLANES HUACACUNI**, de la Escuela Académico Profesional de **Biología – Microbiología**.

El jurado calificador, en forma secreta e individual emitió su calificativo del trabajo expuesto y procedió a obtener el siguiente resultado de Aprobado por unanimidad con el calificativo de 16 (Bueno) de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

Para ratificar lo detallado firman:



Presidente



Secretario



Vocal

DEDICATORIA

Dedico este trabajo al creador de mi vida, Dios, que me ha inspirado y dado ánimos en todo momento, llegando a ser mi mayor ayuda en cada decisión. A mis padres, que me dieron la oportunidad del estudio; me enseñaron los valores que siempre perdurarán en mí, trabajando duramente y de forma honesta; y me apoyaron cada día. A mis hermanas, que me tuvieron paciencia y me alentaron a seguir enfrentando los retos que nos da la vida.

AGRADECIMIENTOS

Al Mgr. Daladier Miguel Castillo Cotrina, mi asesor, por su apoyo, sus buenos consejos y por la guía constante en el desarrollo de la presente investigación.

A los encargados del Instituto de Investigación, Producción y Extensión Agraria (INPREX) de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna, por permitirme hacer uso de su establecimiento y brindarme las facilidades durante la etapa experimental de este trabajo.

También agradecer, al profesor Alfredo Quispe del laboratorio de Bromatología y Analítica, de la Facultad de Ciencias – UNJBG, por su paciencia, explicaciones y ayuda constante en los análisis efectuados.

Al Ing. Arístides Choquehuanca, por su apoyo en la parte estadística del presente trabajo.

Al personal técnico de los laboratorios de Biología, Microbiología, Química Inorgánica, Biotecnología, por su confianza y apoyo durante el desarrollo de la presente investigación.

CONTENIDO

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ABREVIATURAS	xvii
GLOSARIO DE TÉRMINOS	xviii
RESUMEN	xx
ABSTRACT	xxii
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. Planteamiento del problema	3
I.2. Hipótesis	4
I.3. Justificación	4
I.4. Objetivos	6
1.4.1 Objetivo general	6
1.4.2 Objetivos específicos	7
I.5. Marco teórico	8
1.5.1 Características de la vid	8
1.5.2 Maduración de la uva y vendimia	11
1.5.3 Proceso de vinificación	12
1.5.4 Microbiología del mosto y del vino	19
1.5.5 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22

II.	MATERIALES Y MÉTODOS	28
2.1	Ubicación y delimitación del área de estudio	28
2.2	Población y muestra	28
2.2.1	Población	28
2.2.2	Muestra	28
2.3	Diseño de investigación	29
2.4	Métodos	29
2.4.1	Colección de muestra	29
2.4.2	Aislamiento y conservación de levaduras <i>S. cerevisiae</i>	31
2.4.3	Identificación de <i>S. cerevisiae</i>	32
2.4.4	Selección de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> nativas	37
2.4.4.1	Medición de la capacidad productora de alcohol	37
2.4.5	Inóculo. Crecimiento en biomasa	41
2.4.6	Vinificación en bodega	42
2.4.7	Evaluación sensorial	50
2.4.8	Métodos analíticos	51
2.4.9	Procesamiento y análisis de la información	61
III.	RESULTADOS	62
3.1	Aislamiento y conservación de levaduras nativas	62
3.2	Identificación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> nativas aisladas	64
3.3	Selección de levaduras nativas <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	70

3.4 Inóculo. Crecimiento en biomasa	77
3.5 Vinificación en Bodega. Monitoreo físico-químico	78
3.6 Evaluación sensorial	86
3.7 Evaluación analítica	91
3.7.1 Vino blanco Italia	92
3.7.2 Vino tinto Cabernet sauvignon	97
3.7.3 Vino tinto Negra criolla	101
IV. DISCUSIÓN	104
V. CONCLUSIONES	138
VI. RECOMENDACIONES	141
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	143
VIII. ANEXOS	162

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Codificación de los cultivos puros aislados de <i>Saccharomyces</i> , procedentes de tres variedades de <i>Vitis vinífera</i> "uva", del Instituto de Investigación, Producción y Extensión Agraria (INPREX)	63
Tabla 2. Resultado de las características macroscópicas a partir de los 18 cultivos puros aislados, para la identificación de cepas <i>S. cerevisiae</i> nativas	66
Tabla 3. Resultado de las características microscópicas a partir de los 18 cultivos puros aislados, para la identificación de cepas <i>S. cerevisiae</i> nativas	67
Tabla 4. Resultados del método en Agar Gorodkova, en base a la formación de ascosporas y formación de pseudomicelo a partir de los 18 cultivos puros aislados, para la identificación de cepas <i>Saccharomyces cerevisiae</i> nativas	68
Tabla 5. Resultados de la fermentación de Glúcidos, para la identificación de levaduras <i>S. cerevisiae</i> nativas procedentes de <i>Vitis vinífera</i> "uva".	69

- Tabla 6.** Resultado final de las cepas identificadas como *Saccharomyces cerevisiae* nativas, procedentes de las tres variedades de *Vitis vinífera* en estudio: Italia, Cabernet sauvignon y Negra criolla. 70
- Tabla 7.** Mililitros de CO₂ producidos por cada cultivo identificado como *Saccharomyces cerevisiae* después de fermentar 20 mL de solución azucarada amortiguada a 30±1°C con 0,04 g de inóculo hasta un tiempo de 90 minutos. 72
- Tabla 8.** Capacidad productora de Alcohol de *Saccharomyces cerevisiae* nativas IT-03, IT-05, CS-01, CS-04, NC-02, NC-06 y CTRL (Control), aisladas de tres variedades de *Vitis vinífera* “uva” Italia, Cabernet sauvignon y Negra criolla de los viñedos del INPREX en Tacna 73
- Tabla 9.** Análisis de varianza para la medición de la capacidad productora de Alcohol de *Saccharomyces cerevisiae* nativas aisladas e identificadas 74
- Tabla 10.** Prueba de significación de Tukey para la medición de la capacidad productora de alcohol de *Saccharomyces cerevisiae* nativas aisladas e identificadas 74

Tabla 11. Crecimiento de biomasa de la cepa IT-05, que servirá como inóculo para mostos experimentales, por duplicado	77
Tabla 12. Códigos de mostos/vinos experimentales y controles	78
Tabla 13. Resumen general del ANVA, para la evaluación sensorial de los vinos VIT, VCS y VNC	86
Tabla 14. Prueba de significación de Tukey para el análisis sensorial de vinos tintos Cabernet sauvignon	88
Tabla 15. Prueba de significación de Tukey para el análisis sensorial de vinos tintos Negra criolla	90
Tabla 16. Resumen general del ANVA, para los criterios de evaluación analítica de los vinos blancos Italia (VIT)	93
Tabla 17. Análisis de varianza para los grados alcohólicos de vinos blancos, variedad de uva Italia	95
Tabla 18. Prueba de significación de Tukey para los grados alcohólicos de vinos blancos, variedad de uva Italia	95
Tabla 19. Resumen general del ANVA, para los criterios de evaluación analítica de los vinos tintos Cabernet sauvignon (VCS)	97
Tabla 20. Análisis de varianza para el SO ₂ de vinos tintos Cabernet sauvignon	100

Tabla 21. Prueba de significación de Tukey para el SO₂ de vinos tintos

Cabernet sauvignon 100

Tabla 22. Resumen general del ANVA, para los criterios de evaluación

analítica de los vinos tintos Negra criolla (VNC) 101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema del proceso de elaboración de vinos tintos y blancos	15
Figura 2.	Estructura de la membrana plasmática y pared celular de <i>S. cerevisiae</i>	22
Figura 3.	Factores de corrección (c) del Brix en función de la temperatura	47
Figura 4.	Corrección del grado alcohólico aparente según la temperatura de lectura	53
Figura 5.	Resultados de los gramos litros de etanol producidos por cada cepa identificada de <i>S. cerevisiae</i> , al fermentar durante 90 minutos mediante el método de Davies y Griffith modificado, con 0,04 g de inóculo, en base a tres repeticiones	70
Figura 6.	Monitoreo de los °Brix registrados en el proceso de vinificación experimental, con la levadura nativa IT-05 seleccionada e inoculada en mostos de la variedad Italia (VIT-E1 y VIT-E2), Cabernet sauvignon (VCS-E1 y VCS-E2) y Negra criolla (VNC-E1 y VNC-E2), frente a sus controles correspondientes (VIT-C, VCS-C y VNC-C)	74
Figura 7.	Monitoreo de los °Bé registrados en el proceso de vinificación experimental, con la levadura nativa IT-05 seleccionada e	

- inoculada en mostos de la variedad Italia (VIT-E1 y VIT-E2), Cabernet sauvignon (VCS-E1 y VCS-E2) y Negra criolla (VNC-E1 y VNC-E2), frente a sus controles correspondientes (VIT-C, VCS-C y VNC-C) 76
- Figura 8.** Monitoreo del pH registrados en el proceso de vinificación experimental, con la levadura nativa IT-05 seleccionada e inoculada en mostos de la variedad Italia (VIT-E1 y VIT-E2), Cabernet sauvignon (VCS-E1 y VCS-E2) y Negra criolla (VNC-E1 y VNC-E2), frente a sus controles correspondientes (VIT-C, VCS-C y VNC-C) 78
- Figura 9.** Monitoreo de temperatura (°C) registrados en el proceso de vinificación experimental, con la levadura nativa IT-05 seleccionada e inoculada en mostos de la variedad Italia (VIT-E1 y VIT-E2), Cabernet sauvignon (VCS-E1 y VCS-E2) y Negra criolla (VNC-E1 y VNC-E2), frente a sus controles correspondientes (VIT-C, VCS-C y VNC-C) 79
- Figura 10.** Resultado final del análisis sensorial, ficha de cata de la O.I.V, para los vinos blancos variedad de uva Italia 81
- Figura 11.** Resultado final del análisis sensorial, ficha de cata de la O.I.V, para los vinos tintos variedad de uva Cabernet sauvignon 83

Figura 12. Resultado final del análisis sensorial, ficha de cata de la O.I.V,
para los vinos tintos variedad de uva Negra criolla

85

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Preparación del medio Agar Gorodkowa	162
Anexo 2.	Curva patrón de cada cultivo seleccionado como <i>S. cerevisiae</i>	163
Anexo 3.	Reconocimiento Ampelográfico de uva Negra criolla	167
Anexo 4.	Reconocimiento Ampelográfico de uva Italia	168
Anexo 5.	Figura de la lectura del grado alcohólico volumétrico (GAV) del destilado por aerometría	169
Anexo 6.	Figura del aparato de destilación	170
Anexo 7.	Monitoreo del °Brix durante la fermentación de VIT	171
Anexo 8.	Monitoreo del °Brix durante la fermentación de VCS	172
Anexo 9.	Monitoreo del °Brix durante la fermentación de VNC	173
Anexo 10.	Monitoreo del °Bé durante la fermentación de VIT	174
Anexo 11.	Monitoreo del °Bé durante la fermentación de VCS	175
Anexo 12.	Monitoreo del °Bé durante la fermentación de VNC	176
Anexo 13.	Monitoreo del pH durante la fermentación de VIT	177
Anexo 14.	Monitoreo del pH durante la fermentación de VCS	178
Anexo 15.	Monitoreo del pH durante la fermentación de VNC	179

Anexo 16.	Monitoreo de la temperatura durante la fermentación de VIT	180
Anexo 17.	Monitoreo de la temperatura durante la fermentación de VCS	181
Anexo 18.	Monitoreo de la temperatura durante la fermentación de VNC	182
Anexo 19.	Resumen general del estudio analítico del vino blanco Italia (VIT)	183
Anexo 20.	Resumen general del estudio analítico del vino tinto Cabernet sauvignon (VCS)	184
Anexo 21.	Resumen general del estudio analítico del vino tinto Negra criolla (VNC)	185
Anexo 22.	NTP 212.014:2011. Tabla de Requisitos físicos y químicos.	186
Anexo 23.	Gráfico sobre la dinámica de levaduras durante la fermentación	188
Anexo 24.	Ficha de cata de la O.I.V	189
Anexo 25.	Fotografía de la prueba de Fermentación de glúcidos	190
Anexo 26.	Fotografía de la prueba de esporulación	190
Anexo 27.	Proceso de encorchado y encapsulado de los vinos obtenidos	191
Anexo 28.	Fotos del análisis sensorial realizada a los vinos obtenidos	192

ABREVIATURAS

°Bé	:	Grados Baumé
°Brix	:	Grados Brix
°C	:	Grados Centígrados
g	:	Gramos
h	:	Hora
HL	:	Hectolitro
L	:	Litro
mg	:	Miligramo
min	:	Minuto
mm	:	Milímetro
mL	:	Mililitro
N.T.P	:	Norma Técnica Peruana
O.I.V.	:	Organización Internacional de la Viña y del Vino
pH	:	Potencial de Hidrógeno
rpm	:	Revoluciones por minuto

GLOSARIO DE TÉRMINOS

1. **Bazuqueo:** Operación realizada durante la fermentación alcohólica con el fin de mezclar las partículas sólidas y las líquidas. En algunas zonas también se dice "mecer" el vino.
2. **Baumé:** Unidad que se utiliza en la bodega para medir la riqueza en azúcares de un mosto en función de su densidad. Grado dulce.
3. **Clarificación:** Operación dirigida a hacer que el vino sea más claro y límpido.
4. **Calidad:** Propiedad o conjunto de propiedades inherentes a los vinos que permiten caracterizarla y valorarla como igual, mejor o peor que las restantes de su especie.
5. **Descubado:** Vaciado y trasiego del vino desde un depósito a otro una vez realizada la fermentación. El vino resultante de la fermentación suele ser un 70-75 % del peso inicial de las uvas. Los hollejos se prensan suavemente para obtener los restos de vino que contengan y los restos se utilizan para hacer orujo u obtener alcohol.
6. **Encubado:** El encubado es el trasiego del mosto y los hollejos a un depósito adecuado para su fermentación.
7. **Equilibrio:** La armonía entre todos los componentes del vino. Conjunción armónica entre acidez, dulzura, taninos y alcohol.

8. **Fermentación:** Transformación del azúcar de la uva en alcohol etílico y gas carbónico por medio de las levaduras.
9. **Inóculo:** Suspensión de microorganismos que se transfieren a un ser vivo o a un medio de cultivo a través de la inoculación.
10. **Levadura nativa:** Son aquellas que están naturalmente en el viñedo, aferradas a esa capa cerosa que recubre el hollejo y que, en definitiva, fueron las autoras de los primerísimos vinos, aquellos que fermentaban espontáneamente.
11. **Mosto:** Zumo fresco de uva que no ha iniciado la fermentación. En Jerez y algunas otras zonas se denominan mostos los vinos ya fermentados, antes de ser sometidos a crianza.
12. **Mosto flor o mosto yema:** es el mosto que fluye de la uva estrujada por simple gravedad, sin presión mecánica alguna.
13. **Trasiego:** Operación que consistente en separar el vino de las materias sólidas depositadas en el fondo de los recipientes, tanto durante la fermentación como durante las diferentes etapas de la crianza.
14. **Varietal:** Vino elaborado a partir de uvas con un mismo cepaje. Puede ser varietal 100 %. De acuerdo a lo permitido por reglas legales, para poder ser llamado varietal, debe tener un predominio de hasta el 75 % de una sola cepa.

RESUMEN

Se realizó el aislamiento de 18 cultivos de levaduras nativas a partir de tres mostos de *Vitis vinífera* en estudio Italia, Cabernet sauvignon y Negra criolla de los viñedos del Instituto de Investigación, Producción y Extensión Agraria (INPREX) de Tacna, mediante los métodos de identificación, se identificó 6 cepas nativas *S. cerevisiae*, dos de cada muestra de mosto. Se seleccionó la mejor cepa nativa a través de la medición de la capacidad productora de etanol, por el método de Davies y Griffith modificado, que resultó elegida la cepa nativa IT-05 con 4,08 g/L/h de etanol producido. La cepa seleccionada fue masificada a 10^7 células/mL, para actuar como inóculo iniciador en mostos de estudio y realizar una vinificación experimental controlada, por duplicado, se le dominó “pie de cuba” al 5 % del volumen total. La evaluación del mejoramiento de la calidad, se realizó bajo dos criterios: evaluación sensorial y el estudio analítico. Donde resultó que la cepa nativa seleccionada *S. cerevisiae* IT-05, presentó efecto positivo y de valor significativo, en el análisis sensorial de los vinos tintos Cabernet sauvignon (93,3 puntos) y Negra criolla (71,3 puntos). Más, en el estudio analítico solo mostraron diferencias significativas en los criterios de grado alcohólico en los vinos blancos Italia (VIT), resultando el grupo

experimental con mayor producción de alcohol (10,5 % vol); y en el análisis de Anhídrido sulfuroso de los vinos tintos Cabernet sauvignon experimentales (101,8 mg/L), resultando el vino control con mayor producción (115,13 mg/L).

ABSTRACT

Vinífera under consideration accomplished the isolation of 18 cultivations of native yeasts as from three grape juices of *Vitis* itself Italy, Cabernet sauvignon and Creole Negra of the vineyards of the Research Institute, Producción and Extensión Agrarian (INPREX) of Tacna, by means of the methods of identification, identified him 6 native ancestries *S cerevisiae*, two of every sign of grape juice. The best native ancestry through the measurement of the productive capability of ethanol, for Davies's method and modified Griffith were selected, that native ancestry proved to be elegidala IT 05 with 4.08 g L manufactured- ethanol h. The selected ancestry was masificadato 107 células/mL, in order to act like I inoculate lead-off in grape juices of study and accomplishing an experimental vinification controlled, in duplicate, dominated the 5 % of the total volume's foot of barrel. The evaluation of the improvement of quality, it came true under two criteria: Sensorial evaluation and the analytical analysis. Where it worked out than the native selected ancestry *S cerevisiae* IT 05, Cabernet presented positive and significant- value effect, in the sensorial analysis of red wines sauvignon (93.3 points) and Creole Negra (71.3 points). More, in the analytical very analysis showed significant differences in the criteria of alcoholic degree in white wines Italy (VIT), proving to be the experimental group with bigger production of

alcohol (10,5 % vol); And in sulfurous Anhydride's analysis of red wines Cabernet sauvignon experimentales (101.8 mg L), proving to be wine control with bigger production (115.13 mg L).

I. INTRODUCCIÓN

Los productos vitivinícolas en el Perú, desde la época colonial, empezaron a tomar un crecimiento enorme; aumentaron los volúmenes de comercialización en el mercado interno y externo. La vid fue traída por los españoles y encontró en el Perú las condiciones propicias para desarrollarse. El valle de Tacna es una zona apta para la producción de vid, por sus condiciones climáticas, edafología y entre otros aspectos que permiten que la uva vinera se adapte de manera óptima.

En la actualidad existen más de 450 has de vid en producción y aproximadamente 100 has, con nuevas plantaciones. El 80 % de la producción se ha venido destinando para la producción del vino, de diferentes variedades; que en su mayoría son elaborados de forma artesanal. La producción de vino artesanal, comúnmente conocido como “vino de chacra”, generalmente, no reúne las normas de calidad del producto, además que los volúmenes de producción son pequeños, por lo que son consumidos en el mercado local, no obstante, la región es un mercado potencial para este producto, que en la actualidad es sustituido por licores como la cerveza entre otros.

Si se desea mejorar la calidad de un vino, directamente se debe estudiar la levadura, que es la máxima protagonista en el proceso de vinificación, *Saccharomyces cerevisiae*. Se considera un microorganismo “domesticado” ya que es predominante en los ambientes industriales en los que se realizan las fermentaciones alcohólicas, mientras que es relativamente escaso (aunque no completamente ausente) en ambientes “naturales” o no alterados por actividades humanas. Por otro lado, algunas también han colonizado parte del ecosistema del viñedo, debido a prácticas habituales de las bodegas, como la incorporación de los orujos (conteniendo levaduras) al suelo del viñedo. Debido a la capacidad fermentativa y a su domesticación, *Saccharomyces* rápidamente desplaza a las otras levaduras y, por lo tanto, es la de mayor importancia respecto a sus aportaciones durante el proceso de fermentación, ya que pueden producir cualidades de mejora en los vinos, especialmente sabor, gusto u olores. Por lo tanto, un aspecto interesante a profundizar es la selección de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* nativas, por su notable contribución tanto de tipo organoléptico o aromático, como tecnológico.

La política de desarrollo del sector agrario y la situación de estabilidad económica del país son condiciones básicas para desarrollar una industria vitivinícola de calidad en el valle de Tacna, haciendo uso de

herramientas biotecnológicas, el cual puede generar una mayor oferta de producción en el área vitivinícola, constituyendo en un mediano plazo un efecto positivo para el crecimiento del sector agropecuario del valle de Tacna, siendo también de importancia económica y agroindustrial.

1.1. Planteamiento del problema

El vino es, sin lugar a dudas, uno de los productos más nobles y complejos producidos por el hombre, siendo nuestra ciudad un productor significativo vigente. En su proceso de elaboración intervienen una serie de factores fundamentales. Además del suelo y clima, están la maceración de la uva; fermentación del mosto que es de importancia microbiológica e industrial, debido a la participación fundamental de las levaduras fermentadoras del mosto, que transforman el azúcar en alcohol (etanol), por ello se desea investigar de qué manera se puede obtener una mejor calidad de vino, evaluando sus cualidades organolépticas, físicas y químicas, con el manejo de cepas que presenten mayor capacidad fermentativa. Entonces, se plantea la siguiente interrogante: **¿Se seleccionará *Saccharomyces cerevisiae* nativas procedentes de**

las variedades de *Vitis vinífera* “uva”: Italia, Cabernet sauvignon y Negra criolla y que su aplicación mejore la calidad del vino?

1.2. Hipótesis

De acuerdo con el problema planteado, se planteó la siguiente hipótesis:

Se obtiene una mejora de la calidad del vino por aplicación de *Saccharomyces cerevisiae* nativas seleccionadas procedentes de las variedades de *Vitis vinífera* “uva”: Italia, Cabernet Sauvignon y Negra criolla.

1.3. Justificación

La industria vitivinícola en los últimos años ha tenido un enorme crecimiento a nivel mundial, en la producción de vinos de toda calidad, desde los más generosos hasta los vinos corrientes. Nuestro país es un productor activo de productos enológicos, en especial el pisco, pero cabe resaltar que también es productor de vinos, por la calidad y variedad de sus uvas, donde yacen viñedos

en terrenos aptos para su crecimiento, es por lo cual se producen diversos tipos de vinos, siendo vistos como una cultura el beberlos, incentivando el consumo, promocionando el enoturismo, como la mencionada “ruta del pisco y del vino”.

El uso de cultivos puros de levaduras nativas seleccionadas, que proceden de la zona vitivinícola donde se van a utilizar, es más efectivo que el uso de levaduras comerciales, para realizar fermentaciones, ya que se cree que las levaduras que se encuentran en una microzona son específicas del área, están totalmente adaptadas a las condiciones climáticas de la zona, a la materia prima, es decir, al mosto a fermentar y son responsables parcialmente de las características únicas de los vinos obtenidos (Mas y col., 2002).

Las razones que justifican el uso continuado en la producción de bebidas alcohólicas y en la elaboración de alimentos de cepas industriales de *S. cerevisiae* son su capacidad para transformar eficazmente azúcares en etanol, dióxido de carbono y numerosos metabolitos secundarios que dan lugar al sabor y aroma característico de cada producto.

En nuestra localidad muchas bodegas son de procedencia agroindustrial, semindustrial, y/o artesanales, haciendo uso o no de levaduras, como inóculo, es por ello que el presente trabajo se dirige al agente causante de la fermentación alcohólica, que por el cual se produce los productos enológicos (vinos), y por ello se quiere realizar el estudio de estas levaduras fermentadoras como *Saccharomyces cerevisiae*, buscando aislarlas, ya que han sido descritos en la literatura científica como el principal responsable de la fermentación alcohólica y de la generación de aromas secundarios en el vino, que confieren cualidades de calidad en los vinos.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

- Seleccionar *Saccharomyces cerevisiae* nativas procedentes de tres variedades de *Vitis vinífera* “uva”: Italia, Cabernet Sauvignon y Negra criolla, y aplicarlas en la mejora de la calidad del vino.

1.4.2. Objetivos específicos

- Aislar cultivos de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* nativas, de los viñedos del Instituto de Investigación, Producción y Extensión Agraria de Tacna (INPREX).
- Identificar las colonias nativas aisladas a través de criterios morfológicos, de reproducción vegetativa y sexual, bioquímica y fisiológica.
- Seleccionar la mejor cepa de *S. cerevisiae* nativas, mediante el método de la capacidad productora de etanol.
- Masificar e inocular las levaduras *S. cerevisiae* nativas seleccionadas en mostos experimentales de *Vitis vinífera* “uva”, variedad Italia, Cabernet sauvignon y Negra criolla.
- Monitorear la fermentación experimental considerando la evolución de la temperatura, pH, °Brix y °Baumé.
- Realizar la evaluación sensorial de los vinos que se obtengan.
- Determinar en el estudio analítico de los vinos si los parámetros evaluados están bajo lo indicado por la N.T.P. y la O.I.V.

- Indicar por determinaciones químicas, si los vinos elaborados con cepas nativas, presentan características semejantes al elaborado en forma natural.

1.5. Marco teórico

1.5.1. La vid

1.5.1.1. Clasificación taxonómica

Tipo: Fanerógamas

Sub tipo: Dicotiledóneas

Clase: Dialipétalas

Orden: Raminales

Familia: Vitaceae-Ampelidáceas

Género: *Vitis*

Especie: *Vitis vinífera*

Fuente: Noguera, 1971.

1.5.1.2. Características de la vid

1.5.1.2.1. Cabernet sauvignon

Es una de las cepas más conocidas y populares de vino tinto del mundo. Independientemente de su lugar de emplazamiento, se destaca por un fuerte aroma a cassis. Si es añejado en barrica, a menudo tiene aroma de madera de cedro o tabaco. En años jóvenes sorprende con aroma a pimienta verde fresco. Los pequeños granos de cáscara dura de Cabernet proveen vinos de colores intensos, ricos en taninos y con gran potencial de añejamiento, en el mejor de los casos muchas décadas. La patria de Cabernet es Bordeaux, donde nunca se elabora como vino la variedad pura, sino que se mezcla con Merlot. En nuestro continente son vinos opulentos y frutados,

nos adulan con taninos más blandos que el Cabernet más aristocrático de Bordeaux (Pleitgen y Koelliker, 2007).

1.5.1.2.2. Negra Criolla

Variedad de uva silvestre, es decir, no necesita de cuidados, la forma de racimo es cónica, el tamaño es grande, alargado y no tan compactado, la forma y tamaño de los granos es achatado y mediano; de color púrpura, rojizo o negro; es utilizada para la elaboración de vino tinto y pisco (Robinson, 2006).

1.5.1.2.3. Italia

La particularidad de esta variedad es que tiene contenido de azúcar alto e intenso aroma, sus hojas tienen bordes bien pronunciados, la forma del racimo es

cónica y alargada; la forma y tamaño del grano es ovalada y grande, el color del grano es verde amarillento, es utilizada para vino de mesa y pisco (Robinson, 2006).

1.5.2. Maduración de la uva y vendimia

Las uvas maduras y sanas son las más aptas para obtener vinos de calidad, para que no presenten desviaciones organolépticas y sean aptos para la conservación (Girad, 2004). Se denomina vendimia a la recolección de uvas, cuando la uva ha adquirido el grado de madurez adecuado, entre mediados de febrero y finales de abril se procede a la vendimia. Al objeto de conocer exactamente cuál es el momento adecuado de esta vendimia, se realizan, periódicamente, toma de muestras. De estas uvas se analizan sus índices de madurez mediante la determinación de algunos de sus componentes, como son la acidez y la riqueza en azúcares; esta servirá para conocer el grado final del vino (INDECOPI, 2006). La determinación de la madurez

tecnológica nos permite medir el contenido de azúcares, mediante la densimetría o refractometría (Girad, 2004).

1.5.3. Proceso de vinificación

1.5.3.1. Definición

Vinificación es el proceso que transforma el sumo de uvas en vino, al producirse la fermentación mediante la acción de las levaduras. Este fenómeno de la fermentación, convierte los azúcares que contiene el jugo de uva, en alcohol (Avaria, 1999).

1.5.3.2. El mosto

Solución azucarada de glucosa y fructosa, más otras sustancias que tienen un rendimiento del 58 al 85 % en mostos normales de uvas maduras. La densidad de los mostos está entre 1,075 a 1,108 (10 - 14 °Bé) esto varía según el clima (Ruiz, 2004).

1.5.3.3. Vinificación del vino blanco seco

El proceso de vinificación (figura 2) comienza, una vez recolectada la uva, con el despalillado, mediante el cual se elimina el raspón; posteriormente, se procede al estrujado para conseguir el mosto. Comienza la fermentación alcohólica, que debe transcurrir a temperatura moderadamente baja para obtener un vino con la mayor cantidad posible de aromas primarios, los más apreciados en vinos jóvenes. Finalizada la fermentación alcohólica, es necesario realizar un descube, para separarlo cuanto antes de levaduras y otras materias que se depositan en el fondo del recipiente de fermentación (lías gruesas) y cuyo contacto prolongado produce características organolépticas desagradables (Barcenilla, 1990).

En seguida se produce la fermentación maloláctica (FML), que es la transformación del ácido málico en ácido láctico.

1.5.3.4. Vinificación del vino tinto

Una vez la vendimia estrujada y despalillada se lleva a fermentar; la fermentación se produce en presencia de los orujos para conseguir que el color, presente en los hollejos, se difunda en la masa del líquido; este proceso de maceración es lo que caracteriza y diferencia la elaboración de tintos y blancos. Al terminar la fermentación alcohólica, se procede al descube, separándose el vino de los orujos. El vino se pasa a un recipiente distinto en el que sufrirá la fermentación maloláctica que proporciona al vino finura y suavidad, al transformar un ácido acerbo y duro, el málico, en otro más suave y untuoso, el láctico (Barcenilla, 1990).

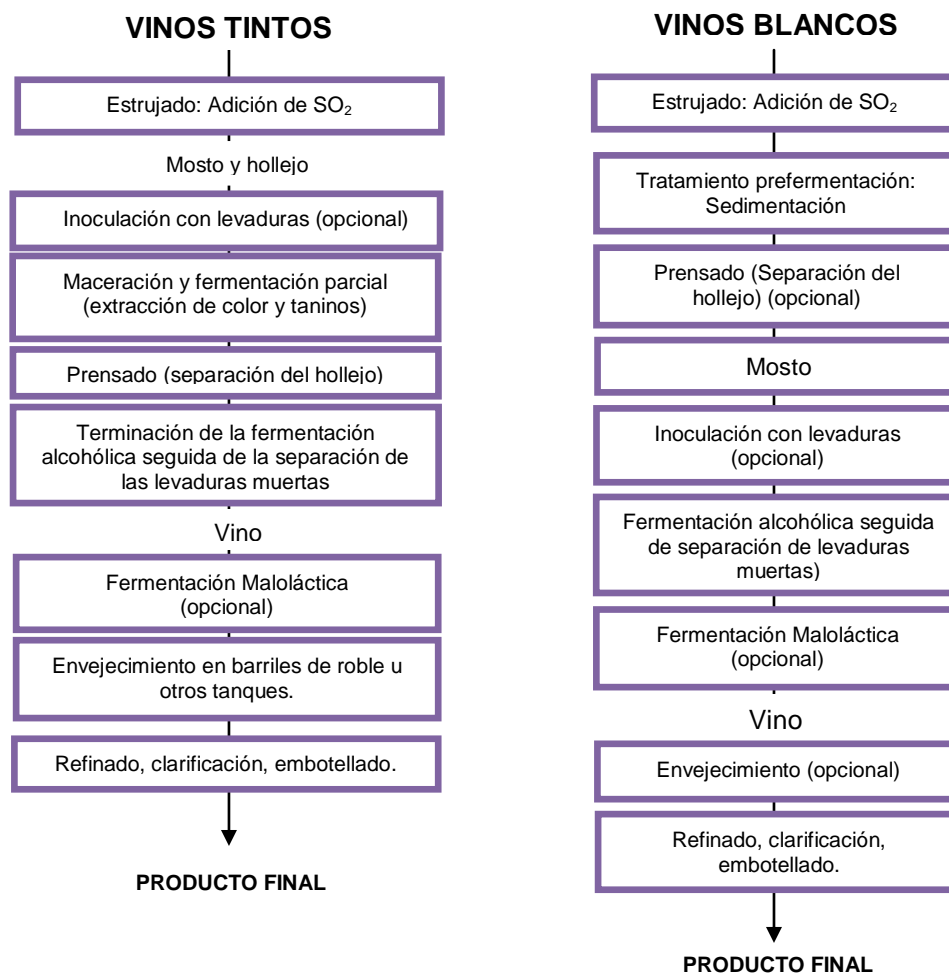


Figura 1. Esquema del proceso de elaboración de vinos tintos y blancos.

Fuente: Doyle, 1997.

1.5.3.5. Fermentación alcohólica

Los vinos blancos suelen fermentarse entre 10-18 °C durante 7 a 14 días o más, favoreciendo las bajas temperaturas y la velocidad de fermentación más lenta la retención de los componentes volátiles del aroma. Los vinos tintos se fermentan durante 7 días entre 20-30 °C, siendo necesaria temperaturas más altas para extraer el color del hollejo.

La fermentación alcohólica puede llevarse a cabo de manera natural o inducida. En la fermentación natural, las levaduras presentes en el mosto inician y terminan la fermentación. En la fermentación del cultivo puro, se inocula el mosto con cepas seleccionadas de levaduras, generalmente de *Saccharomyces cerevisiae*, con una población inicial de 10^6 a 10^7 células por mL. Estas levaduras se han encontrado en el comercio como preparados secos activos durante los últimos 30 a 40 años y ahora se utilizan ampliamente en el mundo, especialmente en

los países que son nuevos productores de vino, como EE UU, Australia y Sudáfrica.

Se considera que la fermentación alcohólica se ha completado cuando los azúcares fermentables, glucosa y fructosa, del mosto se han utilizado totalmente. El vino se separa por drenaje o bombeo del sedimento de levadura y material de la uva (lías) y se transfiere a tanques de acero inoxidable o barriles de madera para la fermentación maloláctica, si se desea, y para su envejecimiento. La clarificación por filtración o sedimentación puede llevarse a cabo en esta etapa (Doyle, 1997).

1.5.3.6. Fermentación maloláctica

Desde principios del siglo se sabe que tras la fermentación alcohólica los vinos suelen sufrir otra fermentación que se denomina maloláctica, por lo general, comienza naturalmente unas 2 a 3 semanas después del fin de la fermentación alcohólica y dura

unas 2 a 4 semanas. Las bacterias lácticas presentes en el vino son las responsables de la fermentación maloláctica, pero actualmente los enólogos deciden potenciar esta reacción inoculando con cultivos comerciales de *Leuconostocoenos*.

La reacción principal es la descarboxilación del ácido L-málico a ácido L-láctico, provocando una disminución en la acidez del vino y a un aumento de su pH de unas 0,3 a 0,5 unidades. Los vinos producidos a partir de uvas cultivadas en climas frescos tienden a tener concentraciones más elevadas de ácido málico, que puede enmascarar el carácter varietal de un vino. Una disminución de la acidez por fermentación maloláctica conduce a un vino con un sabor más suave. Aparte de estas últimas consideraciones, los vinos que no la sufren antes del embotellado corren el riesgo de que la reacción ocurra en la botella en un momento posterior. Si esto sucede el vino se gasifica y se enturbia, considerándose estropeado. También existe el punto de vista de que los vinos que han

completado la fermentación maloláctica poseen una mayor estabilidad microbiológica y son menos propensos a las alteraciones por parte de otras especies de bacterias lácticas. Después de la fermentación maloláctica por *Leuconostocoenos*, se cree que existen menos nutrientes para el crecimiento microbiano y que la producción de bacteriocinas, puede ser un factor inhibidor adicional (Doyle, 1997).

1.5.4. Microbiología del mosto y del vino

1.5.4.1. Levaduras

Son hongos unicelulares, que incluyen un núcleo (organismos eucariotas) y que pueden pertenecer a dos clases; los Ascomicetos y Deuteromicetos. En el mosto y en el vino se encuentran una gran cantidad de levaduras: *Candida*, *Kluveromyces*, *Dekkera*, *Tolulaspóra*, etc. Sin embargo el género más aprovechado de enología es *Saccharomyces*. Esta levadura se multiplica por

gemación y también se reproduce de forma sexuada, las condiciones del medio determinan el modo de reproducción (Girard, 2004).

Las levaduras convierten el azúcar de las uvas en alcohol y ácido carbónico. Se distingue entre levaduras silvestres y levaduras criadas. Las silvestres aparecen en los viñedos y en las bodegas de manera natural, a menudo son típicas para una determinada región. El viticultor la cuida trayendo los residuos de la prensa de nuevo al viñedo. Pero su uso exclusivo tiene ciertos riesgos, por ejemplo la fermentación puede pararse de golpe, antes que el azúcar haya fermentado hasta el grado que desea el bodeguero. El proceso de fermentación se desarrolla de manera más controlada si el viticultor utiliza levadura criada (puras o de cultivo), con el riesgo de perder algo de su individualidad (Koelliker y Pleitgen, 2007).

1.5.4.2. Capacidad fermentativa de levaduras

Es uno de los criterios fundamentales para la selección de levaduras de vinificación, para así conocer su alto poder fermentativo. Los mostos como sustratos fermentativos, es frecuente que presenten concentraciones azucaradas superiores a 299 g/L y 250 g/L lo que equivale a que las levaduras tienen que terminar la fermentación con contenidos de alcohol de 12 a 14,5 % v/v.

Las levaduras fermentativas son microorganismos que a lo largo de la evolución se han especializado en el rápido agotamiento de sustratos desequilibrados con un elevado contenido azucarado y un bajo contenido nitrogenado y de micronutrientes, por ello son autótrofas para muchos aminoácidos y son capaces de biosintetizar los a partir de un esqueleto carbonado (generalmente ácido alfa-cetoglutarico) y amonio. La liberación de CO₂ fermentativo genera un medio muy reductor que

inhabilita a la levadura para biosintetizar ácidos grasos insaturados, por lo que acumula en su membrana celular los saturados. Esto induce una importante rigidez de la membrana, deteriorando los mecanismos de transporte y dificultando el intercambio de nutrientes y metabolitos con el medio. Además, el medio fermentativo es, en estos momentos, especialmente tóxico para la levadura por los elevados contenidos de etanol que existen.

1.5.5. *Saccharomyces cerevisiae*

1.5.5.1. Clasificación taxonómica

Reino: Hongo

División: Amastogomycota

Clase: Ascomycetes

Subclase: Hemiascomycetidae

Orden: Endomycetales

Familia: Sacchaomycetaceae

Subfamilia: Saccharomycetaidae

Género: *Saccharomyces*

Especie: *Saccharomyces cerevisiae*

Fuente: Fajardo y Sarmiento, 2008.

1.5.5.2. Morfología y estructura

Las células del género *Saccharomyces* tienen formas variadas: ovaladas, redondas y alargadas, con tamaños diferentes de (3 a 10) x (5 a 12) μm (Hidalgo, 2002).

Su forma es frecuentemente ovalada, como todas las levaduras, su célula está protegida por una pared que envuelve una membrana plasmática. Esta última contiene un citoplasma en el cual están inmersos los orgánulos (mitocondrias, retículo, etc.). Su pared protectora es rígida y está compuesta esencialmente por manoproteínas, β -glucanos (hidrosolubles o no) y por una pequeña cantidad de quitina. Es también el soporte de enzimas

extracelulares que juegan un papel en la permeabilidad de la célula. La membrana plasmática está compuesta fundamentalmente por lípidos y proteínas. Su permeabilidad se modifica por la posible presencia esteroides y ácidos grasos (Girard, 2004).

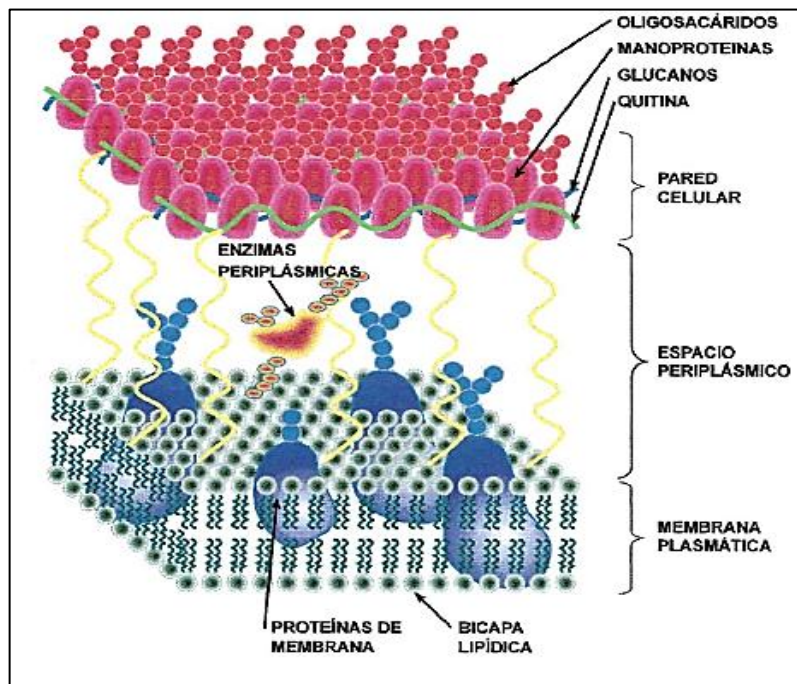


Figura 2. Estructura de la membrana plasmática y pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*.

Fuente: Morata, 2004.

1.5.5.3. Respiración

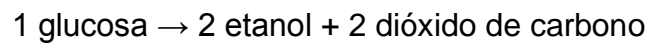
Saccharomyces puede respirar, pero prefiere fermentar. En las levaduras se distinguen dos grandes familias, aquellas que respiran exclusivamente y exigen oxígeno para sobrevivir (aerobias estrictas) y aquellas que respiran o fermentan y toleran la ausencia de oxígeno (aerobias facultativas). *Saccharomyces* es aerobia facultativa y la fermentación es su metabolismo (Girard, 2004).

1.5.5.4. Reproducción

Se multiplican por gemación múltiple, y forman esporas redondeadas u ovaladas, conteniendo un asca generalmente de una a cuatro esporas (Hidalgo, 2002).

1.5.5.5. El metabolismo fermentativo produce alcohol

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* consume preferentemente glucosa que transforma durante la fermentación en alcohol y dióxido de carbono. Esta reacción es acompañada de un desprendimiento de calor, la ecuación estequiométrica de la fermentación alcohólica es la siguiente:



Las hexosas pasan a través de la membrana gracias a un mecanismo de difusión al igual que el etanol y los ácidos orgánicos simples. Los polisacáridos (azúcares complejos como la sacarosa) necesitan de una hidrólisis previa o bien de un transporte activo para ser absorbidos, pero en éste último caso se acumulan en la célula. *Saccharomyces* no sólo se contenta con azúcares, sino que también tiene necesidad de otros nutrientes como los compuestos nitrogenados en particular. Absorben

nitrógeno en forma de sales de amonio y de aminoácidos (tiamina o vitamina B1). La población determina y asegura un consumo más rápido de los azúcares. Tal población se produce si el medio es rico en oxígeno, de ahí es el interés de una aireación del mosto al comienzo de la fermentación alcohólica (remontado con aireación).

La temperatura es un factor fundamental para la velocidad de fermentación ya que las reacciones enzimáticas presentan una velocidad máxima para una temperatura determinada. En el caso de la levadura, la fermentación es muy rápida entre 28 y 34 °C. Se considera que la temperatura óptima debe ser por debajo de 20 °C para los vinos blancos y de 30 °C para los tintos (Girard, 2004).

II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Ubicación y delimitación del área de estudio

El área de estudio comprende los campos de germoplasma del Instituto de Investigación, Producción y Extensión Agraria de Tacna (INPREX), "Fundo la Agronómica". La ubicación geográfica es latitud sur: 17°59'38", longitud oeste: 70°14'22" y altitud: 532 msnm.

2.2. Población y muestra

2.2.1. Población

La población estuvo compuesta por las levaduras nativas presentes en *Vitis vinífera* "uva".

2.2.2. Muestra

Saccharomyces cerevisiae nativas seleccionadas presentes en los mostos de *Vitis vinífera* "uva" variedades:

Italia, Cabernet sauvignon y Negra criolla, del fundo la Agronómica (INPREX).

2.3. Diseño de investigación

El tipo de investigación fue descriptiva experimental, donde el diseño de la investigación fue completamente aleatorio, con tres muestras de mostos o grupos experimentales, la cuales fueron variedades viníferas de Italia, Cabernet sauvignon y Negra criolla. Dichas muestras fueron empleadas tanto para el aislamiento de levaduras nativas *Saccharomyces cerevisiae* como, para ser sometidas a la fase experimental durante el proceso de vinificación, teniendo en esta etapa también, un grupo experimental con inóculo (levadura nativa seleccionada *Saccharomyces cerevisiae*) y un grupo control, que realizó fermentación espontánea.

2.4. Métodos

2.4.1. Colección de muestra

Las muestras de levaduras nativas *Saccharomyces cerevisiae* fueron tomadas de uvas sanas, de las variedades

Italia, Cabernet sauvignon y Negra criolla (500 gramos de c/u), obtenidas de los viñedos del Instituto de Investigación, Producción y Extensión Agraria "INPREX". Los racimos se recogieron por la mañana, fueron colocadas en bolsas de plástico de primer uso y rotulados respectivamente. Tras su inmediato transporte al laboratorio de Biotecnología del Departamento de Biología, de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, se realizó su procesamiento. En el laboratorio cada tipo de uva fue estrujada directamente en recipientes asépticos(c/u por separado), usando un par de guantes estériles. Luego el mosto se introdujo en un frasco estéril de vidrio de 700 mL de capacidad, junto con el 20 % de sus hollejos.

El fermentador se cerró con una manguera incrustada en su tapa, para favorecer la salida de los gases durante la fermentación.

El mosto permaneció en los frascos durante 5-6 días, donde predominaron las levaduras nativas *Saccharomyces cerevisiae*, por su alta resistencia al alcohol.

2.4.2. Aislamiento y conservación de levaduras nativas

Saccharomyces cerevisiae

Se realizaron diluciones para cada una de las tres muestras de mostos, con solución fisiológica, en tubos de ensayo. Se realizaron 6 diluciones a cada muestra, desde 10^{-1} a 10^{-6} . Se sembraron 0,1 ml de las tres últimas diluciones, por duplicado, en las placas Petri con medio Agar papa dextrosa (APD) pH 5,5. La incubación se realizó a 28 °C por 72 horas. Transcurrido el tiempo indicado se notó la formación de diferentes colonias, procediendo a su aislamiento en el mismo medio. Se aislaron seis colonias por muestra de mosto con morfología típica de *Saccharomyces cerevisiae* (colonias muestran un color crema a verdoso y tienen una superficie suave, opaca y consistencia cremosa). El número total de aislados fue de 18 colonias, a cada cultivo aislado se le asignó el prefijo según la procedencia del mosto de la variedad de *Vitis vinífera* "uva": Italia (IT), Cabernet sauvignon (CS) y Negra criolla (NC) y un número sucesivo.

Con las 18 colonias se realizaron cultivos puros en medio APD. Para obtener cultivos puros se tomó una única colonia suficientemente crecida y aislada del resto, a partir de la cual se utilizó el método de aislamiento en placa por estrías, utilizando nuevas placas con el mismo medio de cultivo. De esta manera nos aseguramos que el cultivo obtenido finalmente sea puro. Después de analizar la pureza de los cultivos, mediante examen microscópico, se procedió a su conservación, la cual se realizó sembrando las cepas en frascos viales conteniendo el medio Agar Papa Dextrosa (APD) adicionado con cloranfenicol 100 µg/mL.

2.4.3. Identificación de *Saccharomyces cerevisiae*

La identificación de *S. cerevisiae*, se realizó sobre las bases de las características morfológicas, reproducción vegetativa y sexual, criterios bioquímicos y fisiológicos de los cultivos puros de las levaduras aisladas.

a. Morfología celular y de la colonia

Se hizo una siembra por estría de los cultivos aislados en medio APD en placas de Petri, incubadas a 28°C por 48 horas. Se analizaron las características macroscópicas de las colonias, que suelen ser de color crema, brillante, húmeda y lisa, típicos de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (López y col., 2002).

Para cada levadura en estudio se observó la morfología de las células y pureza del cultivo al microscopio óptico, realizando observaciones en fresco y coloración Gram con objetivo de inmersión (100x), también la forma puede reflejar el modo de reproducción característica de su género (Kühley col., 1998).

b. Determinación de la capacidad de filamentización

El estudio de pseudomicelio, se realizó por la siembra en microcultivo. En primera instancia se esterilizó en autoclave el material a emplear (portaobjetos,

cubreobjetos, V de vidrio, agua destilada y medio de cultivo PDA). Se introdujo la V de vidrio en las placas en la cual se apoya las láminas portaobjetos, conservando siempre la esterilidad. Se recortó cuadraditos de medio de cultivo PDA y fueron colocados sobre los correspondientes portaobjetos. Seguidamente con una aguja de tuberculina, que contenía la suspensión de levadura, se trazó sobre el agar tres líneas paralelas a los lados longitudinales de la capa de agar. Colocando el cubreobjetos flameado sobre una parte de éstos surcos, se vertió un poco de agua destilada estéril en la placa de Petri, incubándose a 25 °C por un plazo de 7 días. Para la evaluación, la lámina sembrada fue extraída de la placa Petri y examinada microscópicamente (Kurtzman, 1998).

Se observó el crecimiento por arriba y por debajo del portaobjeto. Se hizo uso del azul de Lactofenol para las observaciones al microscopio y poder apreciar mejor la formación de pseudomicelio, que es característica en *Saccharomyces cerevisiae*.

c. Prueba de ascosporogénesis: Método Agar Gordkowa

La esporulación de levaduras indica la formación de esporas sexuales mediante un proceso de división sexual o meiosis.

Se procedió a preparar el medio Agar Gorodkowa (Anexo 1), el cual se fundió y vertió en placas de Petri para los 18 cultivos. Luego que solidifiquen se sembró una o varias asadas del cultivo de levaduras en la superficie del agar Gorodkowa, se dejó incubar a 25 °C por 40 horas. Transcurrido el tiempo con un asa de Kolle se tomó una de las colonias visibles en placa, para ser observadas al microscopio en una preparación en fresco a 500 aumentos. En el caso de no encontrarse esporas, se repitió el examen cada 24 horas durante 10 días, después del tiempo límite indicado. En los casos dudosos en la identificación de esporas se realizó una tinción de esporas con el siguiente protocolo: Se realiza un frotis de levadura en un portaobjeto y se fija utilizando la llama de un mechero. Se aplica durante 10 minutos una solución de

Verde Malaquita (0,01 %). A continuación, se lava durante 10 segundos con agua destilada y se seca. Se examina al microscopio a 1000 aumentos, las esporas aparecerán teñidas de verde. Si no se encontró esporas estas se consideraron como asporógenas. *Saccharomyces cerevisiae* se caracteriza por formar esporas de 1 a 4 por asca.

d. Fermentación de Glúcidos

En esta prueba se consideraron los siguientes azúcares: glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa y lactosa, siendo esta última la determinante por lo que resulta negativa para *Saccharomyces cerevisiae*, todos los demás azúcares resultan positivos en la fermentación. Estos fueron diluidos en solución al 2 % en agua de levadura, a cada batería de tubos se le inoculó los cultivos puros aislados, se incubó a 25 °C por tres días, en el transcurso del este tiempo se realizó la fermentación para cada azúcar. Los resultados obtenidos se compararon con las claves de identificación los cuales son: glucosa

(+), galactosa (+), sacarosa (+) maltosa (+) y lactosa (-)
(Jorgensen-Hasen, 1959).

2.4.4. Selección de *Saccharomyces cerevisiae* nativas

2.4.4.1. Medición de la capacidad productora de alcohol

a. Obtención de la curva patrón de crecimiento

Se sembró en placas Petri con medio PDA, cultivos puros aislados e identificados como *Saccharomyces cerevisiae*, que fueron en total 6 cepas, se procedió a realizar la obtención de biomasa de los mismos, logrando un franco desarrollo de las levaduras en toda la superficie de placas de Petri conteniendo medio agar papa dextrosa al 2 % (APD) e incubado a 30 °C por 72 horas. La biomasa obtenida fue cosechada con un asa de Drigalsky estéril sobre papel platino, para ser desecada en la estufa a 50 °C, mediante una balanza analítica se controló hasta obtener un peso

constante. Se pesaron y separaron en las siguientes cantidades 0,02 g, 0,04 g, 0,06 g, 0,08 g y 0,10 g de levaduras secas y fueron suspendidas en 10 ml de solución salina fisiológica (SSF) y se realizaron diluciones para el conteo de células en la cámara de Neubauer. Los datos obtenidos fueron graficados para cada cepa de levadura identificada como *Saccharomyces cerevisiae*(Anexo 2).

b. Preparación del inóculo

Cada cultivo puro de *S. cerevisiae* fue sembrado en 250 ml de caldo papa e incubado a 30°C por 24 horas, en constante aireación empleando un motor de pecera de 1500 cc por minuto. Transcurrido este tiempo, se separó 1 mililitro del cultivo, para realizar el conteo de las células/mL, llevando luego los datos a la curva patrón (Anexo2), donde se calculó antes los gramos de biomasa contenida en el caldo.

Luego la biomasa obtenida fue separada del medio por centrifugación a 3000 rpm, durante 15 minutos. El sedimento se resuspendió en 20 mL de solución salina fisiológica estéril (SSF), para volver a ser centrifugada de la misma manera hasta obtener los sedimentos que fueron utilizados como inóculos, para la medición de la capacidad fermentativa.

c. Evaluación de la capacidad productora de alcohol de los cultivos de *S. cerevisiae* nativas identificadas

Se empleó el método de Davies y Griffith modificado, para lo cual se inoculó la biomasa obtenida en 20 ml de solución azucarada amortiguada, inoculando la biomasa en un tubo de ensayo de 30 ml, luego fue sellada con un tapón estéril, para evitar la fuga del gas producido por las levaduras; en la parte del embone del dispositivo se instaló una manguera de venoclisis para recoger el

gas, de 50 cm de largo (Davies y Griffith, 1982). Luego se introdujo el extremo libre del sistema en una bureta invertida dentro de un recipiente llena de solución NaCl al 23 %, para que enseguida se realice la fermentación en anaerobiosis a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura, contabilizando la producción de gas en mililitros producido por las levaduras a través del tiempo, a intervalos de 10 minutos durante 90 minutos en total; cada cultivo por triplicado. Los datos sirvieron posteriormente, para determinar el contenido de etanol producido.

d. Dosaje de Etanol producido

Se empleó el método estequiométrico. Los mililitros de CO_2 producidos en 90 minutos de fermentación, fueron convertidos a litros y luego convertidos a gramos de etanol. Donde 22,4 litros de gas es igual a 46,07 g de etanol.

22,4 L CO_2 _____ 46,07 g (mol de etanol)

$$0,026 \text{ L CO}_2 \text{ _____ } X$$

$$X = 0,053 \text{ g de Etanol}$$

$$\underline{\text{g de etanol}} \times 1,5 \text{ horas}^{**} = \text{gr/L/h de etanol}$$

$$0,02 \text{ L Sol. Ferm.}^*$$

*: Solución azucarada amortiguada 20 ml = 0,02 L

** : Tiempo de fermentación total 90 min = 1,5 hrs

Análisis de estos datos se realizaron mediante el análisis de varianza y por el tratamiento estadístico de Tukey al 99 % para determinar qué cultivo tuvo la mayor capacidad productora de alcohol (Tabla 9 y 10).

2.4.5. Inóculo. Crecimiento en biomasa

En mostos estériles procedentes de cada variedad de uva: Italia, Cabernet sauvignon y Negra criolla, se cultivó individualmente *S. cerevisiae* nativas seleccionadas (IT-05), con el fin de obtener colonias que se transformaron en “pie de

cuba”, y posteriormente inocular a las fermentaciones experimentales. Se masificó en matraces mediante diluciones, primero a 10 ml y luego a un volumen final de 100 ml (para cada variedad de uva), esta última adaptada a un sistema de aireación, incubándose a 28 °C en un tiempo total de 48 horas.

2.4.6. Vinificación en Bodega. Aplicación de levaduras seleccionadas

Se procedió a realizar varias fermentaciones con mosto de dos variedades tintas (Cabernet sauvignon y Negra criolla) y de una variedad blanca (Italia). El procedimiento seguido se explica a continuación:

A) Vendimia

La cosecha de la uva se llama vendimia y esta fue supervisada por el jefe de producción de los viñedos. Consistió en recoger aleatoriamente los racimos de uvas sanas de las variedades: Italia, Cabernet sauvignon y Negra Criolla, entre mediados de febrero y finales de abril,

donde alcanzan el grado de madurez deseado, también para el reconocimiento de éstas fue necesaria el apoyo bibliográfico (Anexo 3 y 4). La cosecha fue a tempranas horas de la mañana. Se rompió manualmente los pedúnculos de los racimos, descartando los granos y racimos con enfermedades criptogámicas, se depositaron en jabas de plástico previamente lavadas y desinfectadas, que contuvieron 12 kg de la materia prima, por variedad de uva.

Cuando los granos de uva están maduros, la piel segrega una cera llamada pruina. Es aquí donde se adhieren las esporas de las levaduras que se encuentran en suspensión en el aire y que provienen de diferentes lugares. Cuando entran en contacto con el mosto, se hidratan y se inicia la fermentación (Simunovic, 1999).

B) Despalillado y estrujado

Empleando recipientes de plástico desinfectados se procedió a separar los granos de los escobajos o raspón, y

luego se aplastaron los granos manualmente, sin romper las semillas, ni destrozarse por completo los hollejos, permitiendo así que los jugos de su interior se pusieran en contacto con las partes sólidas.

C) Acondicionamiento del mosto y encubado

La vinificación se realizó en tres depósitos de 6 L de capacidad (para cada una de las tres variedades), lavados y desinfectados. El encubado consistió en colocar la uva molida en los depósitos de fermentación, los depósitos contenían 4 kg de uva estrujada. Se le adicionó 4 g/HL de Metabisulfito de potasio, para prevenir la proliferación de bacterias, ya que tiene acción antiséptica y antioxidante. No se realizó corrección de acidez y de dulzor.

D) Inoculación de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* nativas seleccionadas

Los mostos fueron inoculados con *S. cerevisiae* nativas seleccionadas "IT-05", procedentes de un cultivo de

24 a 48 horas, que fue preparado previamente con mosto estéril de las variedades de uva en estudio (ver 2.4.5). Se adicionó el 5 % de éste inóculo o “pie de cuba” a los mostos experimentales de cada variedad de *Vitis vinífera*.

La concentración final de células osciló entre $1,4 \times 10^7$ – $6,2 \times 10^7$ células/mL. En todas las vinificaciones, salvo en las que se utilizó mosto estéril (IT-E, CS-E y NC-E) (experimentales), se realizó una fermentación espontánea con mostos sin inocular (IT-C, CS-C y NC-C) (controles).

E) Maceración y fermentación alcohólica

Durante la fermentación hay producción de CO₂ es por ello que se le adaptó una manguerilla en el medio de la tapa, para que pueda conducir estos gases, el otro lado de la manguera fue sumergido en un recipiente con agua.

La maceración fue favorecida por bazuqueos diarios, observándose la evolución del color. Fue necesario

sumergir el sombrero dos veces diarias, para evitar el desarrollo de bacterias acéticas en los espacios de aire que quedan entre el hollejo, extraer el máximo colorante posible de la cáscara y los aromas deseados (Puerta, 2000).

Durante la fermentación se midió diariamente la temperatura y la densidad del mosto. La densidad se determinó mediante la evaluación de grados Baumé. Evaluándose también el pH y grados Brix(Figuras 6 al 9).

F) Descubado

Se separó el orujo del mosto-vino al momento que los grados Bé se encontraron en 0, esto indicó la degradación total de los azúcares en etanol. Se transvasó a otro depósito limpio sin el orujo, extrayéndose por la parte superior del envase y evitando succionar hollejos del sombrero, que quedó finalmente depositado en el fondo de la vasija (Guiñazúy col., 2010). Se dejó por un periodo de quince días. Luego se llevó a cabo el primer trasiego.

G)Trasiegos

Se realizó quince días después del descube. Consistió en separar la borra gruesa del vino, que ha precipitado hacia el fondo del depósito, el cual se efectuó a los quince días de realizado el descube. El vino se extrajo por la parte superior del envase, cuidando que la borra quede abajo y sea succionada por la manguera extractora de vino. La borra fue descartada. Estas borras están constituidas por partes sólidas de la uva y levaduras muertas, materia orgánica que no es separada rápidamente del vino, comienzan a cederle compuestos que le otorgan características desagradables, con la consecuente disminución de su calidad (Guiñazú col., 2010).

Fueron en total cuatro trasiegos, el primer trasiego después de 15 días del descubado, el segundo trasiego después de un mes, el tercer trasiego después de dos meses y el cuarto trasiego después de 4 meses. Luego de cada trasiego se agregó una dosis de 4 gr/HL de Metabisulfito de Potasio.

H) Fermentación maloláctica

Esta etapa se ha desarrollado de forma espontánea, una vez que concluyó la fermentación alcohólica. Esta fermentación se efectúa para suavizar el vino, mediante la biodegradación del ácido málico por la acción de las bacterias lácticas en ácido láctico.

I) Clarificación

Consistió en añadir al vino turbio una sustancia capaz de ejercer una acción coagulante y floculante, que al precipitar arrastre consigo, las partículas en suspensión, al fondo del recipiente. Se empleó la Bentonita granulada, que es un clarificante de tipo mineral. La bentonita se preparó en dosis de 30 gr/HL; de la siguiente manera: Se pesó la dosis y se echó poco a poco sobre 10 veces su peso en agua. Se dejó 48 horas en reposo. A las 48 horas, se revolvió y se aportó otro volumen igual de agua. Por lo que quedó al 5 %. Se puso en movimiento el vino y 5 minutos después se aplicó el clarificante poco a poco, manteniendo

un constante movimiento. Se paró la agitación y se esperó 12 días. Entonces, se separó el 95 % de vino superior, que estuvo límpido y claro.

J) Estabilización por frío y filtrado

Consistió en colocarlo en refrigeración a 5 °C durante 7 días. Después de pasar el vino por el grupo refrigerador, se separó los cristales microscópicos que hayan podido quedar en suspensión, mediante un filtrado a través de papel filtro estéril de absorción rápida.

K) Embotellado

Se envasaron en botellas de vidrio de 750 ml, previamente desinfectados, para cada tipo de vino producido. En la bodega enológica de la Municipalidad de Pocollay, se realizó el encorchado y capsulado, como parte final del proceso de envasado.

2.4.7. Evaluación Sensorial

En la evaluación sensorial de los vinos participaron un total de 5 jueces, dos de ellos catadores miembros de la Cofradía Nacional de Catadores del Perú.

La calidad de los vinos varietales se evaluó utilizando una ficha de cata realizada por la Organización Internacional de la viña y del vino (O.I.V.). El puntaje más alto es 100 puntos, indicando un vino excelente, y el más bajo es igual o menor a 33 puntos, que significa que el vino es insuficiente. En la ficha se evalúan los vinos en base a la fase visual, olfativa, gusto y armonía o juicio global.

Se empleó una copa especial para catar los vinos, de pie largo y boca estrecha. En particular normalizada según norma ISO (3591:1977, Afnor).

El lugar de cata elegido contó con buena iluminación (luz del día), para un correcto análisis sensorial.

La temperatura del vino blanco Italia fueron entre 12-15 °C y de los vinos tintos a temperatura ambiente a 20 ± 2 °C.

2.4.8. Métodos analíticos

Las determinaciones analíticas realizadas a los mostos y vino resultantes se hicieron de acuerdo con los siguientes métodos:

a) Grados Brix

Para su evaluación se utilizó un refractómetro de mano de 0 - 40 °Brix E-Line ATC. Son una medida de los azúcares contenidos en una solución acuosa. Esta medida se da como porcentaje en peso de azúcares, de forma que 1 °Brix equivale a 1 % de sacarosa en agua destilada (peso/peso).

Como el °Brix sufren variaciones con los cambios de temperatura, siempre que sea posible las determinaciones deben hacerse a 20 °C (ICUMSA: International Commission

for Uniform Methods of Sugar Analysis; y la UE, 1990). En caso contrario, es necesario corregir el valor de la lectura de °Brix aparente (°Brix_t) del refractómetro, según la fórmula siguiente:

$$^{\circ}\text{Brix}_{20\text{ }^{\circ}\text{C}} = ^{\circ}\text{Brix}_t + c$$

Temperatura	c
15°C	-0,3
16°C	-0,3
17°C	-0,2
18°C	-0,1
19°C	-0,1
20°C	0,0
21°C	0,1
22°C	0,1
23°C	0,2
24°C	0,3
25°C	0,3

Figura 3. Factores de corrección (c) del Brix en función de la temperatura.

Fuente: Cazorla y col., 2000.

b) Temperatura

La temperatura se obtuvo empleando un termómetro con rango de determinación entre $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$. La temperatura de fermentación del mosto se controló siempre dentro de los siguientes parámetros: para vinos tintos entre $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y vinos blancos entre $19\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $22\text{ }^{\circ}\text{C}$, si la temperatura subía a más de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ se debía enfriar con agua helada las paredes del depósito fermentador.

c) Densidad

Se utilizó el método por aerometría a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los areómetros tienen el mismo fundamento que los densímetros, pero en lugar de medir densidades sirven para medir concentraciones de las disoluciones. Vienen graduados en grados Baumé y el tipo que se empleó fue para disoluciones más densas que el agua.

Se colocaron en una probeta limpia y seca, 250 mL del mosto a analizar convenientemente homogenizada. Se

introdujo el termómetro, se agitó con el mismo la muestra y se hizo la lectura al cabo de 1 min. Se tomó la temperatura para corregir a 15 °C. Luego retirando el termómetro se introdujo el densímetro en la probeta, cuando este se mantuvo inmóvil, se efectuó la lectura (Anexo 5). La relación entre °Bé y la densidad depende algo de la temperatura.

Para una temperatura ambiente de 15 °C se usa las relaciones siguientes:

Líquidos más densos que el agua:

$$n = \frac{140}{d} - 130; \quad d = \frac{140}{130+n}$$

Siendo:

$n =$ °Bé (grados Baumé) y $d =$ densidad relativa de la disolución respecto al agua a la misma temperatura.

d) pH

La determinación se hizo por potenciometría; que es la medida de la diferencia de potencial entre el electrodo de

referencia y el de lectura de pH propiamente dicho, sumergido en el vino (García y col., 2000).

En la fase final de la vinificación, el potenciómetro empleado fue un pHmetro de mesa, marca Hanna Instruments modelo HI2210.

En el proceso de fermentación se utilizó un pHmetro de mano marca Hanna Instruments, Modelo Checker HI 98103, es un medidor de pH; se entrega con electrodo combinados de pH intercambiable con conector a rosca, con una precisión de +/-0,2.

e) Acidez total

La determinación de la acidez total se realizó en base a una valoración ácido-base, utilizando como reactivo valorante una base fuerte, hidróxido de sodio (NaOH), y tomando como punto de equivalencia $\text{pH} = 7,0$. Entonces, se empleó 25 mL de vino muestra, con NaOH 0,1 N y 1mL de fenolftaleína 0,1 %. Se pipeteó 25 mL de vino

vertiéndolos a un matraz y luego se añadió unas gotas de fenolftaleína. Los resultados se expresaron en g/L de ácido tartárico.

$$\text{Acidez total g/L} = \frac{G \times 0,1 \times 0,075 \times 1000}{25 \text{ ml (vino)}}$$

Donde:

G = Gasto de NaOH 0,1 N

Pmeq (ác. tartárico) = 0,075

f) Acidez volátil

Se analizó mediante valoración ácido-base, con NaOH 0,1 N y fenolftaleína como indicador, del destilado resultante del arrastre por vapor de agua de 50 mL de vino, desprovistos de ácido carbónico, a los que se añadía 0,5 g de ácido tartárico aproximadamente. El arrastre por vapor de agua se efectuó adaptando un sistema de destilación; se conectó el balón a un balón generador de vapor de agua y a su vez a un refrigerante. Primero se destiló el vino sin corriente de vapor para reducir su volumen a la mitad,

luego actuó con la corriente de vapor de agua, hasta obtener un destilado total de unos 200 mL, a su vez se tuvo cuidado de no calentar el balón que contuvo la muestra, controlando que el calor no sea muy fuerte. Finalmente, se procedió a titular el destilado con NaOH 0,1 N hasta obtener un viraje de la fenolftaleína. La acidez volátil se expresa en gramos de ácido acético por litro. Se realizó el siguiente cálculo.

$$A.V. = \frac{\text{g de ác. Acético}}{\text{L}} = \frac{N \times V \times 0,06}{v} \times 10^3$$

Donde:

A.V. = Acidez volátil

N = Normalidad del NaOH 0,1N

V = Gasto de NaOH (ml)

v = Volumen de la muestra (ml)

0,06 = Peso mequiv. deác. tartárico

Fuente: Reglamento CEE N° 2676/90.

g) Anhídrido sulfuroso total

Se realizó utilizando el método de Ripper simple. La determinación del dióxido de azufre (SO₂) se basa en una valoración de óxido-reducción con I₂, como reactivo valorante, en medio ácido y en presencia de almidón como indicador. Se determinó mediante el siguiente cálculo: (OIV-MA-AS323-04B, 2009)

$$\text{SO}_2 \text{ total (mg/L)} = 12,8 \times G_{I_2} \times F_{I_2}$$

Donde:

G_{I_2} = Gasto de Iodo 0,02 N (mL)

F_{I_2} = Factor de corrección del Iodo

$12,8 = (32,03 \text{ PEq SO}_2 \times 1000 \text{ mL} \times 0,02 \text{ N}_{I_2}) / 50 \text{ mL}$
muestra.

h) Grado alcohólico

Se determinó mediante el método por destilación y areometría. Se usó un areómetro, expresamente graduado en % vol. Llamado alcoholómetro o alcoholímetro. Se midió 100 mL de vino en una probeta trasvasándola a un balón

de 500 mL, se enjuagó la probeta dos veces, con 10 mL de agua por vez, luego se agregó 1 g de CaCO_3 al balón y este se acondicionó a un dispositivo de destilación. Se destiló 70 mL recogiéndolo en un matraz, luego fue transvasado a una probeta y aforado con agua destilada hasta los 100 mL, finalmente, se introdujo con cuidado y suavemente el alcoholímetro dentro de la probeta, estableciendo el valor de grado alcohólico, que está registrado en el rango de valores de grados alcohol presentes en el alcoholímetro, que coincide con el nivel de la mezcla hidroalcohólica contenida en la probeta. El valor establecido (% vol.) es el que corresponde al valor del grado alcohólico de la muestra de vino. La medida efectuada a otra temperatura fue corregida oportunamente, según las tablas de densidad grado alcohólico a 20°C (Figura 4) (Anexo 6).

	Grado alcohólico volumétrico, % vol												
	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
14°C	+0,85	+0,91	+0,97	+1,04	+1,12	+1,20	+1,29	+1,39	+1,49	+1,58	+1,68	+1,78	+1,88
15°C	+0,73	+0,77	+0,83	+1,89	+0,95	+1,02	+1,09	+1,16	+1,24	+1,32	+1,40	+1,48	+1,56
16°C	+0,60	+0,63	+0,67	+0,72	+0,77	+0,82	+0,88	+0,94	+1,00	+1,06	+1,12	+1,19	+1,25
17°C	+0,46	+0,48	+0,51	+0,55	+0,59	+0,62	+0,67	+0,71	+0,75	+0,80	+0,84	+0,89	+0,94
18°C	+0,31	+0,33	+0,35	+0,37	+0,40	+0,42	+0,45	+0,48	+0,51	+0,53	+0,56	+0,59	+0,62
19°C	+0,16	+0,17	+0,18	+0,19	+0,20	+0,21	+0,23	+0,24	+0,25	+0,27	+0,28	+0,30	+0,31
20°C	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
21°C	-0,17	-0,18	-0,19	-0,19	-0,20	-0,22	-0,23	-0,25	-0,26	-0,28	-0,29	-0,30	-0,31
22°C	-0,34	-0,36	-0,37	-0,39	-0,41	-0,44	-0,47	-0,49	-0,52	-0,55	-0,57	-0,60	-0,62
23°C	-0,51	-0,54	-0,57	-0,60	-0,63	-0,66	-0,70	-0,74	-0,78	-0,82	-0,86	-0,90	-0,93
24°C	-0,70	-0,73	-0,77	-0,81	-0,85	-0,89	-0,94	-0,99	-1,04	-1,10	-1,15	-1,20	-1,25
25°C	-0,89	-0,93	-0,97	-1,02	-1,07	-1,13	-1,19	-1,25	-1,31	-1,37	-1,43	-1,49	-1,56
26°C	-1,08	-1,13	-1,18	-1,24	-1,30	-1,36	-1,43	-1,50	-1,57	-1,65	-1,73	1,80	-1,87

Figura 4. Corrección del grado alcohólico aparente según la temperatura de lectura

Fuente: Cazorla y col., 2000.

i) Azúcares reductores

Se utilizó el método de Fehling. En primera instancia se preparó el reactivo de Fehling A y B. Se utilizó 50 mL de vino muestra y se adicionó 2 g de subacetato de plomo y 1 gr de carbón activado, se agitó y dejando 5 minutos en reposo se procedió a filtrar, así se obtuvo una muestra clara. En un matraz de Erlenmeyer se colocó 10 ml de Fehling A y 10 ml de Fehling B, se calentó hasta ebullición.

El título se realizó con solución de glucosa al 0,5 % hasta el viraje de azul claro, se adicionó de 2-3 gotas de

azul de metileno y se siguió titulando en caliente hasta que desaparezca el color azul y se anotó el gasto.

Fórmula: Ejemplo.

- V_g de Glucosa al 0,5 % = 24 mL
- Azúc. Red. (glucosa) del Fehling = $24 \times 5/1000$
Azúc. Red. (glucosa) del Fehling = 0,12 mL de glucosa en 1 L de agua destilada.
- Azúc. Red. (glucosa) del Vino = $1000 \times 0,12/60,6 = 1,9161$ g/L

2.4.9. Procesamiento y análisis de la Información

Se realizó tres repeticiones para cada experimento realizado; así mismo, para el análisis de datos obtenidos, en el caso del análisis analítico y sensorial, se realizó el análisis de varianza (ANVA) empleando la prueba F a un nivel de 0,05 de probabilidad. La comparación de los cuadrados medios entre los tratamientos se realizó con la prueba de significación de Tukey al 95 % de confiabilidad, para probar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos y elegir el mejor.

III. RESULTADOS

3.1. Aislamiento y conservación de levaduras nativas *Saccharomyces cerevisiae*

Las uvas obtenidas en los viñedos del INPREX, variedades Italia, Cabernet sauvignon y Negra criolla, fueron llevadas al laboratorio de la UNJBG, Facultad de Ciencias, y a partir del mosto de estas se realizaron fermentaciones espontáneas (por separado) sin sulfitado, con el fin de inducir el desarrollo en los mostos de las levaduras nativas.

A partir de dichas fermentaciones se hizo la toma de muestras según el recuento de células/mL, obteniéndose recuentos más altos los días 5to y 6to de fermentación con $1,6 \times 10^7$ células/mL en mostos de uva Italia, $4,2 \times 10^7$ en mostos de uva Cabernet sauvignon y $1,8 \times 10^8$ en mostos de uva Negra criolla. De acuerdo al protocolo de aislamiento mencionado en la metodología se logró obtener en medio Agar Papa Dextrosa (APD) un total de 18 morfologías coloniales, partiendo de la base de aquellas con características macroscópicas semejantes a *Saccharomyces cerevisiae*, es decir,

colonia crema, mantecosa, lisa, circular y muy prominente. Se purificó mediante repiques y examen microscópico.

El número total de aislamientos realizados fue de 18 cultivos puros. Según la procedencia del mosto, a cada cepa aislada se le asignó los siguientes códigos:

Tabla 1. Codificación de los cultivos puros aislados de *Saccharomyces*, procedentes de tres variedades de *Vitis vinífera* “uva”, del Instituto de Investigación, Producción y Extensión Agraria (INPREX) de Tacna.

Variedad de uva	Cultivos aislados	Código*
Italia (IT)	6	IT-01, IT-02, IT-03, IT-05, IT-06.
Cabernet sauvignon (CS)	6	CS-01, CS-02, CS-03, CS-04, CS-05, CS-06.
Negra criolla (NC)	6	NC-01, NC-02, NC-03, NC-04, NC-05, NC-06.
Control	1	CTRL

*Código: El primer carácter corresponde a la inicial de la variedad de uva y el último carácter es un número consecutivo del total de colonias puras aisladas.

Fuente: Elaboración propia.

3.2. Identificación de *Saccharomyces cerevisiae* nativas aisladas

Se aislaron 18 cultivos procedentes de las muestras de *Vitis vinífera* variedad Italia, Cabernet sauvignon y Negra criolla, todos los aislados se les sometió a las correspondientes pruebas de identificación (Tablas 2 al 5).

De estos aislados se identificaron un total de seis cultivos como *S. cerevisiae* nativas, dos de cada muestra de uva IT-03, IT-05, CS-01, CS-04, NC-02 y NC-06 (Tabla 6).

Los resultados de las observaciones microscópicas, que confirman la morfología celular típica de *S. cerevisiae* se pueden observar en la tabla 3. Donde todas las cepas aisladas están dentro de los parámetros taxonómicos, descritas por Kurtzman (1998).

Los resultados de la formación de pseudomicelio se describen en la tabla 4. Usando el método de la siembra por microcultivo, dieron positivo diez cultivos: IT-01, IT-03, IT-04, IT-05, CS-01, CS-04, NC-01, NC-02, NC-04, NC-05, NC-06 y para la levadura control.

Los resultados de las pruebas de esporulación se muestran en la Tabla 4. Se observaron esporas globosas o elipsoidales con una pared lisa, conteniendo entre 1 a 3 esporas por asca, que concuerdan con las descritas para *Saccharomyces cerevisiae* por Suarez Lepe (2004), Kurtzman (1998) y Barnett (1990). Dando positivo para las cepas IT-01, IT-02, IT-03, IT-05, CS-01, CS-03, CS-04, CS-06, NC-02, NC-06 y CRTL. Las cepas identificadas como *S. cerevisiae* fueron IT-03, IT-05, CS-01, CS-04, NC-02 y NC-06.

En la Tabla 5 se muestran los resultados de las pruebas de fermentación de glúcidos. Todas las cepas fermentaron la glucosa, resultando positivo. La fermentación de sacarosa, maltosa y galactosa fueron variables, para la levadura comercial resultó positivo en todas las fermentaciones y también para las cepas IT-03, IT-05, CS-01, CS-04, NC-02 y NC-06. Estas mismas cepas dieron lactosa negativa y fueron identificadas como *S. cerevisiae* nativas.

Tabla 2. Resultado de las características macroscópicas a partir de los 18 cultivos puros aislados, para la identificación de cepas *S. cerevisiae* nativas.

Cepas	Observación macroscópica					
	Forma	Color	Aspecto	Tamaño mm	Consistencia	Bordes
IT-01	Irregular	blanco	lisa y plana	3	cremosa	lisos
IT-02	Irregular	blanco	lisa y plana	2	cremosa	lisos
IT-03	Irregular	blanco	lisa y húmeda	1	cremosa	irregulares
IT-04	ovoide	blanco	lisa y plana	3	cremosa	lisos
IT-05	circular	blanco	lisa y húmeda	2	cremosa	irregulares
IT-06	convexo	crema	lisa y húmeda	2	cremosa	lisos
CS-01	circular	blanco	lisa y húmeda	2	cremosa	irregulares
CS-02	Irregular	blanco	lisa, plana y húmeda	1	cremosa	irregulares
CS-03	circular	crema	lisa y plana	2	cremosa	lisos
CS-04	circular	blanco	lisa, plana y húmeda	3	cremosa	irregulares
CS-05	ovoide	blanco	lisa y plana	1	cremosa	lisos
CS-06	circular	crema	lisa y plana	3	cremosa	irregulares
NC-01	Irregular	blanco	lisa y plana	2	cremosa	irregulares
NC-02	circular	blanco	lisa y brillante	1	cremosa	irregulares
NC-03	Irregular	blanco	lisa y plana	2	cremosa	lisos
NC-04	ovoide	blanco	lisa y plana	2	cremosa	irregulares
NC-05	ovoide	blanco	lisa y plana	3	cremosa	lisos
NC-06	circular	crema	lisa y húmeda	1	cremosa	irregulares
CTRL	circular	blanco	lisa y húmeda	2	cremosa	irregulares

CTRL : Control (Levadura comercial Fleishmann)

IT : Cultivos aislados de la uva Italia

CS : Cultivos aislados de la uva Cabernet sauvignon

NC : Cultivos aislados de la uva Negra criolla

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3. Resultado de las características microscópicas a partir de los 18 cultivos puros aislados, para la identificación de cepas *S. cerevisiae* nativas.

Cepas	Observación microscópica			
	Gram	Forma	Tamaño (µm)	Multiplicación
IT-01	Positivo	elipsoide	3,1 - 5,3	Gemación bipolar
IT-02	Positivo	Redonda	4,8 - 5,1	Gemación bipolar
IT-03	Positivo	elipsoide	4,7 - 6,0	Gemación multipolar
IT-04	Positivo	Redonda	5,2 - 5,6	Gemación bipolar
IT-05	Positivo	Ovoide	5,4 - 6,3	Gemación multipolar
IT-06	Positivo	Redonda	6,5 - 6,5	Gemación multipolar
CS-01	Positivo	elipsoide	5,1 - 7,2	Gemación multipolar
CS-02	Positivo	elipsoide	5,1 - 6,4	Gemación bipolar
CS-03	Positivo	Alargada	4 - 9,0	Gemación multipolar
CS-04	Positivo	Redonda	4,2 - 5,0	Gemación multipolar
CS-05	Positivo	elipsoide	3,8 - 5,3	Gemación bipolar
CS-06	Positivo	Alargada	3,2 - 6,7	Gemación multipolar
NC-01	Positivo	elipsoide	3,8 - 5,3	Gemación bipolar
NC-02	Positivo	elipsoide	3,3 - 5,1	Gemación multipolar
NC-03	Positivo	Alargada	5,3 - 10,2	Gemación multipolar
NC-04	Positivo	Alargada	3,1 - 6,4	Gemación multipolar
NC-05	Positivo	Redonda	3,3 - 3,5	Gemación multipolar
NC-06	Positivo	elipsoide	3,1 - 5,2	Gemación multipolar

CTRL : Control (Levadura comercial Fleishmann)
IT : Cultivos aislados de la uva Italia
CS : Cultivos aislados de la uva Cabernet sauvignon
NC : Cultivos aislados de la uva Negra criolla
Fuente: Elaboración propia.

Tabla 4. Resultados del método en Agar Gorodkowa, en base a la formación de ascosporas y formación de pseudomicelio a partir de los 18 cultivos puros aislados, para la identificación de cepas *Saccharomyces cerevisiae* nativas.

Cepas	Formación de Pseudomicelio	Formación de Ascosporas	Esporas por asca	Cepas identificadas como <i>S. cerevisiae</i>
IT-01	-	+	2	NO
IT-02	-	+	1	NO
IT-03	+	+	1	SÍ
IT-04	+	-	0	NO
IT-05	+	+	3	SÍ
IT-06	-	-	0	NO
CS-01	+	+	2	SÍ
CS-02	-	-	0	NO
CS-03	-	+	1	NO
CS-04	+	+	2	SÍ
CS-05	-	-	0	NO
CS-06	-	+	1	NO
NC-01	+	-	0	NO
NC-02	+	+	2	SÍ
NC-03	-	-	0	NO
NC-04	+	-	0	NO
NC-05	+	-	0	NO
NC-06	+	+	1	SÍ
CTRL	+	+	3	SÍ

CTRL : Control (Levadura comercial Fleishmann)
 IT : Cepa aislada de la uva Italia
 CS : Cepa aislada de la uva Cabernet sauvignon
 NC : Cepa aislada de la uva Negra criolla
 Fuente: Elaboración propia.

Tabla 5. Resultados de la fermentación de glúcidos, para la identificación de levaduras *S. cerevisiae* nativas procedentes de *Vitis vinífera* "uva".

Cepas	Fermentación de Glúcidos					Cepas identificadas como <i>S. cerevisiae</i>
	Sacarosa	Glucosa	Maltosa	Galactosa	Lactosa	
IT-01	+	+	+	-	-	NO
IT-02	+	+	+	+	+	NO
IT-03	+	+	+	+	-	SÍ
IT-04	-	+	-	+	-	NO
IT-05	+	+	+	+	-	SÍ
IT-06	+	+	+	+	+	NO
CS-01	+	+	+	+	-	SÍ
CS-02	+	+	+	-	+	NO
CS-03	-	+	-	+	-	NO
CS-04	+	+	+	+	-	SÍ
CS-05	+	+	-	-	+	NO
CS-06	+	+	+	+	+	NO
NC-01	-	+	+	+	-	NO
NC-02	+	+	+	+	-	SÍ
NC-03	-	+	+	+	-	NO
NC-04	-	+	+	-	+	NO
NC-05	+	+	-	+	-	NO
NC-06	+	+	+	+	-	SÍ
CTRL	+	+	+	+	-	SÍ

CTRL : Control (Levadura comercial Fleishmann)
 IT : Cepa aislada de la uva Italia
 CS : Cepa aislada de la uva Cabernet sauvignon
 NC : Cepa aislada de la uva Negra criolla
 Fuente: Elaboración propia.

Tabla 6. Resultado final de las cepas identificadas como *Saccharomyces cerevisiae* nativas, procedentes de las tres variedades de *Vitis vinífera* en estudio: Italia, Cabernet sauvignon y Negra criolla.

Cepas Identificadas	Variedad de uva	Tipo de vino
IT-03	Italia	Blanco
IT-05	Italia	Blanco
CS-01	Cabernet sauvignon	Tinto
CS-04	Cabernet sauvignon	Tinto
NC-02	Negra criolla	Tinto
NC-06	Negra criolla	Tinto

Fuente: Elaboración propia.

3.3. Selección de levaduras nativas *Saccharomyces cerevisiae*

Los resultados obtenidos en el proceso de selección fueron a partir de las seis cepas identificadas como *S. cerevisiae* nativas. El criterio de selección se realizó mediante la medición de la capacidad productora de alcohol, por el método de Davies y Griffith modificado. Los resultados de la producción de CO₂ en mL producido por cada cepa, al fermentar 20 mL de solución azucarada amortiguada durante 90 min se observan en la tabla 7. Se observa que los

valores máximos producidos fueron de la cepa IT-05 con 26,46 mL de CO₂, en base a sus tres repeticiones por cepa. La cepa que produjo menos CO₂ fue CS-01 con 1,43 mL, comparados con el control (levadura comercial Fleishmann) que produjo el más alto valor 28,63 mL de CO₂.

Los resultados en la producción de etanol (g/L/h) de las cepas identificadas como *Saccharomyces cerevisiae* nativas, en base a sus tres repeticiones, se detallan en la tabla 8. Donde la máxima producción fue de la cepa IT-05 con 4,08 g/L/h de etanol y la de menor producción la cepa CS-01 con 0,22 g/L/h de etanol (Figura 5).

Tabla 7. Mililitros de CO₂ producidos por cada cultivo identificado como *Saccharomyces cerevisiae* después de fermentar 20 mL de solución azucarada amortiguada a 30±1 °C con 0,06 g de inóculo hasta un tiempo de 90 minutos.

Cultivos	Rp.	ml de CO ₂ producidos a diferentes intervalos de tiempo*								
		10min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min	70 min	80 min	90 min
CTRL	R ₁	1,5	3,2	4,5	6,4	12,1	13,2	16,3	18,8	28,7
	R ₂	0,9	2,9	3,5	5,3	13,4	13,9	15,3	17,4	27,7
	R ₃	1,7	2,5	3,3	6,5	11,7	14,2	17,9	19,8	29,5
IT-03	R ₁	0,7	0,8	0,8	1,3	1,5	1,8	2,1	2,3	2,6
	R ₂	0,9	0,9	1,2	1,7	1,9	2,0	2,2	2,4	2,5
	R ₃	0,4	0,7	0,9	1,1	1,6	1,8	2,0	2,1	2,3
IT-05	R ₁	5,5	9,3	13,0	15,8	19,3	23,3	26,2	26,9	27,1
	R ₂	2,3	7,5	11,6	13,8	16,3	19,7	24,8	25,1	25,9
	R ₃	6,2	8,9	12,7	14,5	18,2	22,1	25,3	25,8	26,4
CS-01	R ₁	0,0	0,3	0,5	0,7	1,1	1,3	1,5	1,6	1,7
	R ₂	0,2	0,2	0,2	0,3	0,4	0,4	0,9	1,0	1,1
	R ₃	0,1	0,3	0,6	0,7	0,8	1,0	1,2	1,3	1,5
CS-04	R ₁	3,15	6,3	9,4	12,4	15,3	17,7	20,5	20,8	21,2
	R ₂	4,1	5,0	5,6	7,4	10,1	14,8	17,9	19,5	23,6
	R ₃	2,5	4,2	4,9	6,1	9,4	13,3	18,4	19,6	20,3
NC-02	R ₁	2,3	4,1	5,6	8,1	9,7	11,5	11,9	12,3	12,6
	R ₂	2,1	3,7	4,8	7,5	9,2	10,6	11,8	12,1	12,4
	R ₃	1,9	2,4	3,8	8,4	8,6	9,2	10,5	10,9	11,7
NC-06	R ₁	5,9	6,5	7,1	8,5	11,7	14,8	15,2	19,4	21,2
	R ₂	3,3	5,1	5,8	6,4	7,2	11,7	19,6	23,3	24,8
	R ₃	4,8	5,5	7,6	13,6	15,7	18,6	20,9	23,7	26,1

CTRL : Control (Levadura comercial Fleischmann)
IT : Cepa aislada de la uva Italia
CS : Cepa aislada de la uva Cabernet sauvignon
NC : Cepa aislada de la uva Negra criolla

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 8. Capacidad productora de alcohol de *Saccharomyces cerevisiae* nativas IT-03, IT-05, CS-01, CS-04, NC-02, NC-06 y CTRL (Control), aisladas de tres variedades de *Vitis vinífera* “uva” Italia, Cabernet sauvignon y Negra criolla de los viñedos del INPREX en Tacna.

Repeticiones	g/L/h de etanol producidos por cultivos						
	IT-03	IT-05	CS-01	CS-04	NC-02	NC-06	CTRL
R₁	0,40	4,18	0,26	3,27	1,94	3,27	4,42
R₂	0,38	3,99	0,16	3,64	1,91	3,82	4,27
R₃	0,35	4,07	0,23	3,13	1,80	4,02	4,55
Promedio	0,38	4,08	0,22	3,35	1,88	3,70	4,41

Fuente: Elaboración propia.

Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza, para determinar si hay diferencias significativas entre los tratamientos, donde la capacidad productora de etanol entre las cepas resultó altamente significativa (Tabla 9), con un nivel de confianza del 95 %, resaltando que existen diferencias reales entre sus promedios. Para determinar cuáles son las mejores cepas productoras de etanol y así seleccionar una de ellas, se procedió a realizar la prueba de significación de Tukey (Tabla 10).

Tabla 9. Análisis de varianza para la medición de la capacidad productora de alcohol de *Saccharomyces cerevisiae* nativas aisladas e identificadas.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F** calculado	F tabular	
					0,05	0,01
Tratamientos	6	55,15	9,193	249,71	2,847	4,455
Error exp	14	0,515	0,036			
TOTAL	20	55,67				

** : Altamente significativo

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 10. Prueba de significación de Tukey para la medición de la capacidad productora de alcohol de *Saccharomyces cerevisiae* nativas aisladas e identificadas.

O.M.	Tratamientos (Cepa)	Promedio (g/L/h de etanol)	Significación* α 0,05
1	CTRL	4,41	a
2	IT-05	4,08	b
3	NC-06	3,70	c
4	CS-04	3,35	d
5	NC-02	1,88	e
6	IT-03	0,38	f
7	CS-01	0,22	f

* : Letras iguales no difieren estadísticamente $p < 0,05$

CTRL : Control (Levadura comercial Fleishmann)

IT : Cepa aislada de la uva Italia

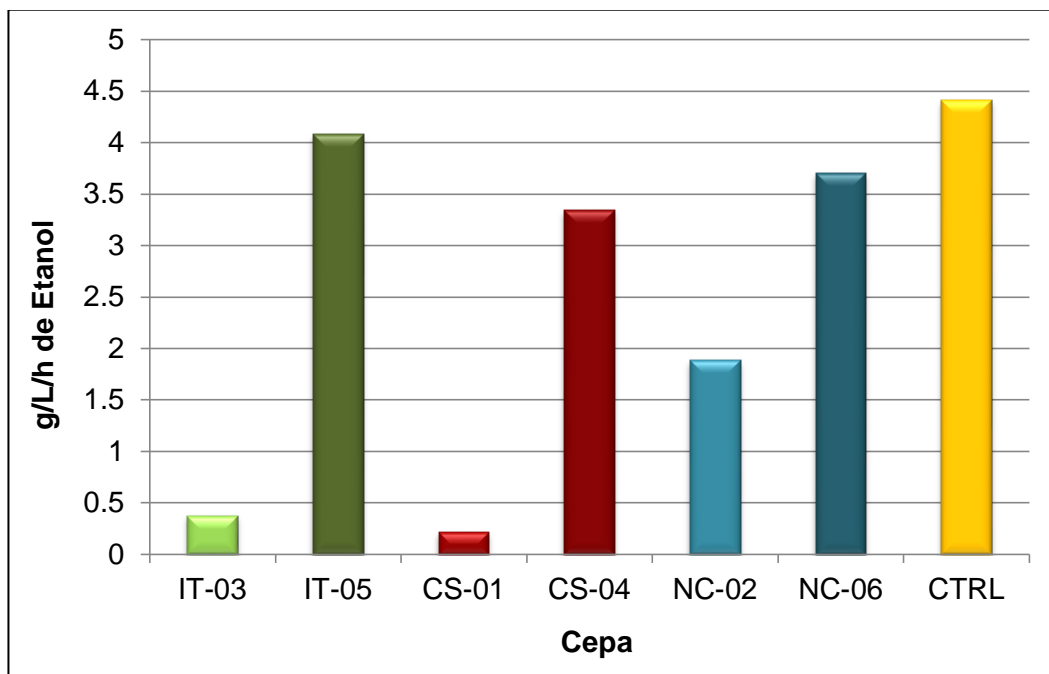
CS : Cepa aislada de la uva Cabernet sauvignon

NC : Cepa aislada de la uva Negra criolla

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación:

En la tabla 10 se observa que la cepa IT-05 superó estadísticamente en promedio al resto de cepas con la producción de 4,08 g/L/h de etanol, aunque este valor fue menor al producido por el cultivo control (levadura comercial Fleishmann), que produjo 4,41 g/L/h de etanol. La cepa de menor producción fue la CS-01 con 0,22 g/L/h de etanol. Finalmente, se seleccionó la cepa nativa con mayor capacidad de producción de etanol, porque es la que mejor tolerará concentraciones altas de alcohol producido y por su capacidad fermentativa.



IT-03 y 05 = Cepa aislada de la variedad Italia
 CS-01 y CS-04 = Cepa aislada de la variedad Cabernet sauvignon
 NC-02 y NC-06 = Cepa aislada de la variedad Negra criolla
 CNTRL = Levadura comercial Fleishman

Figura 5. Resultados de los gramos litros de etanol producidos por cada cepa identificada de *S. cerevisiae*, al fermentar durante 90 minutos mediante el método de Davies y Griffith modificado, con 0,06 g de inóculo, en base a tres repeticiones.

Fuente: Elaboración propia.

3.4. Inóculo. Crecimiento en biomasa

La cepa seleccionada IT-05, identificada como *S. cerevisiae* nativas, se masificó en mostos estériles de estudio por duplicado, con el fin de obtener colonias que se conviertan en “pie de cuba” al 5 %. Para esto pasado las 48 horas de incubación se tuvo en cuenta el conteo de células/mL, donde los resultados finales fueron los siguientes:

Tabla 11. Crecimiento de biomasa de la cepa IT-05, que servirá como inóculo para mostos experimentales, por duplicado.

Mosto experimental estéril	Volumen final al 5 %	Células/mL final 1	Células/mL final 2
Italia	100 mL	$6,2 \times 10^7$	$4,3 \times 10^7$
Cabernet sauvignon	100 mL	$1,4 \times 10^7$	$2,1 \times 10^7$
Negra criolla	100 mL	5×10^7	$3,2 \times 10^7$

Fuente: Elaboración propia

3.5. Vinificación en Bodega. Monitoreo y control físico-químico

La cepa nativa seleccionada IT-05 luego de masificada, fue utilizada para realizar las vinificaciones en la bodega enológica del Instituto de Investigación, Producción y Extensión Agraria de Tacna (INPREX), siendo inoculadas directamente en cada depósito para dar inicio a la vinificación experimental. Los depósitos contuvieron, por separado, mostos de uvas de la variedad Italia (VIT), Cabernet sauvignon (VCS) y Negra criolla (VNC) (Tabla 12). La temperatura de vinificación osciló entre 19°C y 22°C. Durante la fermentación se realizó un seguimiento diario del °Brix, temperatura, densidad en °Bé y pH.

Tabla 12. Códigos de mostos/vinos experimentales y controles.

Código de Mosto/Vino	Variedad de uva	Tipo de vino
VIT-C	Vino Italia Control	Blanco
VIT-E1	Vino Italia Experimental 1	Blanco
VIT-E2	Vino Italia Experimental 2	Blanco
VCS-C	Vino Cabernet sauvignon Control	Tinto
VCS-E1	Vino Cabernet sauvignon 1	Tinto
VCS-E2	Vino Cabernet sauvignon 2	Tinto
VNC-C	Vino Negra criolla Control	Tinto
VNC-E1	Vino Negra criolla Experimental 1	Tinto
VNC-E2	Vino Negra criolla Experimental 2	Tinto

Fuente: Elaboración propia

En la figura 6 se observan los resultados del monitoreo y control de los °Brix durante la fermentación.

Para la variedad Italia hubo diferencias entre el grupo experimental y el control, donde VIT-C terminó en 8 días la fermentación, es decir que fue más rápida a comparación con el grupo experimental, que duró 12 días en total. El VIT-C finalizó con 7,57 °Brix, VIT-E1 con 6,83 °Brix y VIT-E2 con 6,73 °Brix, en promedio de sus tres repeticiones, no hubo diferencia significativa en sus datos finales(Anexo 7).

En los mostos de uva de la variedad Cabernet sauvignon, la evolución durante la fermentación fue semejante, por ello no arrojó diferencias significativas entre grupos experimentales y el grupo control. Los °Brix finalizaron de la siguiente manera, para VCS-C con 7,37 °Brix; VCS-E1 con 7,33 °Brix y VCS-E2 con 7,43 °Brix (Anexo 8).

De la misma manera para los mostos de uva de la variedad Negra criolla, la fermentación duró un tiempo total de quince días, no hubo diferencias significativas, y el comportamiento de ambos grupos durante la fermentación fue semejante. Los grados Brix

finalizaron de la siguiente manera, para VNC-C con 8,77 °Brix; VNC-E1 con 9,37 °Brix y VNC-E2 con 9,27 °Brix (Anexo 9).

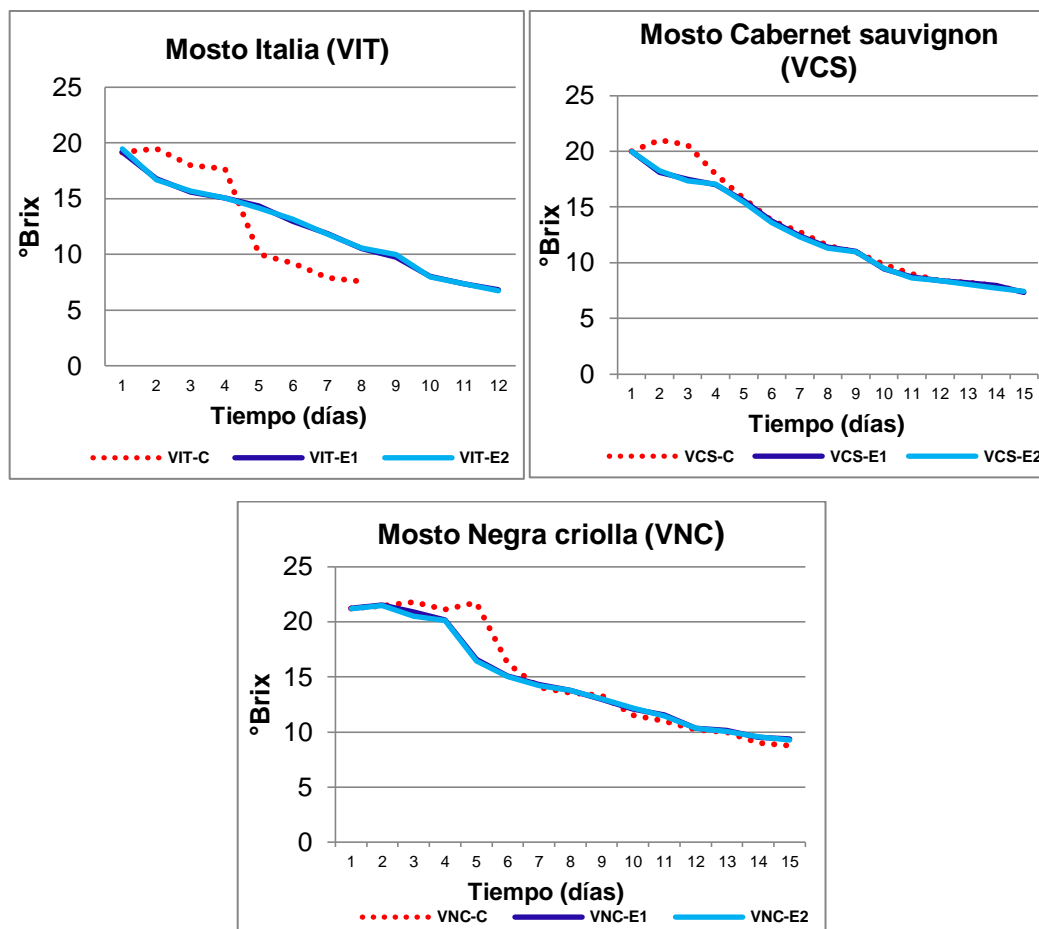


Figura 6. Monitoreo de los °Brix registrados en el proceso de vinificación experimental, con la levadura nativa IT-05 seleccionada e inoculada en mostos de la variedad Italia (VIT-E1 y VIT-E2), Cabernet sauvignon (VCS-E1 y VCS-E2) y Negra criolla (VNC-E1 y VNC-E2), frente a sus controles correspondientes (VIT-C, VCS-C y VNC-C).

Fuente: Elaboración propia.

Los grados Baumé evaluados durante la fermentación se muestran en la Figura 7. Los mostos de uva de la variedad Italia, empezaron en promedio con 11,5 °Bé. En el caso de VIT-C, los azúcares fueron degradados en menor tiempo, es decir que hubo una gran diferencia frente al grupo experimental VIT-E1 y VIT-E2, pero todos los mostos llegaron a 0 °Bé, como indicador final de la ausencia de azúcares y obteniéndose un vino blanco seco (Anexo 10).

Los mostos de uva de la variedad Cabernet sauvignon, en promedio iniciaron con 11,5 °Bé. Ambos grupos; el experimental VCS-E1 y VCS-E2, frente al control VCS-C, tuvieron un semejante comportamiento en toda la etapa fermentativa. Estos llegaron a 0 °Bé a excepción del control que terminó con 0,17 °Bé. En total duró 15 días la evaluación registrada, obteniéndose un vino tinto seco (Anexo 11).

De la misma forma, para los mostos de uva de la variedad Negra criolla, que empezaron la fermentación en promedio con 12 °Bé, entre los mostos del grupo experimental existió una evolución semejante y también frente al grupo control. Los resultados finales

fueron: VNC-C con 0,43 °Bé, VNC-E1 con 0,93 °Bé y VNC-E2 con 0,43 °Bé. La evaluación duró 15 días, obteniéndose un vino tinto seco (Anexo 12).

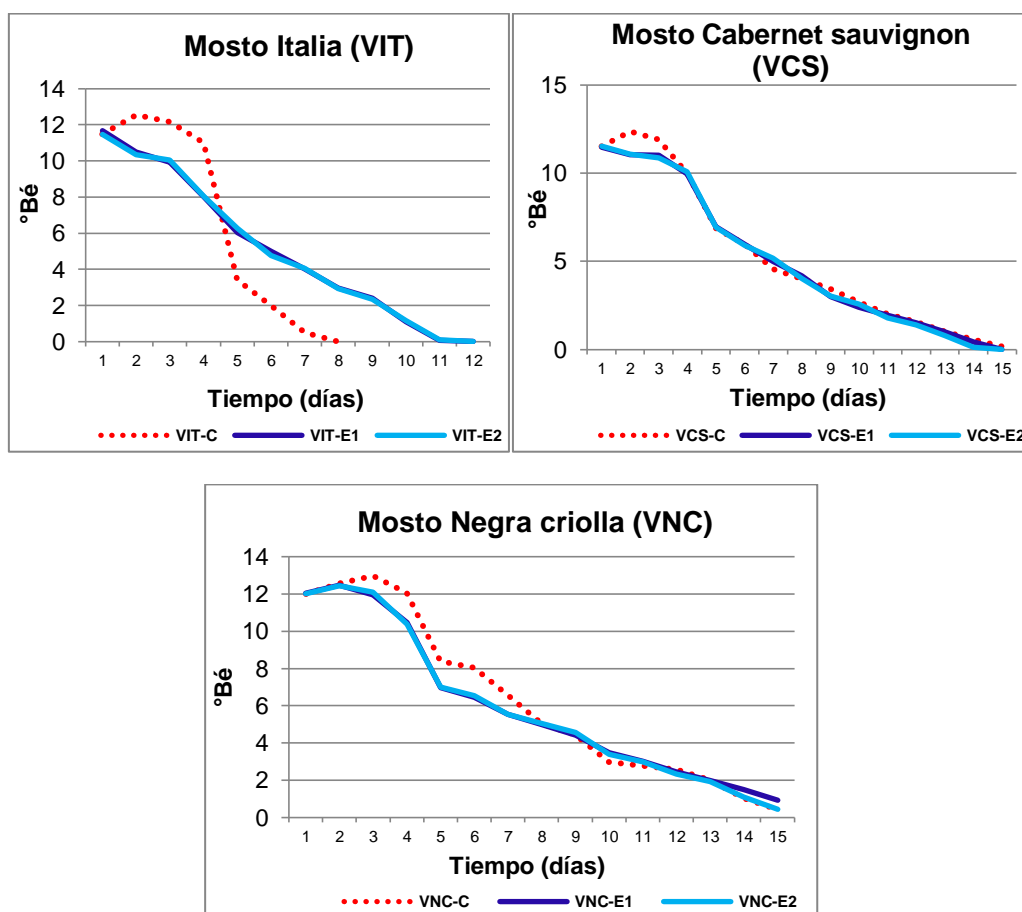


Figura 7. Monitoreo de los °Bé registrados en el proceso de vinificación experimental, con la levadura nativa IT-05seleccionada e inoculada en mostos de la variedad Italia (VIT-E1 y VIT-E2), Cabernet sauvignon (VCS-E1 y VCS-E2) y Negra criolla (VNC-E1 y VNC-E2), frente a sus controles correspondientes (VIT-C, VCS-C y VNC-C).

Fuente: Elaboración propia.

En la figura 8, se observa la evolución del pH registrada en el proceso de vinificación experimental, resultando sin diferencias significativas para todos los mostos en estudio. Cabe resaltar que los pH fueron descendiendo durante el tiempo de fermentación.

El VIT-C dio inicio con un pH de 3,98 y finalizó con 3,60. El grupo experimental en promedio, empezó con 4,0 pH y culminó con 3,65 pH (Anexo 13).

Para los mostos de uva de la variedad Cabernet sauvignon, en promedio, iniciaron todos los grupos con 3,9 pH. A diferencia de VCS-E1 y VCS-E2 que culminaron con 3,7 pH, el VCS-C finalizó con 3,56 pH (Anexo 14).

Finalmente, para los mostos de uva de la variedad Negra criolla, iniciaron con 3,9 pH y culminaron con 3,6 pH (Anexo 15).

En la figura 9 se observa los resultados del registro de temperatura evaluados durante la fermentación, en promedio a sus tres repeticiones, no resultó con diferencias significativa frente al

grupo control, para todos los mostos de uvas en estudio (Anexos 16 al 18).

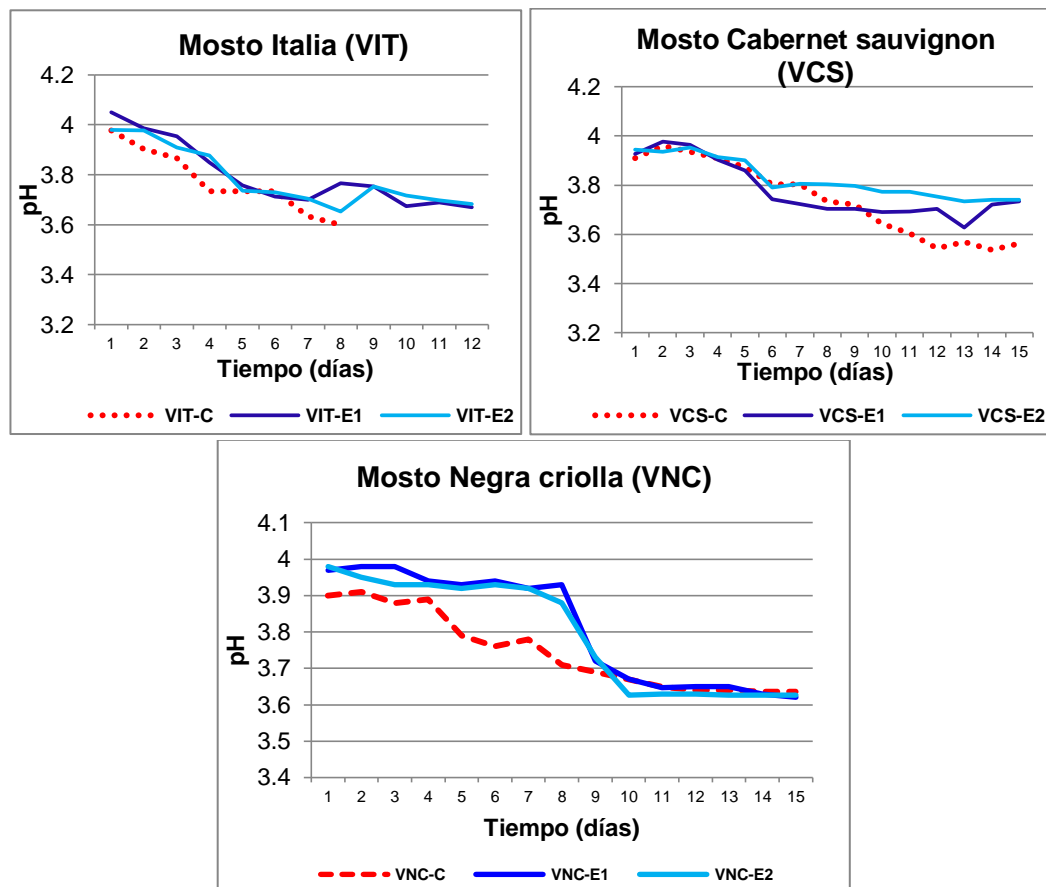


Figura 8. Monitoreo del pH registrados en el proceso de vinificación experimental, con la levadura nativa IT-05 seleccionada e inoculada en mostos de la variedad Italia (VIT-E1 y VIT-E2), Cabernet sauvignon (VCS-E1 y VCS-E2) y Negra criolla (VNC-E1 y VNC-E2), frente a sus controles correspondientes (VIT-C, VCS-C y VNC-C).

Fuente: Elaboración propia.

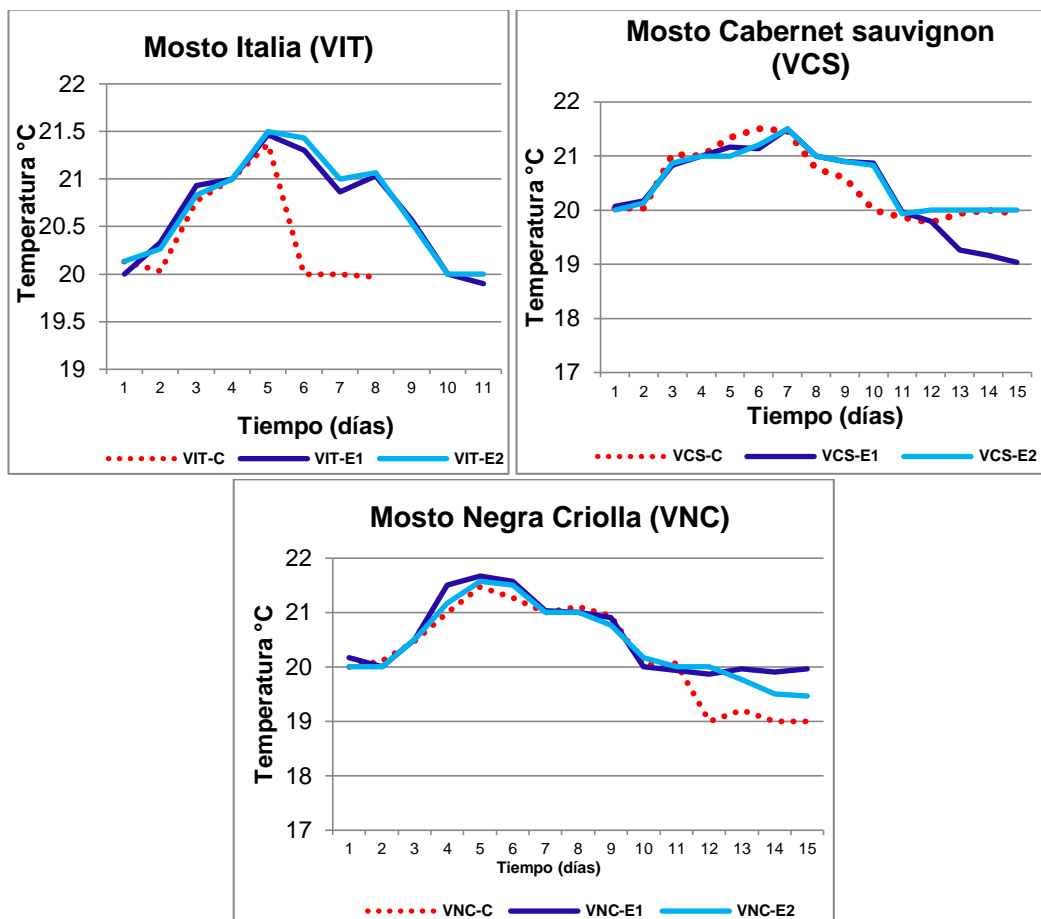


Figura 9. Monitoreo de temperatura (°C) registrados en el proceso de vinificación experimental, con la levadura nativa IT-05 seleccionada e inoculada en mostos de la variedad Italia (VIT-E1 y VIT-E2), Cabernet sauvignon (VCS-E1 y VCS-E2) y Negra criolla (VNC-E1 y VNC-E2), frente a sus controles correspondientes (VIT-C, VCS-C y VNC-C).

Fuente: Elaboración propia.

3.6. Evaluación Sensorial

El modelo de ficha elegida de la O.I.V. permitió describir las características del vino, otorgándoles una puntuación y así establecer una clasificación de los distintos vinos en función de su calidad.

Del ANVA realizado resultó significativa para los vinos tintos Cabernet sauvignon y Negra criolla, entre sus tratamientos, más no para los vinos blancos Italia.

Tabla 13. Resumen general del ANVA, para la evaluación sensorial de los vinos VIT, VCS y VNC.

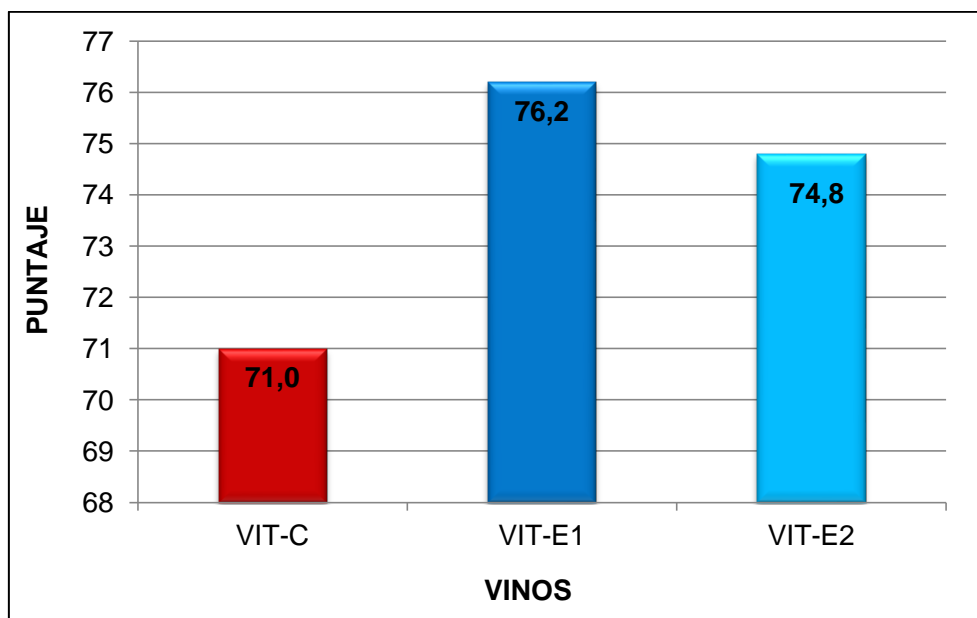
Fuentes de variación	Grados de libertad	CM ₁ *	CM ₂	CM ₃
Tratamientos	2	36,20	31,40	20,87
Error exp.	12	17,63	4,60	3,17
TOTAL	14			

* No significativo

CM : Cuadrados medios (CM₁: Vino Italia; CM₂: Vino Cabernet sauvignon y CM₃: Vino Negra criolla)

Fuente: Elaboración propia.

Los vinos blancos de la variedad de *Vitis vinífera* Italia, no mostraron en sus resultados diferencias significativas entre sus tratamientos. El puntaje más alto fue 76,2 (VIT-E1), superando al vino control (VIT-C) que obtuvo 71 puntos.



VIT-C : Vino blanco Italia control (sin inóculo)
VIT-E1: Vino blanco Italia experimental 1(cepa IT-05)
VIT-E2: Vino blanco Italia experimental 2 (cepa IT-05)

Figura 10. Resultado final del análisis sensorial, ficha de cata de la O.I.V., para los vinos blancos variedad de uva Italia.

Fuente : Elaboración propia.

Para los vinos Cabernet sauvignon los tratamientos resultaron con diferencias significativas con un nivel de confianza del 95 %. Se determinó los mejores puntajes entre los vinos mediante la prueba de Tukey con significación α 0,05.

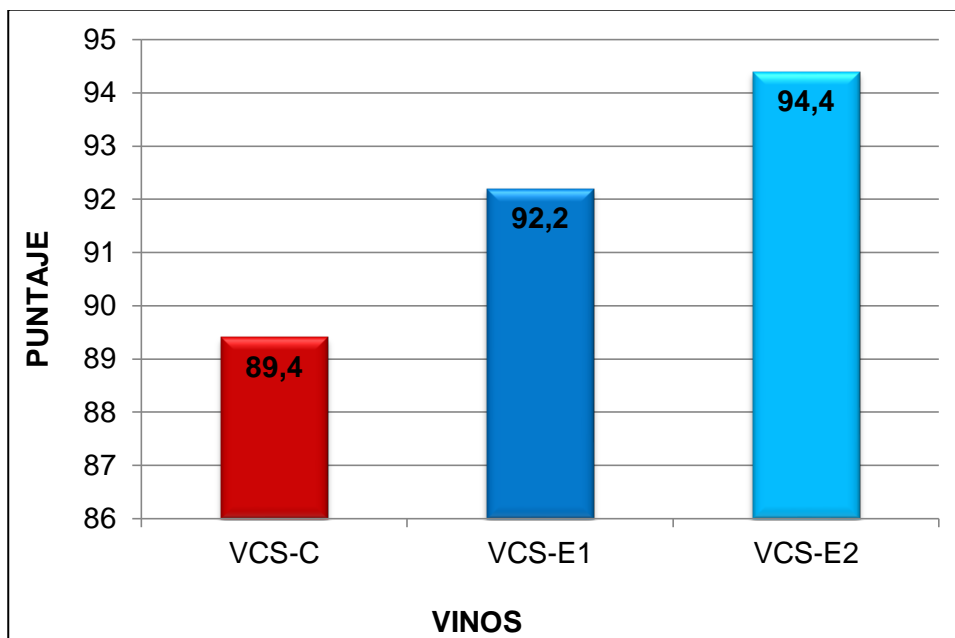
Tabla 14. Prueba de significación de Tukey para el análisis sensorial de vinos tintos Cabernet sauvignon

O.M.	Vinos	Promedio (puntaje)	Significación* α 0,05
1	VCS-E2	94,4	a
2	VCS-E1	92,2	a b
3	VCS-C	89,4	b

* : Letras iguales no difieren estadísticamente $p < 0,05$
VCS-C : Vino tinto Cabernet sauvignon control (sin inóculo)
VCS-E1 : Vino tinto Cabernet sauvignon experimental 1
VCS-E2 : Vino tinto Cabernet sauvignon experimental 2
Fuente: Elaboración propia.

Interpretación:

En la tabla 14 se observa que el vino experimental (VCS-E2) obtuvo un puntaje total máximo de 94,4, superando al vino control (VCS-C) con 89,4 puntos y por lo tanto, se elige como el vino de mayor calidad organoléptica.



VCS-C : Vino tinto Cabernet sauvignon control (sin inóculo)

VCS-E1 : Vino tinto Cabernet sauvignon experimental 1(cepa IT-05)

VCS-E2: Vino tinto Cabernet sauvignon experimental 2 (cepa IT-05)

Figura 11. Resultado final del análisis sensorial, ficha de cata de la O.I.V., para los vinos tintos variedad de uva Cabernet sauvignon.

Fuente : Elaboración propia.

Los resultados obtenidos en la evaluación organoléptica de los vinos de la variedad de *Vitis vinífera* Negra criolla fueron estadísticamente significativos por sus diferencias con un nivel de confianza del 95 % en el ANVA. El mejor vino evaluado en la cata, se determinó mediante la prueba de Tukey con significación α 0,05.

Tabla 15. Prueba de significación de Tukey para el análisis organoléptico de vinos tintos Negra criolla.

O.M.	Vinos	Promedio (puntaje)	Significación* α 0,05
1	VNC-E1	71,6	a
2	VNC-E2	71,0	a
3	VNC-C	67,8	b

*Letras iguales no difieren estadísticamente $p < 0,05$

VNC-C : Vino tinto Negra criolla control (sin inóculo)

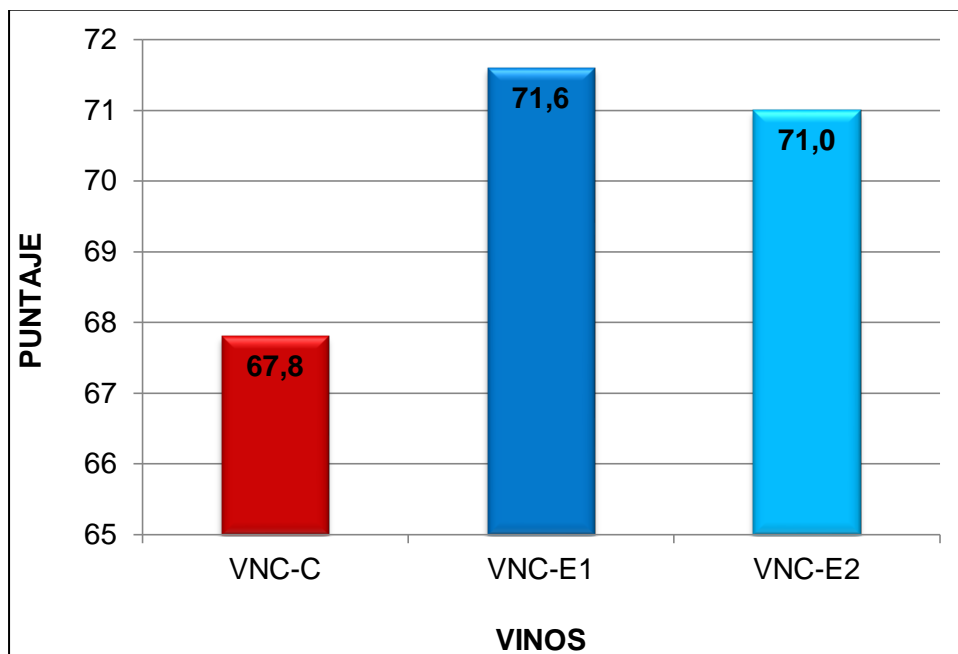
VNC-E1 : Vino tinto Negra criolla experimental 1 (cepa IT-05)

VNC-E2 : Vino tinto Negra criolla experimental 2 (cepa IT-05)

Fuente : Elaboración propia.

Interpretación:

En la tabla 15 se observa que los vinos experimentales VNC-E1 y VCS-E2 no difieren entre sí, pero son significativos con respecto al vino control VNC-C, superándolo en puntaje y por lo tanto, el vino resulta con mayor calidad organoléptica.



VNC-C : Vino tinto Negra criolla control (sin inóculo)
 VNC-E1: Vino tinto Negra criolla experimental 1(cepa IT-05)
 VNC-E2: Vino tinto Negra criolla experimental 2 (cepa IT-05)

Figura 12. Resultado final del análisis sensorial, ficha de cata de la O.I.V., para los vinos tintos variedad de uva Negra criolla

Fuente : Elaboración propia.

3.7. Evaluación analítica

Se realizó el análisis de los principales parámetros enológicos en los vinos elaborados con la cepa nativa seleccionada IT-05 *S. cerevisiae*. Transcurridos los 6 meses de maduración se procedió a

los análisis. Los parámetros evaluados fueron: acidez total, acidez volátil, anhídrido sulfuroso total, grado alcohólico, azúcares reductores y pH, que se describen a continuación (Ver anexos 19 al 21).

Los resultados de los análisis para cada uno de los vinos se presentan en los siguientes apartados.

3.7.1. Vino blanco Italia

En la siguiente tabla 16, se observa los resultados de los diferentes criterios de evaluación analítica sometidos al análisis de varianza con un nivel de confianza del 95 %. Donde en manera resumida muestra que, sólo para el análisis de los grados alcohólicos existieron diferencias altamente significativas entre tratamientos (VIT-C, VIT-E1 y VIT-E2) (Tabla 17 y 18). Seguidamente, se detalla los resultados de los otros análisis analíticos realizados.

Tabla 16. Resumen general del ANVA, para los criterios de evaluación analítica de los vinos blancos Italia (VIT)

Fuentes de variación	Grados de libertad	CM ₁	CM ₂	CM ₃ **	CM ₄	CM ₅	CM ₆
Tratamientos	2	0,307	0,0003	1,603	0,2805	533,6162	0,0004
Error exp.	6	0,069	0,0092	0,075	0,1068	251,892	0,0459
TOTAL	8						

**Altamente significativo

CM₁: Acidez total (g/L); CM₂: Acidez volátil (g/L); CM₃: Grado alcohólico (% vol); CM₄: Azúcar reductor (g/L); CM₅: SO₂ total (mg/L) y CM₆: pH.

Fuente: Elaboración propia.

▪ Análisis de la acidez total

Resultó dentro del rango permitido. La acidez mayor fue de VIT-E1 (5,6 g/L) y la menor de VIT-C (5,0 g/L). En ambos casos resultó elevada la acidez total final, ya que inició con una acidez más baja (entre 3-4 g/L). Estadísticamente no hubo diferencias significativas entre los tratamientos.

- **Análisis de acidez volátil**

En los vinos resultantes su acidez volátil estuvo al límite de lo permitido por la norma, es decir que tuvo una elevada acidez volátil. La máxima fue 1,2 g/L (VIT-E2) casi igual al de VIT-E1 y la mínima fue del control con 1,0 g/L (VIT-C). Estadísticamente no hubo diferencias significativas entre los tratamientos.

- **Análisis de grados alcohólicos**

El ANVA (Tabla 17) resultó con diferencias significativas entre los vinos producidos (tratamientos: VIT-C, VIT-E1 y VIT-E2). El máximo total de alcohol fue de VIT-E2 con 10,5 % vol. El vino control (VIT-C) fue el que resultó con menor grado alcohólico 9,07 % vol. Para determinar cuál fue el que produjo mayor alcohol, se procedió al análisis estadístico de Tukey, con 0,05 de significación (Tabla 18).

Tabla 17. Análisis de varianza para los grados alcohólicos de vinos blancos, variedad de uva Italia.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	F tabular	
					0,05	0,01
Tratamientos	2	3,206	1,603	21,22**	5,143	10,924
Error exp	6	0,453	0,075			
TOTAL	8	3,66				

** : Altamente significativo

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 18. Prueba de significación de Tukey para los grados alcohólicos de vinos blancos, variedad de uva Italia.

O.M.	Vinos	Promedio (mg/L)	Significación* α 0,05
1	VIT-E2	10,5	a
2	VIT-E1	10,3	a
3	VIT-C	9,07	b

* : Letras iguales no difieren estadísticamente $p < 0,05$

VIT-C : Vino blanco Italia control (sin inóculo)

VIT-E1 :Vino blanco Italia experimental 1

VIT-E2 :Vino blanco Italia experimental 2

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación: Se observa que los vinos VIT-E2 y VIT-E1 superaron estadísticamente en promedio al vino control VIT-C. Ocupando el 1er lugar el VIT-E2 con 10,5 % vol.

- **Análisis de anhídrido sulfuroso**

No hubo diferencias significativas entre los tratamientos. Los resultados se encontraron dentro de los parámetros permitidos por la norma técnica peruana. El mayor fue del VIT-C (195,06 mg/L) y el menor del VIT-E2 (169,18 mg/L).

- **Análisis de azúcares reductores**

El mayor fue del VIT-E1 con 2,07 g/L y el menor del VIT-E2 con 1,46 g/L; estadísticamente resultaron no significativos frente al control VIT-C (1,8 g/L) y no hubo diferencias entre los dos experimentales.

- **Análisis de pH**

El mayor fue del VIT-C (3,91 g/L) y el menor del VIT-E2 (3,88pH); siendo no significativos. Resultando superior al mosto yema, después de finalizada la fermentación (3,6 pH).

3.7.2. Vino tinto Cabernet sauvignon

Los resultados del estudio analítico fueron sometidos al ANVA (Tabla 19), observándose que sólo difieren en los valores resultantes de Anhídrido sulfuroso total, en base a sus tres repeticiones de VCS-C, VCS-E1 y VCS-E2, con un nivel de confianza del 95 % (Tabla 20 y 21). Posteriormente, se describen los resultados de los otros criterios evaluados, pero que no fueron estadísticamente significativos.

Tabla 19. Resumen general del ANVA, para los criterios de evaluación analítica de los vinos tintos Cabernet sauvignon (VCS)

Fuentes de variación	Grados de libertad	CM ₁	CM ₂	CM ₃	CM ₄	CM ₅ **	CM ₆
Tratamientos	2	0,032	0,017	0,067	0,103	185,021	0,002
Error exp.	6	1,083	0,023	0,67	0,364	15,718	0,052
TOTAL	8						

**Altamente significativo

CM₁: Acidez total (g/L); CM₂: Acidez volátil (g/L); CM₃: Grado alcohólico (% vol); CM₄: Azúcar reductor (g/L); CM₅: SO₂ total (mg/L) y CM₆: pH.

Fuente: Elaboración propia.

- **Análisis de acidez total**

Resultó el ANVA sin diferencias significativas, la acidez total está dentro de los márgenes normales (3–7g/L TH₂). El mayor total fue 5,04 g/L (VCS-E2) y la mínima 4,83 g/L expresado en ác. Tartárico (VCS-C), en base a sus tres repeticiones.

- **Análisis de acidez volátil**

En la mayoría de los vinos fue medianamente baja. Correspondiendo al menor valor al control VCS-C (0,43 g/L) y el más alto lo obtuvo el VCS-E1 (0,58 g/L). Las comparaciones resultaron estadísticamente no significativas.

- **Análisis de grados alcohólicos**

En promedio resultaron sin diferencias significativas. El mayor valor fue de VCS-C (11,83 % vol) y el mínimo de uno de los vinos experimentales VCS-E2 (11,53 % vol).

- **Análisis de azúcares reductores**

Resultaron estadísticamente no significativos. El valor mayor fue de VCS-C (2,5 g/L), le sigue el VCS-E2 (2,22 g/L) y el menor valor lo obtuvo VCS-E1 (2,15 g/L).

- **Análisis de pH**

Los vinos inoculados obtuvieron un similar valor; VCS-E1 (3,7 pH) y VCS-E2 (3,66 pH); frente al vino control VCS-C (3,65 pH), por lo tanto, no hay diferencias significativas entre sí.

- **Análisis de anhídrido sulfuroso total**

El ANVA para este análisis resultó significativa entre los vinos de la variedad *Vitis vinífera* Cabernet sauvignon (VCS-C, VCS-E1 y VCS-2), con un nivel de confianza del 95 % (Tabla 20).

Para determinar cuál es el vino con mayor contenido de anhídrido sulfuroso (mg/L) se procedió a realizar la prueba de significación de Tukey (Tabla 21).

Tabla 20. Análisis de varianza para el SO₂ total de vinos tintos Cabernet sauvignon.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	F tabular	
					0,05	0,01
Tratamientos	2	379,042	185,021	11,771**	5,143	10,924
Error exp.	6	94,309	15,718			
TOTAL	8	464,352				

** : Altamente significativo

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 21. Prueba de significación de Tukey para el SO₂ total de vinos tintos Cabernet sauvignon

O.M.	Vinos	Promedio (mg/L)	Significación* α 0,05
1	VCS-C	115,13	a
2	VCS-E2	101,87	b
3	VCS-E1	101,2	b

* : Letras iguales no difieren estadísticamente $p < 0,05$

VCS-C : Vino tinto Cabernet sauvignon control (sin inóculo)

VCS-E1 : Vino tinto Cabernet sauvignon experimental 1

VCS-E2 : Vino tinto Cabernet sauvignon experimental 2

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación: Se observa que el vino con mayor nivel de SO₂ total fue VCS-C (115,13 mg/L). El grupo experimental tuvo un resultado menor, pero entre sí semejante, siendo este VCS-E1 (101,2 mg/L) y VCS-E2 (101,87 mg/L).

3.7.3. Vino tinto Negra criolla

En el ANVA (Tabla 22) no existieron diferencias significativas entre los tratamientos (VNC-C, VNC-E1 y VNC-E2), para ninguno de los estudios analíticos evaluados. Las diferencias surgieron al comparar los resultados con la NTP 212.014:2011 (Anexo 22), que posteriormente será discutida.

Tabla 22. Resumen general del ANVA, para los criterios de evaluación analítica de los vinos tintos Negra criolla (VNC)

Fuentes de variación	Grados de libertad	CM ₁	CM ₂	CM ₃	CM ₄	CM ₅	CM ₆
Tratamientos	2	0,018	0,005	0,468	0,030	133,778	0,023
Error exp.	6	0,180	0,007	0,334	0,211	116,521	0,025
TOTAL	8						

CM₁: Acidez total (g/L); CM₂: Acidez volátil (g/L); CM₃: Grado alcohólico (% vol); CM₄: Azúcar reductor (g/L); CM₅: SO₂ total (mg/L) y CM₆: pH.
Fuente: Elaboración propia.

- **Análisis de acidez total**

El mayor valor fue para VNC-E1 (6,07 g/L TH₂) y el menor para VNC-C (5,92 g/L).

- **Análisis de acidez volátil**

Presentó en todos los vinos una alta acidez volátil. El mayor valor corresponde a VNC-E1 (1,41 g/L ác. acético) y el menor fue el VNC-E2 (1,34 g/L). Resultó estadísticamente no significativo con respecto al control VNC-C y entre sí.

- **Análisis de grados alcohólicos**

Resultó con una elevada producción de alcohol, siendo el de más alto valor VNC-E2 (12,2 % vol) y el de menor producción el VCS-E1 (11,5 % vol), pero sin diferencias significativas entre los tratamientos.

- **Análisis de azúcares reductores**

En promedio a sus tres repeticiones no resultó significativo. El mayor valor lo obtuvo VNC-E1 (3,18 g/L).

- **Análisis de anhídrido sulfuroso**

Los valores de todos los vinos resultaron elevados, según el rango normal permitido. El mayor valor lo obtuvo VNC-C (177,12 mg/L) y el mínimo el VNC-E2 (164,45). Por lo tanto, según ANVA no hubo diferencias significativas entre los tratamientos.

- **Análisis de pH**

El pH resultante para los vinos fue alto llegando a un máximo de 4,01 pH (VNC-E1) y un mínimo valor de 3,84 pH (VNC-E2). Ambos vinos experimentales no difirieron frente al vino control (VNC-C con 3,93 pH).

IV. DISCUSIÓN

Aislamiento de levaduras nativas

Fleet y Hear (1993) señalan que debido a la dominancia de *S. cerevisiae* en todas las fermentaciones vónicas, ha sido universalmente aceptada como la principal levadura del vino. Teniendo en cuenta que ciertas estirpes o cepas producen mejores vinos que otras, se considera que las levaduras seleccionadas para vinificación deben ser de esta especie.

Las levaduras provinieron de mostos de tres diferentes variedades de *Vitis vinífera* en estudio, permitiendo aislar levaduras nativas. Las muestras para el aislamiento de las levaduras nativas fueron tomadas de estos mostos durante la etapa final de sus fermentaciones, sabiendo que el género *Saccharomyces* (Navarre, 1998), debido al incremento de la concentración de alcohol y de las condiciones de anaerobiosis, pasa a ser la levadura dominante, pues las levaduras de la primera fase de la etapa fermentativa, levaduras apiculadas, (los géneros *Cándida*, *Debarymyces*,

Dekkera, *Hanseniaspora*, *Metschnilowia*, *Pichia*, *Torulaspory* *Zigosaccharomyces*) han desaparecido.

Saccharomyces es la responsable de la fermentación desde las primeras etapas hasta su finalización (Anexo 23). Este género se caracteriza de poder alcohógeno variado de 8 a 16 °GL, inclusive puede sobrepasar 18 °GL en condiciones especiales (Peynaud, 1977). Durante la fermentación alcohólica las cepas que predominan son las mejores adaptadas a crecer en las condiciones del mosto (alto contenido en azúcares y presencia de anhídrido sulfuroso, entre otras). Debido a estas peculiaridades, durante las fermentaciones vínicas no inoculadas, se ha visto una sucesión de cepas de levaduras de *S. cerevisiae*, reduciéndose el número de cepas conforme va finalizando la fermentación alcohólica (Gonzales y col., 2007). En base a estos fundamentos es que se realizó con éxito el aislamiento total de 18 cultivos de levaduras nativas, entre los 5to y 6to días de fermentación, la variación en los recuentos de estas especies fue entre $1,6 \times 10^7$ células/mL y $1,8 \times 10^8$ células/mL.

Identificación de *Saccharomyces cerevisiae*

El trabajo de identificación se complica con los numerosos cambios que se han producido en la taxonomía de las levaduras en los últimos

años, lo cual ha llevado a una gran confusión en la clasificación y nomenclatura de las levaduras con interés en enología. Así, especies como *Saccharomyces bayanus*, *S. capensis*, *S. uvarum*, *S. italicus*, *S. pastorianus*, *S. chevalieri*, entre otras, han sido agrupadas en una única especie, *S. cerevisiae* (Kreger-van Rij, 1984; Barnett et al., 1990). Martini y Martini (1990) y Barnett (1992) han realizado esclarecedores trabajos sobre la taxonomía del género *Saccharomyces* reduciendo el gran número de especies que se atribuían a este género. Teniendo en cuenta estos datos, la identificación realizada estuvo en base a características morfológicas, de reproducción, fisiológicas y bioquímicas.

Entre ellas se incluyeron las características macroscópicas que describieron a las colonias *Saccharomyces*. La mayoría de las cepas aisladas presentaron colonias, en el medio sólido, de color crema, brillante, húmeda y lisa, lo cual es característico de las levaduras *S. cerevisiae* (López et al., 2002). En concordancia con Barnett et al. (1990) que las describe como colonias de coloración blanca a crema, consistencia butirosa, cremosa, de forma circular cuando son sembradas en agar nutritivo e irregulares en otros medios de cultivo.

Según Kurtzman y col. (1998), Barnett y col. (1990) sobre las características microscópicas de *S. cerevisiae*, de un cultivo joven y preparado en fresco, se observan células esféricas, globosas u ovoides. Así también, Carpenter (1969), indica que los individuos de *S. cerevisiae* son generalmente microorganismos unicelulares de forma oval, redonda, elipsoidea o filamentosa (pseudomicelios constituidos por células unidas entre sí), rodeadas por una delicada envoltura elástica (pared celular) de 4 a 8 μ de longitud por 7 a 12 μ de anchura, las levaduras identificadas se contrastaron con dichos aspectos mencionados.

Se observaron la presencia de una brotación multilaral, llamado pseudomicelio (Kurtzman y col., 1998), que se estudió como una de las formas reproductivas mediante el método de siembra en microcultivo. Se tuvieron en cuenta dichas investigaciones y finalmente sirvió para contrastar los resultados finales. Resultando positivo para diez de las 18 cepas aisladas.

Los resultados de la formación de ascosporas, fueron contrastadas con lo mencionado por Barnett (1992), *Saccharomyces cerevisiae* presenta esporas esféricas u ovals cortas (globosas), lisas y con un número entre una o cuatro esporas por asco. De los 18 aislados, fueron

dos las únicas cepas que mostraron tres esporas dentro de sus ascas IT-05 y CTRL (levadura comercial), 8 cepas mostraron ausencia de ascosporas y el resto formaron de 1-2 esporas. La capacidad de un microorganismo para formar esporas tiene valor taxonómico, ya que determina la clasificación de la levadura en esporógena o no esporógena. Las ascosporas formadas por varias levaduras exhiben una amplia diversidad de formas, marcas superficiales, tamaño, color, número de esporas por asco y presencia de cuerpos de inclusión. Generalmente, la mayoría de estas características son constantes para cada especie.

Según Madigany col.(2006), la capacidad e incapacidad para fermentar carbohidratos hasta etanol y dióxido de carbono es la característica más usada para la diferenciación de especies. Por ejemplo, el género *Saccharomyces* se caracteriza por la fuerte fermentación de uno o más azúcares y es un derivado de la levadura silvestre, usadas en tiempos antiguos para la fabricación de vino y de cerveza.

Tal es así, que en la prueba de fermentación de glúcidos, resultó positiva para nueve del total de las cepas nativas aisladas, que fermentaron los siguientes azúcares: Sacarosa, glucosa, maltosa y galactosa, de los cuales seis resultaron lactosa negativo. La cepa S.

cerevisiae no fermentó la lactosa de cultivo por no poder utilizar la lactosa como fuente de carbono, porque no tiene la enzima β – galactosidasa, según Champagne (1990).

Los resultados obtenidos mostraron que el 100 % de las cepas nativas aisladas, presentan una mayor afinidad en el consumo de glucosa, evidenciado por el desprendimiento de CO₂ en los tubos de ensayo con el medio conteniendo este azúcar como única fuente de carbono. Según Dumont y col.(2008); Berthels, (2004), en cuanto a la fermentación de azúcares, en el mosto sin fermentar contiene cantidades aproximadamente iguales de las dos hexosas glucosa y fructosa, *Saccharomyces cerevisiae* tiene preferencia por la glucosa.

Las levaduras que presentaron cinéticas de consumo de glucosa, podrían comportarse mejor en situaciones de estrés; por ejemplo, en fermentaciones detenidas con niveles elevados de fructosa (Dumont, 2008). La mayoría de las cepas testeadas utilizaron la glucosa más rápidamente que los otros azúcares, lo que confirma el carácter glucofílico de las cepas *Saccharomyces cerevisiae*. El resultado obtenido coincide con el de Berthels y col. (2004) quienes también demostraron que comenzado el proceso de fermentación con cantidades iguales de los

azúcares glucosa y fructosa, observaron la preferencia por la glucosa, en consecuencia, las levaduras parecen ser glucofílicas y es la causa de los elevados niveles de fructosa que quedan en los vinos con fermentaciones detenidas. Contar con levaduras, con preferencia en el consumo de fructosa y/o glucosa, evitaría fermentaciones lentas o detenidas. Este último criterio de identificación ayudó a la investigación, a identificar las levaduras nativas *S. cerevisiae*, con las cualidades adecuadas para proceder a la etapa de selección. Teniendo en cuenta que *S. cerevisiae* es lactosa negativa, se procedió a discriminar a las cepas que resultaron lactosa positiva (Tabla 4). Finalmente, se identificaron un total de seis cepas, dos de cada *Vitis vinífera* de donde procedieron, estos fueron de la variedad Italia IT-03, IT-05; variedad Cabernet sauvignon CS-01, CS-04 y variedad Negra criolla NC-02 y NC-06.

Selección de levaduras nativas *S. cerevisiae*

Aplicando el método de Davies y Griffith modificado, de las cepas identificadas, la cepa IT-05 procedente de mostos de la variedad de *Vitis vinífera* Italia, tuvo la mayor capacidad de producción alcohólica (Tabla 7 y 8). Los valores de producción de etanol (g/L/h) obtenidas por las cepas nativas *S. cerevisiae*, resultó mediante la conversión de los mililitros de

CO₂ producidos, considerando que es un método para evaluar la producción de alcohol en un cultivo de levadura (Granados, 1990).

En los mostos ricos en azúcar, típicos de zonas cálidas, se originan altas cantidades de etanol una vez finalizada la fermentación. En consecuencia, las cepas seleccionadas, además de ser buenas productoras de etanol, deben ser lógicamente resistentes al mismo. La mayor parte de las cepas de *S. cerevisiae* tienen un poder fermentativo (capacidad para producir etanol) superior al 14 % (v/v), pudiendo llegar algunas al 18-19 % (Giudici y Zambonelli, 1992). Es por ello que en la selección se tomó en cuenta este criterio, con el fin de elegir a la cepa nativa con mayor capacidad fermentativa y productiva de etanol.

Tradicionalmente se han seleccionado levaduras provenientes de la microflora de la uva, debido a las relaciones existentes entre el binomio viñedo-levadura. Este concepto, preconizado por Ventre en las regiones de los grandes "cru", coincide con el fundamento ecológico propuesto por Íñigo en 1964 (Suarez Lepe, 1997). Ambos señalan la necesidad de seleccionar cepas autóctonas de las propias regiones donde se fueran a emplear. Apuntan al concepto de levadura local seleccionada; hoy en día hay una tendencia a seleccionar levaduras que van a ser utilizadas en la

misma zona de producción. Numerosos autores coinciden con esta definición, entre ellos Capece y col., 2010; Abad Arranz, 2006; Mas y col., 2006; Nikolaou y col., 2006; Torija Martinez, 2002; Esteve-Zarzoso y col., 2000; Suárez Lepe, 1997.

La capacidad de cepas *Saccharomyces* para crecer en los mostos y transformarlos en vino, se sostiene en que su poder alcohológeno es elevado, sugiere que esta levadura realiza una gran contribución a la ecología de la fermentación y finalmente le otorga características particulares a la bebida, según Torija (2004).

El análisis de varianza (Tabla 9), con un nivel de significancia del 95 %, evidenció que entre las seis cepas nativas existían diferencias altamente significativas, para la capacidad productora de alcohol. Mediante la aplicación de la prueba de Tukey (Tabla 10), se determinó la mejor cepa productora de etanol y se seleccionó a la cepa nativa *Saccharomyces cerevisiae*IT-05, resultando, estadísticamente, ser la que mejor capacidad fermentativa presentó.

Las diferencias entre cepas sobre la producción de etanol y la capacidad de fermentar los azúcares, se debe a que las levaduras son

genéticamente diferentes. El desarrollo de técnicas de biología molecular ha permitido identificar y caracterizar cepas de levaduras en muchas regiones productoras de vino, mostrando, que existe una amplia variabilidad genética dentro de una misma especie, la ecología y dinámica de poblaciones en las fermentaciones espontáneas. El conocimiento de las distintas cepas de levaduras que participan durante el proceso de fermentación es muy importante para establecer las más representativas, estudiar propiedades de interés enológico y poder seleccionarlas para su utilización en bodega como cultivos iniciadores (Cantoral, 2010; Rodríguez, 2010).

El etanol afecta a la permeabilidad de la membrana celular disminuyendo su selectividad, de tal forma que las levaduras en un medio con alta concentración alcohólica pierden sus propiedades funcionales y no pueden retener cofactores y coenzimas (Alexandre y col., 1994). El etanol parece sobretodo acelerar el influjo pasivo de protones del mosto hacia el interior de la célula (Juroszeky col.1987). Para mantener el pH intracitoplasmático próximo a la neutralidad, la *S. cerevisiae* debe activar su ATP asamembranal (bomba de protones), actividad consumidora de energía y en sí mismo sensible al etanol. (Rosa y Sa-correica, 1991). El aumento de la permeabilidad membranal puede, por tanto, tener múltiples

consecuencias y conducir a una fuerte reducción de la viabilidad celular. Esto también sería una explicación del porqué las otras cepas nativas, no lograron producir más alcohol y perdieron, a través del tiempo, el poder fermentativo, como se muestra en los resultados (Tabla 7).

Las investigaciones actuales confirman que las levaduras no solo conducen a la fermentación en lo que respecta a la producción de etanol y dióxido de carbono, sino que, tienen influencia decisiva sobre la calidad general del vino y en particular sobre sus características aromáticas relacionadas con la génesis de productos volátiles (Rainieri y col., 2000).

Por lo tanto, cada cepa otorga diferencias características en cuanto a tipicidad de un producto. Durante años, las levaduras han sido objeto de estudio y selección en función de criterios de mejora de la calidad del vino o de tecnologías para conseguir productos tipificados por regiones.

Inóculo. Crecimiento en biomasa

Se sabe que uno de los avances tecnológicos más significativos en la industria vitivinícola ha sido el control microbiológico del proceso fermentativo por inoculación del jugo con cultivos seleccionados de

Saccharomyces cerevisiae (Fleet y Heard, 1993), cuando el mosto es inoculado con levaduras seleccionadas, el desarrollo de la fermentación prácticamente se realiza en pureza de la misma, obteniéndose un vino de características predecibles, garantizando un buen comienzo de la fermentación alcohólica y también su normal conclusión (Regodón Mateos, 2004; Hidalgo Togores, 2003; Esteve-Zarzozo, 2000; Fleet y Heard, 1988).

Cuando se inocula un mosto con una determinada cepa de levadura, puede ser necesario la distinción e identificación de esta cepa inoculada, tanto para corroborar su identidad como para asegurar la viabilidad de su implantación en un medio que, de forma natural, es rico en levaduras indígenas bien adaptadas (Hidalgo y col., 1992). La mayoría de las cepas utilizadas como cultivos iniciadores o inóculos, pertenecen a la especie *S. cerevisiae*, dada la frecuencia con que otras cepas de esta misma especie aparecen en el mosto en fermentación espontánea, es imposible diferenciarlas por técnicas clásicas microbiológicas (como pruebas de fermentación y asimilación) la cepa inoculada del resto de cepas silvestres (Queroly col., 1992), se tendría que utilizar métodos moleculares. En nuestros estudios, antes de la inoculación, se procedió a

la previa identificación, a través de los criterios de aislamiento e identificación descritos.

La cepa nativa seleccionada *S. cerevisiae* IT-05, se masificó en mostos estériles de las tres variedades de *Vitis vinífera* en estudio: Italia, Cabernet sauvignon y Negra criolla, con el fin de multiplicar y conseguir un “pie de cuba” al 5 % del volumen del depósito, para una posterior vinificación controlada, y así lograr comprobar lo que indica Curnier, que la utilización de levaduras seleccionadas puede evitar alteraciones químicas y microbiológicas en las primeras fases de la fermentación. También, puede evitar anomalías en la fermentación, como paradas espontáneas, o mejorar la composición química e influir en la calidad, tanto gustativa como aromática del vino. (Querol, 1992).

Los inóculos resultaron entre $1,4 \times 10^7$ células/mL y $6,2 \times 10^7$ células/mL, con un volumen final de 100 mL, coincidiendo con lo indicado por Suárez (1990), que indica que se puede utilizar como sustrato, mosto fresco o mosto concentrado y una vez obtenido el pie de cuba con más de 10^5 células/mL, se añade al mosto recién obtenido en la bodega en una cantidad que represente un 2-4 % del volumen del depósito. El volumen utilizado en el ensayo experimental fue del 5 % del volumen del depósito.

Las levaduras nativas seleccionadas. El uso de cultivos puros de levaduras que procedan de la zona vitivinícola donde se van a utilizar, lo que se conoce como levaduras locales seleccionadas, es más efectivo que las levaduras comerciales para realizar fermentaciones, ya que se cree que las levaduras que se encuentran en una microzona son específicas del área, están totalmente adaptadas a las condiciones climáticas de la zona, a la materia prima, es decir al mosto a fermentar, y son responsables parcialmente de las características únicas de los vinos obtenidos. Por lo que las características propias de una zona, como mostos con alto o bajo contenido en azúcares, grado alcohólico, tipo de vinos elaborados, temperatura de fermentación, pueden ser entre otros, aspectos interesantes para la selección de levaduras. La importancia de estos parámetros puede ser relativa dependiendo del producto para el cual quieren ser utilizados (Mas y col., 2002).

Vinificación en Bodega. Monitoreo físico-químico.

En la evaluación del tiempo de duración del proceso fermentativo, los mostos de la variedad Italia (VIT), el vino control realizó una fermentación en menor tiempo que el mosto experimental (VIT-E1 y VIT-E2). Es posible, que esto se debió a que la cepa nativa seleccionada

inoculada IT-05 no logró implantarse adecuadamente, por efecto de la microbiota propia del lugar de producción. Se observó también, que los otros parámetros evaluados, como los °Brix y pH, resultaron con grandes diferencias durante el monitoreo, frente al grupo experimental, respecto al factor tiempo (Figura 8).

Las densidades del resto de los mostos en estudio, de uvas tintas, disminuyeron en un tiempo más prolongado, posiblemente por la temperatura, que resultó baja durante toda la etapa de fermentación, llegando a un mínimo de 19 °C y un máximo de 22 °C, podría ser por lo que indica Peynaud (1997), que entre los 25 °C a 30 °C se considera la temperatura ideal para el desarrollo de *S. cerevisiae* y en función de la necesidad de conseguir una fermentación suficientemente rápida, una buena maceración y evitar el cese de la fermentación. Pero se contrapone a lo estudiado por Mas y col. (2006), donde afirma que una de las condiciones deseables de las levaduras nativas utilizadas como inóculo, es la capacidad de fermentar en condiciones de bajas temperaturas. También podría deberse a que, los mostos no presentaban un alto contenido de azúcares, por lo que se sabe *S. cerevisiae* produce altas cantidades de etanol a la vez que consume el contenido de azúcares y baja el pH (Tiago y col., 2012).

S. cerevisiae tiene la capacidad de soportar el estrés causado principalmente por la temperatura, la presión osmótica, la presión hidrostática, alta densidad celular, el etanol y la composición con bacterias y otras levaduras silvestres. No obstante, se puede mejorar su tolerancia al estrés consiguiendo así beneficios potenciales en los procesos de producción de bebidas alcohólicas. La fermentación a bajas temperaturas resulta clave en los procesos de elaboración de determinadas bebidas alcohólicas, con característica organolépticas que se ajusten a los perfiles de calidad sensorial y de preferencia del consumidor. Por lo tanto, es probable que la temperatura presenciada durante la fermentación, finalmente sea beneficiosa para los vinos obtenidos, ya que para los tintos la fermentación duró un total de 15 días entre 19 a 22 °C.

En el monitoreo de los contenido de pH iniciales se observa que bajó notablemente en todos los mostos experimentales. La evolución del pH de los mostos experimentales y el control, resultaron entre un mínimo de 3,5 y un valor máximo de 4, estos resultados concuerdan con Fleet y Heard (1993) que señalan que el pH de los mostos suele variar entre 3 y 4, dependiendo de la concentración de los ácidos tartárico y málico, valores entre los cuales se realiza la fermentación usualmente y la principal levadura fermentativa, *S. cerevisiae*, parece crecer mejor a pH

superiores a 3,5; pero su crecimiento no se ve muy afectado a pH entre 2,8 y 3,5 según Peynaud (1993).

Los grupos experimentales para las tres *Vitis vinífera* en estudio, no tuvieron diferencias significativas entre sí, e incluso hubo semejanzas en el comportamiento entre ellas. Sólo se detectó durante el proceso, que el aumento de temperatura de la fermentación no fue constante en los vinos inoculados con la cepa nativa seleccionada *S. Cerevisiae* (IT-05), observándose ligeros puntos de inflexión en las respectivas gráficas (Figura 9).

Es posible también, que la cepa seleccionada no presentara la cualidad del fenómeno killer, que implica la secreción, por parte de ciertas cepas, de una proteína tóxica de baja masa molecular, llamada toxina killer, a la cual ellas son inmunes, que mata a células sensibles, las cuales pueden ser del mismo o diferentes géneros. Este tipo de interacciones pueden determinar la evolución de las distintas poblaciones de levaduras durante la fermentación. En algunas ocasiones una cepa killer de *Saccharomyces cerevisiae* predomina al final del proceso fermentativo, sugiriendo que la expresión de la toxina le permitió conducir parte de la vinificación. Este fenómeno killer puede ser un método

alternativo para el control de levaduras no deseadas, (M.C. Nally y col. 2005, Maqueda y col. 2012). Tal es así, que no pudo realizar eficazmente una evolución deseada en el proceso de fermentación.

Evaluación sensorial de los vinos elaborados

De acuerdo a los resultados de evaluación sensorial, los vinos que fueron inoculados con la cepa nativa seleccionada *S. cerevisiae* (IT-05), resultaron con mejor calidad sensorial que el vino control, que realizó fermentación espontánea (natural), a excepción de la variedad Italia, de acuerdo al promedio del puntaje emitido por los cinco jueces, no hubo diferencias significativas entre sus tratamientos (vinos). Si bien los vinos experimentales (71,3 puntos) obtuvieron puntajes más altos que el vino control (67,8 puntos), las cualidades descritas por los jueces fueron semejantes. El vino blanco resultó positivo en cuanto a los aromas primarios, en el cual las notas resultaron ser frutales a cítricos y adamascado. Según Moran (2004) los aromas afrutados de un vino son debidos principalmente a una mezcla de acetato de hexilo, caproato y caprilato de etilo. Pero en cuanto a los aromas terciarios, resultó con problemas, esto se debió posiblemente al mal uso del Metabisulfito de potasio como antiséptico, el cual se dosifica a una cantidad máxima de

4g/HL. En cuanto a la evaluación gustativa los jueces describieron, que la maceración se debería realizar sin cáscara, para evitar el exceso de amargor en el vino. Pues, se debe recordad que las condiciones de fermentación, para todos los mostos se aplicaron por igual, es por tal motivo que perdió la tipicidad original de la variedad Italia.

Para los vinos procedentes de la variedades *Vitis vinífera* Cabernet sauvignon experimentales, obtuvo un puntaje promedio casi excelente (94,4 puntos), los catadores lo calificaron como un vino intenso, con carga polifenólica, que expresan frescura e intensidad aromática y gustosa, punto a madera al final. Para el vino control (VCS-C) (89,4 puntos), resultó ser un vino limpio, bastante intenso en aromas como en post-gusto, típico de la variedad Cabernet sauvignon, sabroso en boca y con un toque de madera al final, y esto es debido a que la variedad Cabernet sauvignon es una uva recomendada para una vinificación de calidad, por sus cualidades adaptativas a las condiciones hostiles. El efecto de la levadura nativa seleccionada *S. cerevisiae* IT-05, fue estadísticamente significativa, con un nivel de confianza del 95 % mediante la prueba de Tukey, se determinó que los vinos experimentales fueron mejor calificados por el jurado, obteniendo un vino de gran calidad con respecto al vino control, que realizó una fermentación espontánea (sin inóculo). Confirmando lo

descrito por Arozarena (1998), que los vinos provenientes de la variedad Cabernet sauvignon, son vinos sabrosos y oscuros, muy ricos en taninos, siendo capaces, por lo tanto, de envejecer durante largo tiempo en barrica, así como posteriormente en botella. Dadas las características de esta variedad, dicho envejecimiento, además de conveniente, resulta casi obligatorio, para que los vinos se abran y desarrollen todos sus aromas, que característicamente recuerdan a pimienta verde, grosella, cedro, tabaco, entre otros.

Los comentarios con respecto a los vinos de la uva Negra criolla, si bien resultaron significativos, los jueces indicaron que esta variedad no es ideal para producir vinos de gran calidad, posiblemente sea por su escasa cualidad de aromas, poco color, gusto y gran concentración de taninos. Su consumo debe ser inmediato, siendo calificado como vinos jóvenes, astringentes, de tipo rosé e ideal para ser sometidos a proceso de destilado y producir buenos piscos.

El mejor vino de la variedad *Vitis vinífera* Negra criolla resultó ser los vinos experimentales (VNC-E1 y VNC-E2) (71,6 puntos) con una significación al 95 % a través de la prueba de Tukey, determinando la calidad sensorial a diferencia del vino control (VNC-C) (67,8 puntos). Los

puntajes obtenidos fueron bajos, por las deficiencias encontradas, tal es que resultó ser un vino ligero, con presencia de una alta acidez, de color rosé debido a la clarificación, atípico, no tiene los descriptores de la variedad negra criolla, al final punto de madera, y esto se debió posiblemente al modo de fermentación ideal que podría hacerse una maceración carbónica para extraer el color y con respecto a la elevada acidez volátil, se debe tener un mayor cuidado en los momentos de trasiego o transvase de los vinos, lo que pudo ejercer una contaminación del producto final, todos estos criterios se manifiestan en un descenso en la calidad final del producto.

El papel de la levadura en el aroma se debe fundamentalmente a la excreción de determinados intermediarios metabólicos como los alcoholes superiores y el etanol, además de ácidos grasos. Ambos tipos de compuestos son volátiles y por tanto, conforman el aroma fermentativo de un vino, además como resultado de reacciones de esterificación entre los compuestos anteriores se forman ésteres que modifican notablemente el perfil organoléptico de los vinos (Morata, 2004).

Avakyantsy col. (1981) atribuyen el aroma franco de los vinos a cuatro ésteres: acetato de etilo, acetato de isoamilo, hexanoato de etilo y

octanoado de etilo; a dos alcoholes: isoamílico e isobutilico y al acetaldehído. El resto de los compuestos los consideran como modificadores del olor básico. Lógicamente se trata de una definición simple del aroma donde se identifican preponderantemente a los volátiles derivados del metabolismo microbiano, considerados como secundarios en cuanto a su origen.

Por último, determinadas cepas de levadura expresan actividades enzimáticas axocelulares β -glicosidásicas, que pueden actuar desglucosidándose los terpenos de algunas variedades de uvas y por tanto, incrementando su volatilidad y percepción.

Los alcoholes superiores se forman durante el metabolismo glicolítico de los azúcares. Estos contribuyen al aroma vinoso que adquieren los mostos tras la fermentación. Juegan un importante papel en el aroma de los vinos dependiendo de los tipos de compuestos presentes y de sus concentraciones. La producción de estos compuestos dependen de varias condiciones de fermentación como composición del mosto, variedad vinífera, cepa de levadura, temperatura de fermentación y técnica de vinificación (Morata, 2004). Contrastando con los resultados con respecto al aroma de los vinos blancos Italia y Negra criolla, esta

podría ser la explicación del porqué no se produjo sus aromas típicos de la variedad.

Las producciones excesivas, superiores a 400-500 mg/L, de alcoholes superiores por las levaduras utilizadas en vinificación, pueden eclipsar los aromas varietales o de crianza en madera estandarizando los vinos y perjudicando su buqué (Morata, 2004).

La acción secuencial de estos diferentes géneros y especies de levadura, contribuyen al aroma y sabor de los vinos, determinando la calidad de estos. El aroma y el sabor están dados por los compuestos volátiles formados durante la fermentación incluyendo alcoholes, ésteres, ácidos orgánicos, fenoles, tioles, monoterpenos y norisoprenoides. Entre los compuestos volátiles derivados del metabolismo de la levadura se encuentran los ésteres, alcoholes y acetatos, que en diferentes combinaciones afectan la calidad del vino (Vilanova y Sieiro, 2006; Hyma y col., 2011).

Finalmente, para los vinos que sí mostraron ser significativos para el análisis sensorial y obtener una calificación excelente, tal es el caso de Cabernet sauvignon experimental y Negra criolla experimental, se

confirma lo indicado por Mas y col. (2006), que las levaduras seleccionadas se han utilizado con excelentes resultados en muchos países, obteniéndose productos finales de calidad más uniforme que los que se producían con las fermentaciones espontáneas. Coincidiendo con Chambers y col. (2010) donde confirma que las fermentaciones también son impulsadas en gran medida por inoculaciones de una sola cepa pura de *S. cerevisiae*, como lo realizado en la presente experiencia, donde se seleccionó la mejor cepa nativa. Esta cepa se añade al mosto de uva, después de la molienda. Para asegurar un mayor control de la vinificación, se obtienen resultados más predecibles y disminuye el riesgo de deterioro por otros microorganismos.

Evaluación analítica

En las tablas 16, 19 y 22 se presentan el resumen general del ANVA, mostrando los cuadrados medios con grados de libertad 8, para los criterios de evaluación analítica de los vinos obtenidos con las cepas nativas seleccionadas *S. cerevisiae* IT-05 y los vinos control correspondientes a las vinificaciones VIT, VCS y VNC.

Los ácidos orgánicos más frecuentemente encontrados en el vino son el tartárico, el málico y el láctico. Los dos primeros proceden de la uva y el último de la fermentación maloláctica de los vinos (Blouin y Guimberteau, 2000). El ácido tartárico juega el papel más importante, pues es el que libera más protones (iones H⁺), por lo que tiene una mayor influencia en los cambio de pH (Flanzy, 2003).

En los vinos obtenidos se analizaron la acidez total de acuerdo al contenido de ác. tartárico, donde los resultados de las variedades de *Vitis vinífera* en estudio, resultaron dentro de lo establecido por la Norma Técnica Peruana (NTP 212.047), entre 3g/L a un máximo de 7 g/L ác. tartárico. En la evaluación estadística no resultó con diferencias

significativas, para ninguno de los vinos experimentales vs los vinos control correspondiente.

Por otro lado, Prescott (1992) indica que la acidez media total de un vino es del orden de 5 g/L expresada como ácido tartárico, los resultados para el vino de la variedad de uva Negra criolla (VNC) presentó un valor por encima del indicado por este autor, llegando a 6 g/L de ác. tartárico, posiblemente se debió a la aparición de los ácidos originados por las levaduras (Bonedy col., 1992), teniendo en cuenta también que la acidez total está dada por la composición de cada variedad de uva.

La acidez volátil presenciada en los vinos obtenidos, resultó con diferencias significativas entre sus tratamientos correspondientes para cada variedad de *Vitis vinífera*, pero comparándose con la Norma Técnica Peruana (NTP 212.031), donde indica que el máximo valor es 1,2 g/L ác. acético, los vinos VIT y VNC, la gran mayoría, tanto experimental como control, presentaron elevada acidez volátil. El vino blanco Italia resultó con valores muy próximos de lo permitido por la norma y el vino Negra criolla sobrepasó los parámetros, llegando hasta 1,4 g/L ác. acético en promedio, incluyendo al VNC-C, para estos últimos resultados en el VNC explicaría la evaluación sensorial obtenida. Los vinos de la variedad

Negra criolla (VNC) no serían vinos deseables. Es probable que se deba por una mala manipulación en el proceso de los trasiegos, por no utilizarse correctamente la dosificación de Metabisulfito de potasio y por una aireación excesiva, proliferando microorganismos acéticos. También, es posible que la cepa nativa IT-05, debida a un menor vigor fermentativo, no fuera capaz de imponerse rápidamente en las fermentaciones. En consecuencia, otras levaduras no *Saccharomyces*, originaron más acidez volátil en el comienzo de la fermentación y perjudicaron al producto final. Existen levaduras que son más productoras de acidez volátil y esto se debe a su alto componente genético en su producción, que supone del 95 al 99 % de la acidez volátil de un vino (González, 1988).

El grado alcohólico, según la OIV-MA-AS312-01A; CEE (1990), se define como el número de litros de etanol contenido en 100 litros de vino, ambos volúmenes se miden a 20 °C y es expresado por el símbolo “% vol”. El etanol, sus homólogos y los ésteres de ambos están comprendidos en el grado alcohólico, por encontrarse en el destilado.

Los valores de grado alcohólico obtenidos en los vinos producidos con la cepa nativa seleccionada *S. cerevisiae*IT-05, fluctuaron entre 10 y

12,2 % vol etanol, para las vinificaciones experimentales. Resultando con diferencias significativas sólo para los vinos blanco Italia.

En la tabla 17 y 18, se observan las diferencias entre tratamientos, con un nivel de significancia del 95 %, para los vinos blancos de la uva Italia, obtenidos en el proceso de vinificación. Mediante la prueba de Tukey resultó con la mayor cantidad de producción de alcohol los vinos experimentales (VIT-E2 y VIT-E1) con 10,5 y 10,03 (no difieren entre ellos estadísticamente) con respecto a sus controles correspondientes. El grado alcohólico promedio del vino control (9,07 % vol) obtuvo 1,43 grados por debajo del valor más alto producido por VIT-E2, mostró que la cepa IT-05, sí tuvo efecto sobre el porcentaje de alcohol, para esta variedad de *Vitis vinífera* Italia. Esto confirma la idea que las vinificaciones espontáneas suelen tener menor rendimiento alcohólico.

En cambio, para los vinos tintos Cabernet sauvignon, no resultaron significativos entre sus tratamientos, pero sus valores permanecieron dentro de lo permitido por la NTP 212.030, que indica un mínimo de 10 % vol. De la misma forma para los vinos Negra criolla, que tuvieron el más alto contenido de grados alcohólicos en comparación con las demás variedades de *Vitis vinífera* en estudio, alcanzando valores de 12,2 %

vol(VNC-E2). La ausencia de diferencias en el grado alcohólico de los vinos, muestra que la cepa IT-05 tuvo competencia con otras levaduras por los azúcares y, por lo tanto, interfirieron con la fermentación alcohólica.

El anhídrido sulfuroso que se encuentra en el vino proviene de dos fuentes, la primera y la más importante es el añadido durante el proceso de vinificación y la segunda que puede ser muy significativa es por la actividad de las levaduras.

El vino Cabernet sauvignon es la única variedad que produjo diferencias altamente significativas, para el análisis de Anhídrido sulfuroso total, resultando el F calculado mayor que el F tabular. Con la prueba de Tukey se obtuvo que el vino control (VCS-C) es el que presentó el mayor valor de SO₂total con 115,13 mg/L y los vinos experimentales obtuvieron similar resultado (101,8 y 101,2 mg/L), no existiendo diferencias estadísticas entre ellos. Los resultados estuvieron dentro de lo que establece la NTP 212.215 con un máximo de 150 mg/L y también con la norma de la O.I.V. que indica un límite de tolerancia a anhídrido sulfuroso total es de 250 mg/L. Los valores obtenidos en el presente estudio se

encuentran por debajo de estos límites legales, por lo cual, la cepa nativa IT-05 no presenta problemas para ser usada en forma de inóculo.

La producción de SO₂ depende genéticamente de la levadura y es afectada por las condiciones en vinificación como la composición de los mostos, concentración de sulfatos, glucosa, ácido pantoténico, dióxido de azufre, temperatura (Regodón, 1997). La formación de SO₂ es un carácter propio de la levadura, distinguiéndose levaduras altamente productoras y levaduras poco productoras o no productoras (Caldentey, 1992).

Los resultados para las demás variedades de vinos obtenidos, muestran que no existe efecto estadísticamente significativo entre tratamientos, por parte de la cepa IT-05 inoculada a los mostos en la fermentación experimental. Pero comparando con la NTP, los resultados son elevados, para los vinos blancos Italia y vinos tintos Negra criolla. Considerando que son vinos secos, sus valores sobrepasan en promedio entre 20 a 50 mg/L de SO₂ total, más de lo permitido por la norma, sobre todo para los vinos controles: VIT-C con 195,06 mg/L y VNC-C con 177,12 mg/L. Aunque es menora lo indicado por la O.I.V., los resultados analíticos tendrían coherencia con respecto al análisis sensorial realizado,

en donde los jueces describían estos defectos indeseables en los vinos obtenidos.

Respecto a la cantidad de azúcares reductores, los vinos obtenidos no presentaron diferencias significativas entre sus tratamientos. Los valores promedios obtenidos, para los distintos vinos, fluctuaron entre 1,4 a 3,18 g/L. Los resultados concuerdan con lo indicado por la NTP 212.215, cuya premisa indica que para vinos tintos que contengan como máximo 4 g/L de sustancias reductoras, contendrá como máximo 150,0 mg/L de SO₂ total. También de acuerdo con la OIV-MA-AS311-01A los vinos que se obtuvieron de la fermentación experimental se denominarían vinos secos, porque muestran concentraciones menores de 5 g/L del contenido de azúcar.

Según Peynaud (1993), la uva contiene aproximadamente 1 g/L de azúcares no fermentables, pentosas, heptosas y octosas. Debido a la presencia de estos azúcares no fermentables, nunca es cero la determinación de azúcares reductores de un vino seco y los contenidos se sitúan entre 1 y 2 g/L. Como se sabe, el uso de levaduras seleccionadas suele dar como resultado una menor cantidad de azúcares reductores en el vino terminado. Probablemente, cuando se usan levaduras

seleccionadas estas se imponen, la fermentación es rápida y finaliza bien, pero quedan 1 a 2 g/L de azúcares no fermentables o asimilables por *S. cerevisiae*. Estos azúcares pueden ser fermentaciones espontáneas. De esta manera, cuando una fermentación espontánea marcha bien, los azúcares residuales pueden ser algo menores que cuando se usan levaduras seleccionadas; en cualquier caso las diferencias carecerán de importancia. Entre los géneros de levaduras capaces de asimilar arabinosa o xilosa se encuentran muchas de las comunes en los vinos: *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Rhodotorula*, pero no *S. cerevisiae* (Barnetty col., 1990; Barnett, 1992). Algunas de estas levaduras abundan en los mostos fermentados espontáneamente desde el inicio de la fermentación, pudiendo consumir, por lo tanto, los azúcares mencionados.

Al margen de estas consideraciones, es conveniente mencionar que los niveles de azúcares resultantes en todos los vinos elaborados no son detectables en los análisis sensoriales, ya que el umbral de detección está por encima de 4 g/L en vino blancos y de 10 a 15 g/L en vinos tintos (Amerine y Ough, 1980).

Los pH de los vinos, variaron de 3,6 a 4 y se encuentran dentro del rango normal para vinos, sin que haya diferencias entre estos, lo que muestra que la cepa nativa IT-05 no ejerce un efecto sobre el pH del vino, porque no resultaron con diferencias significativas en el ANVA. Los resultados más próximos al pH permitido, fueron de los vinos Negra criolla con 4,01 pH (VNC-E1). Posiblemente, se debió a los problemas de acidez que ya se mencionaron.

El pH de un vino es una función creciente de la relación tartrato ácido de potasio/ ácido tartárico, es decir, que el pH de un vino depende de la neutralización del ác. tartárico. El pH de los vinos varían de acuerdo a las zonas o regiones vitivinícolas y según las condiciones de maduración de la uva, en este rango las levaduras responsables de la transformación de los azúcares se sitúa en pH superiores (Flanzy, 2003).

En los mostos y en los vinos, el pH varía dependiendo de las condiciones de maduración de las uvas, que determinan la concentración de ácidos orgánicos al momento de la cosecha, del varietal de uva, de las prácticas enológicas, de la presencia y metabolismo de microorganismos, de la temperatura de fermentación y guarda (Fanzone, 2012).

Estudios en los que se han investigado cultivos iniciadores y levaduras nativas han demostrado que existen diferencias significativas en la composición química de los vinos resultantes, (Vilanova y Masneuf-Pomarède 2005), pero los resultados en nuestra experiencia no demostraron mayor grado de significancia, solo para algunos parámetros analíticos evaluados, tal es el caso de los grados alcohólicos para el vino blanco Italia y SO₂ total para los vinos tintos de la variedad Cabernet sauvignon.

V. CONCLUSIONES

- Se aisló 18 cultivos puros de presuntos *S. cerevisiae* nativas, procedentes de muestras de mostos de las tres variedades de *Vitis vinífera* “uva” Italia, Cabernet sauvignon y Negra criolla del Instituto de Investigación, Producción y Extensión Agraria (INPREX).
- Se identificó 6 cepas nativas de *S. cerevisiae*, dos de cada muestra de *Vitis vinífera*, a través de los resultados morfológicos, vistas macroscópicas y microscópicas; formación de pseudomicelio, típico de la especie; método de esporulación, formando ascosporas de 1 a 4 esporas por asca y finalmente, se realizó el método de fermentación de glúcidos, dando positivo para todos los azúcares a excepción de la lactosa (-), demostrando así que corresponden a las levaduras *S. cerevisiae*.
- La cepa IT-05, procedente de las muestras de uva Italia, fue seleccionada, con la mayor capacidad productora de etanol entre las cepas nativas, con 4,08 g/L/h de etanol producido.

- Se masificó e inoculó levaduras de *S. cerevisiae* nativas seleccionadas en mostos estériles de las variedades de *Vitis vinífera* Italia, Cabernet sauvignon y Negra criolla.
- En el monitoreo de fermentación experimental, la evolución de la temperatura, pH, °Brix y Baumé, no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos (mostos), para los mostos Cabernet sauvignon y Negra criolla, a excepción de la variedad de uva Italia, en donde el control terminó la fermentación en menor tiempo que el grupo experimental.
- La evaluación sensorial de los vinos obtenidos confirma buenas características diferenciales en los vinos tintos Cabernet sauvignon, teniendo una grado de aceptabilidad, en promedio a sus dos vinos experimentales, con 93,3 puntos, y el vino rosé Negra criolla con 71,3 puntos, estos fueron mejor calificados resultando significativos frente a sus vinos control que realizaron fermentación espontánea. Para los vinos blancos Italia obtenidos, aunque presentaron mayor puntaje (75,5 puntos en promedio) que el vino control (71 puntos), no tuvieron estadísticamente diferencias significativas.

- En el estudio analítico de los vinos, los valores estuvieron bajo los parámetros indicado por la N.T.P. y la O.I.V. En la gran mayoría no resultó con diferencias significativas, entre vino control y el experimental, pero se observa que los producidos con la cepa nativa tienen un mayor grado alcohólico en comparación al vino que realizó fermentación espontánea. Para los vinos tintos Cabernet sauvignon y Negra criolla, sí existieron diferencias significativas al 95 %, tal es el caso de los grados alcohólicos para el vino blanco Italia, que presentó mayor producción de alcohol que el vino control y SO₂ total para los vinos tintos de la variedad Cabernet sauvignon, en donde los vinos experimentales obtuvieron menor cantidad que el control.
- Las determinaciones químicas indican que el vino elaborado con cepas nativas muestran características semejantes al elaborado en forma natural, es decir, a los mostos que realizan fermentación espontánea.

VI. RECOMENDACIONES

- Indagar más en la búsqueda de otras levaduras nativas *Saccharomyces cerevisiae* de interés industrial.
- Realizar la curva de crecimiento de las cepas nativas a estudiar, para determinar con precisión las fases de esta, y así determinar el tiempo óptimo de inoculación previo a la fermentación y el tiempo total del proceso.
- El uso de métodos de la biología molecular basados en análisis genéticos y de la taxonomía molecular permite la rápida y precisa identificación a nivel de especies o cepas.
- Se recomienda continuar los estudios biotecnológicos de las cepas seleccionadas para realizar fermentaciones dirigidas y a escala industrial.

- Este proceso requiere contar con una infraestructura acorde a las necesidades de asepsia, especialmente para evitar condiciones que propicien la desestabilización microbiológica del vino.

VII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. **Arozarena, I.** (1998). *El análisis sensorial como instrumento de evaluación de la calidad de vinos tintos monovarietales de Navarra y Aragón.* (Tesis Doctoral). Pamplona, España.
2. **Acuña, G., Armas, R., Ayerra, B. y López, M.** (1990). *Normas prácticas para la elaboración de vinos en Canarias.* Madrid: Neografis.
3. **Alexander, K. Entwisle, D. y Bedinger, S.** (1994). When expectations work: Race and socioeconomic differences in school performance. En *Social Psychology Quarterly*, 57, 283–299.
4. **Amerine, M. y Ough, C.** (1980). *Methods for analysis of musts and wines. A Wiley-Interscience publication.*
5. **Avakyants, S., Rastyannikov, E. y Chernyaga, B.** (1981). *Khromatomaññ -spektrometricheskoe issledovanie.* Letuch. Vesnch. Vina. 41, 50-53.

6. **Avaria, P.** (1999). *Manual de bebidas alcohólicas y vinagres-Chile*. Chile: Subdepartamento Divulgación Técnica, Servicio Agrícola y Ganadero (SAG).

7. **Barcenilla, M. y María, J.** (1990). *Influencia de las levaduras sobre polifenoles, polialcoholes y azúcares en los procesos de fermentación y conservación de vinos blancos*. (Tesis doctoral). Instituto de Fermentaciones Industriales, Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.

8. **Barnett, J.** (1992). *The taxonomy of the genus Saccharomyces Meyen ex Reess: a short review for non-taxonomists*. *Yeast*, 8:1-23.

9. **Berger, S.** (1995). *Acondicionamiento, envases y fumigación de uva de mesa*. En: *Manejo de uva de mesa para exportación*. Publicaciones Misceláneas Agrícolas. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Santiago. pp. 44-49.

10. **Boned, F., Colomo, B. y Suárez, J.** (1992). *Selección de levaduras vínicas de D. O. Bierzo en base a sus propiedades fisiológicas de*

interés industrial. Caracterización de cepas autóctonas. Vitivinicultura,
pp 3:37-41

11. **Blouin, J. y Guimberteau, G.** (2000). *Maduration et maturité du raisin. Maduración y madurez de la uva.* Bordeaux, Francia:Feret.
12. **Cáceres, H.** (2012). *Uvas pisqueras/catálogo Ampelográfico de Variedades de Uvas Pisqueras de la Denominación de Origen pisco - Perú,* Primera Edición: Setiembre 2012.
13. **Caldentey, J., Blanco, L., Bamford, D. y Salas, M.** (1992). *Nucl. Acids Res.* pp. 20,3971-3976.
14. **Carrau, F.** (2005). *Levaduras nativas para enología de mínima intervención. Biodiversidad, selección y caracterización.* En *Agrociencia.* Vol. IX N°1 y N°2 pág. 387 – 399. Montevideo, Uruguay.
15. **Carpenter, P.** (1969). *Microbiología.* 2da Edición. México: Interamericana.

16. **Catania, C. y Avagnina, S.** (2007). *Los aromas responsables de la tipicidad y de la vinosidad*. Curso Superior de degustación de vinos. EEA Mendoza: INTA. pp 1-20.
17. **Capece, A., Romaniello, R., Siesto, G., Pietrafesa, R., Massari, C., Poeta, C. y Romano, P.** (2010). Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for Nero d'Avola wine and evaluation of selected starter implantation in pilot fermentation. En *International Journal of Food Microbiology*. N° 144, p. 187–192.
18. **Cazorla, J., Xirau, M. y Azorín, R.** (2000). *Técnicas Usuales de Análisis en Enología*. Barcelona, España: Creacions Gráficas Canigó.
19. **CEE, Comunidad Económica Europea** (1990). *Reglamento N°2676/90 de la comisión Europea, por el que se determinan los métodos de análisis comunitarios aplicables en el sector del vino*. pp 190.
20. **Chambers, C., Whiles, M., Rosi-Marshall, E., Tank, J., Royer, T., Griffiths, N., Evans-White, M. y Stojak, A.** (2010). Responses of

stream macroinvertebrates to Bt maize leaf detritus. En *Ecological Applications*, 20, 1949–1960.

21. **Champagne, C., Goulet J. y Lachance R.** (1990). Production of Bakers' yeast in cheese whey ultrafiltrate. En *Applied and Environmental Microbiology*, pp. 2, 425-430.
22. **Davies y Griffith** (1982). *Peter Maxwell Davies*. Edición ilustrada. Editor RobsonBooks.
23. **Degre, R.** (1993). Selection and comercial cultivation of wine yeast and bacteria. En *Wine microbiology and Biotechnology*. HarwoodAcademicPublishers, 421-447.
24. **Doyle, M., Beuchat, L. y Montville, T.** (1997). *Microbiología de los alimentos: Fundamentos y fronteras*. Zaragoza, España: Acribia S.A.
25. **Esteve, B., Gostíncar, A., Robert, R. y Uruburu, F.** (1996). *Selección de levaduras de interés en enología de la comarca del Penedés*. Libro de resúmenes de X Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos, SEM, 49.

26. **Esteve-Zarzozo, B., Gostinar, A., Bobet, R., Uruburu, F. y Querol, A.** (2000). Selection and molecular characterization of wine yeasts isolated from “El Penedes” area (Spain). En *Food Microbiol*, pp. 17, 553-562.
27. **Fanzone, M.** (2012). *Caracterización de la composición fenólica de uvas y vinos de la variedad Malbec (Vitis vinifera L.): su relación con el origen geográfico, factores vitivinícolas y valor comercial.* (Tesis Doctoral). Universitat Rovira I Virgili. Tarragona, España.
28. **Fajardo, C., Erika, E., Sarmiento, F. y Sandra C.**(2008). *Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de Saccharomyces cerevisiae.*(Tesis Doctoral). Pontificia Universidad Javeriana de Colombia. Facultad de ciencias Básicas. Microbiología Industrial. Bogotá.
29. **Flanzy, C.** (2003). *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos.* España: AMV.

30. **Fleet, G.H. y Heard, G.M.** (1993). Yeast growth during fermentation. Wine Microbiology and Biotechnology. En *Harwood Academic Publishers, Switzerland*, pp. 27-54.
31. **Fleet, G. y Heard, G.** (1988). The effects of temperature and pH on the growth of yeas species during the fermentation of grape juice. En *J. Appl. Bacteriol.* pp. 65, 23-326.
32. **García, L., Duran, A. y Roncero, C.** (2000). Calcofluor antifungal action depends on chitin and a functional high-osmolarity glycerol response (HOG) pathway: evidence for a physiological role of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG pathway under noninducing conditions. En *J. Bacteriol*, pp. 182, 2428-2437.
33. **González, M.** (1988). *Caracterización analítica de los vinos de Euskal Herria*. Diputación Foral de Alava, España.
34. **Gonzales, S., Barrios, E. y Querol, A.** (2007). *Propiedades de las levaduras autóctonas y de las levaduras comerciales en vinificación*. En *Rev. Enólogos*, N° 48, pp. 42-46.

35. **Guiñazú, R., Quini, I., Marianetti, A., Murgo, C. y Rivero, M.** (2010). *Elaboración de vino casero*. Instituto Nacional de Viticultura. Argentina.
36. **Guillamón, J.M., Sabaté, J., Barrio, E., Cano, J., y Querol, A.** (1998). *Rapid identification of wine yeast species base don RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region*. Arch. Microbiol. pp 169, 387-392.
37. **Hidalgo, P., Dizy, M. y Polo, M.** (1992). Criterios utilizados en la actualidad para la clasificación de las levaduras vínicas. En Rev. *Esp. Cienc. Technol. Aliment.*, 32(1), 117-129.
38. **Hidalgo, L.** (1993a). *Fisiología de la vid*. En: *Tratado de viticultura general*. Madrid, España: MundiPrensa.
39. **Hidalgo, J.** (2003). *Tratado de enología*. Vol I. 2da Edición. Madrid, España: MundiPrensa.

40. **Hyma, K., Saerens, S., Verstrepen, K. y Fay, J.** (2011). *Divergence in wine characteristics produced by wild and domesticated strains of Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Research. pp. 11: 540-551.
41. **Jay J.** (1994). *Microbiología moderna de los alimentos*, 3ª ed. Zaragoza, España: Acribia, S.A., pp 36-39.
42. **Jimeno, M., Ordoñez, A. y Suberviola, J.** (2010). *Inoculación y coinoculación de Levaduras No Saccharomyces en la elaboración de vinos blancos y rosados de Navarra*. (Tesis Doctoral). Estación de Viticultura y Enología de Navarra. Olite, Navarra.
43. **Jorgensen, A. y Hansen, A.** (1959). *Microbiología de las fermentaciones industriales*. 7ª edición. Zaragoza, España: Acribia.
44. **Juroszek, J., Feuillat, M. y Charpentier, C.** (1987). Effect of the champagne method of starter preparation on ethanol tolerance of yeast. *En American Journal of Enology and Viticulture*, 38, 194-198.
45. **Kameswara, R.** (2003). *Fermentation biotechnology. Foundation for Biotechnology Awareness and Education*. Copyright 2003: 1-12

46. **Kish, S., Sharf, R. y Margalith, P.** (1983). A note on a selective medium for wine yeasts. En *J. Appl. Bacteriol.* 55, 177-179.
47. **Kreger-Van, R.** (1984). The yeast: a taxonomic study. En *El servier Science Publisher*, Amsterdam.
48. **Kühle, A., Van der Aa y Jeperson, L.** (1998). Detection and identification of wild yeast in lager breweries. En *International Journal of Food Microbiology.* 43, 205-213.
49. **Kurtzman, C. y Fell, J.** (1998). *The Yeasts: A Taxonomic Study.*
50. **Linares, M. y Solís, F.** (2007). *Identificación de Levaduras.* Asociación Española de Micología. En *Rev. Iberoamericana de Micología* – ISBN: 978-84-611-8776-8.
51. **Llanos, M.** (2003). Selección y producción de levaduras vínicas. En *La semana vitivinícola.* N° 2959, p 1302-1308.
52. **López, A., García, G., Quintero, R., López-Munguía A. y Canales, I.** (2002). *Bioteología alimentaria.* México: Limusa, pp. 263-312.

53. **Lucio, O., Polo, L., Pardo, I. y Ferrer, S.** (2009). *Aislamiento e identificación de levaduras vínicas de viñedos ecológicos*. Congreso nacional de Investigación Enológica. Universidad de Valencia, España. pp. 253-256.
54. **Maqueda, M., Zamora, E., Álvarez, M. y Ramírez, M.** (2012). Characterization, Ecological Distribution, and Population Dynamics of *Saccharomyces Sensu Stricto* Killer Yeasts in the Spontaneous Grape Must Fermentations of Southwestern Spain. En *Applied and Environmental Microbiology*, pp. 78 (3): 735-743.
55. **Madrid, A.** (1987). *Manual de enología práctica*. Madrid, España.
56. **Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. y Broock,** (2006). *Biología de los microorganismos*. 10th ed. España: Edit. Pearson - Prentice Hall.
57. **Martini, A. y Martini, A.** (1990). Grape must fermentation past and present. En *Yeast Technology*. Berlin: Springer-Velag, pp. 105-123.
58. **Mas, A., Torija, J., Beltrán, G., Novo, M., Hierro, N., Poblet, M., Rozés, N. y Guillamón J.** (2002). *Selección de Levaduras*

Unitat d'enologia del Centre de Referencia en Tecnologia dels Aliments. Recuperado de <http://www.alcion.es>.

59. **Mas, A., Torija, M., Beltrán, G., Novo, M., Hierro, N., Poblet, M., Rozés, N. y Guillamón, J.** (2006). *Selección de levaduras*. Unitat d'enologia del Centre de Referencia en Tecnologia delsaliments. Facultad de Tarragona Universidad Rovira i Virgili. Tarragona, España. pp: 39-44.
60. **Meléndez, L. y Herrera, N.** (2001). *Saccharomyces cerevisiae: rendimiento en distintas fuentes carbonadas*. (Tesis Doctoral). Ingeniería Química Fac. de Química e Ingeniería Química. UNMSM. Lima, Perú.
61. **Morata, A.** (2004). *Influencia de la maduración antociánica de la uva y de la Biotecnología fermentativa en color, aroma y estructura de vinos tintos*. (Tesis Doctoral). Universidad politécnica de Madrid, departamento de Tecnología de Alimentos.
62. **Nally, M., Maturano, Y., Vázquez, F. y Toro, M.** (2005). *Comportamiento de una cepa salvaje de Saccharomyces cerevisiae*

killer y su isogénica sensible respecto de diferentes fuentes de nitrógeno en cultivos mixtos. En *Rev. Argentina de Microbiología*. v.37 n.2. Versión On-line. ISSN 1851-7617.

63. **Navarre, J.** (1998). *L'oenologie*. París, Francia: Lavoisier. pp 354.
64. **Noguera, J.** (1971). *Viticultura práctica*. Milagro. Lérida.
65. **NTP 212.014** (2011). *Requisitos físicos y químicos de los vinos*. Perú.
66. **OIV-MA-AS323-04B**, (2009). *Method Sulfur dioxide. Compendium of international methods of analysis – OIV*. Resolution Oeno 377/2009.
67. **O.I.V.** (2006). *Codex Enológico Internacional*. Organización Internacional de la Viña y el vino. Edición 2006.
68. **Ough, S.** (1992). *Tratado Básico de Enología*. España: Acribia, SA.
69. **Owen, P.** (1989). *Bioteología de la Fermentación. Principios, procesos y productos*. España: Acribia, SA.

70. **Peynaud, E.** (1977). *Enología práctica*. Madrid, España: Mundi-Prensa.
71. **Peynaud, E.** (1993). *Enología práctica, conocimiento y elaboración del vino*. Madrid, España: Mundi-Prensa.
72. **Peynaud, E.** (1997). *Enología práctica, conocimiento y elaboración del vino*. Madrid, España: Mundi-Prensa.
73. **Puerta, A.** (2000). *Vino. Procesamiento de alimentos. Industria vitivinícola. Pequeña industria. Fermentación. Manuales. San Martín.ITDG – Perú.*
74. **Querol, A., Barrio, E., Huerta, T. y Ramón, D.** (1992). Dry yeast strain for use in fermentation of Alicante wine: Selection and DNA patterns. En *Journal of Food Science*, 57, 183-185
75. **Querol, A., Barrio, E., y Ramon, D.** (1992). A comparative study of different methods of yeast strain characterization. En *System, Appl. Microbiol*, 15, 439-446.

76. **Quintero, R.** (1981). *Ingeniería Bioquímica. Teoría y Aplicación*. México: Alambra Mexicana, SA.
77. **Rainieri, S. y Pretorius, I.** (2000). Selection and improvement of wine yeasts. En *Annals of Microbiology*, N° 50, 15-31.
78. **Regodón, J.** (1997). *Obtención y caracterización de cepas autóctonas de levaduras para la elaboración estandarizada de vinos de calidad*. (Tesis Doctoral). Universidad de Extremadura, España.
79. **Regodón, J.** (2004). *Obtención y caracterización de cepas autóctonas de levaduras para la elaboración estandarizada de vinos de calidad*. Recuperado de <http://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=212>.
80. **Reynier, A.** (1995). *Manual de viticultura*. 5ª ed. Madrid, España: Mundi-Prensa. pp. 113-115.
81. **Robinson, J.** (2006). *The Oxford Companion to wine*. 3ª edición. Oxford University press. ISBN 0-19860990-6.

82. **Robles, H., Miranda, H. y Cahuas, C.** (2005). Aislamiento de levaduras productoras de etanol a partir de chicha de jora del Mercado "Mayorista" de Trujillo (Perú). En *Rev. Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Nacional de Trujillo. REBIOL* 2012; 32(2), 48-55.
83. **Rodríguez, L., Abad, D., Gómez, J., Casanova, J. y Lema, C.** (1998) Fenotipo Killer: Distribución en las comarcas de la Ribeira Sacra en las poblaciones de *Saccharomyces cerevisiae*. En *Food Technology*, 2(1), 33-37.
84. **Rosa, M. y Sa-correica, I.** (1991). In vivo activation by ethanol of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. En *Rev. Applied and environmental microbiology*.
85. **Ruiz, M.** (1991), *Vinificación en tinto*. Viticultura y Enología. Madrid, España: A. Madrid Vicente.
86. **Ruiz, M.** (2004). *Enología para Aficionados*. Recuperado de: <http://www.haro.org>

87. **Sandoval, R., Martínez, R., Hernández, M., Fernández, E., Arvizu, S. y Soto, L.** (2011). Control biológico y químico contra *Fusarium stilboides* en pimiento morrón en poscosecha. En Rev. *Chapingo Serie Horticultura*, 17 (2), 161-172.
88. **Sierra, A.I., Morante, Z.S. y Pérez, Q.D.** (2007). *Experimentación en química analítica*. España:Dykinson. pp. 121-136.
89. **Simunovic, Y.** (1999). *Manual de Bebidas alcohólicas y vinagres*. Subdepartamento Divulgación Técnica Servicio Agrícola y Ganadero – Chile.
90. **Smith, G.** (1963). *Introducción a la microbiología Industrial*. Zaragoza, España:Acribis.
91. **Suárez-Lepe, J.** (1997). *Identificación de levaduras. Seguimiento y control de implantación de las cepas seleccionadas, en levaduras vínicas*. Cap. X. Madrid: Mundi- Prensa,pp. 243-269.
92. **Suárez, J.** (1990). *Selección de levaduras vínicas y producción de aromas (II)*. Alimentación, equipos y tecnología, Abril: 133-137.

93. **Tiago, V., Loureiro-Dias, M., Loureiro, V. y Prista, C.** (2012). Peculiar Homeostasis of *Saccharomyces cerevisiae* during the Late Stages of Wine Fermentation. En *Applied and Environmental Microbiology*, pp. 78 (17), 6302-6308.
94. **Toriya, M.** (2002). *Ecología de levaduras: selección y adaptación a fermentaciones vínicas*. (Tesis Doctoral). Universidad Rovira I Virgili, Tarragona, España.
95. **Valdivieso, M.** (2006). *Obtención y caracterización de Saccharomyces cerevisiae superproductoras de glutation*. Granada, ISBN: 84-338-3821-0.
96. **Valverde, D.** (2009). *Efecto del diluyente en el recuento de células viables de Saccharomyces cerevisiae MITL51*. (Tesis de grado) Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú.
97. **Varnama, A. y Sutherland, J.** (1997). *Bebidas. Tecnología, química y microbiología*. Serie Alimentos Básicos 2. España: EditAcribia.
98. **Vazquez, F., Nally, M., Maturano, P. y Toro, M.** (2001). *Selección de cepas de Levaduras Autóctonas para Vinificación: El Concepto de*

Levadura Plenamente Adaptada - 1ra Parte. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de San Juan. Argentina.

99. **Vilanova, M. y Masneuf-Pomarède.** (2005). Effect of three *Saccharomyces cerevisiae* Strains on the Volatile Composition of Albariño wines. En Rev. *Journal of Food Science*. pp. 17 (2).
100. **Vilanova, M. y Sieiro, C.** (2006). Contribution by *Saccharomyces cerevisiae* yeast to fermentative Xavour compounds in wines from cv. Albariño. En Rev. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. pp. 33: 929-933.
101. **Winkler, A.** (1980). *Desarrollo y composición de frutas En: Viticultura.* México: CECSA, pp. 163-202.

VIII. ANEXOS

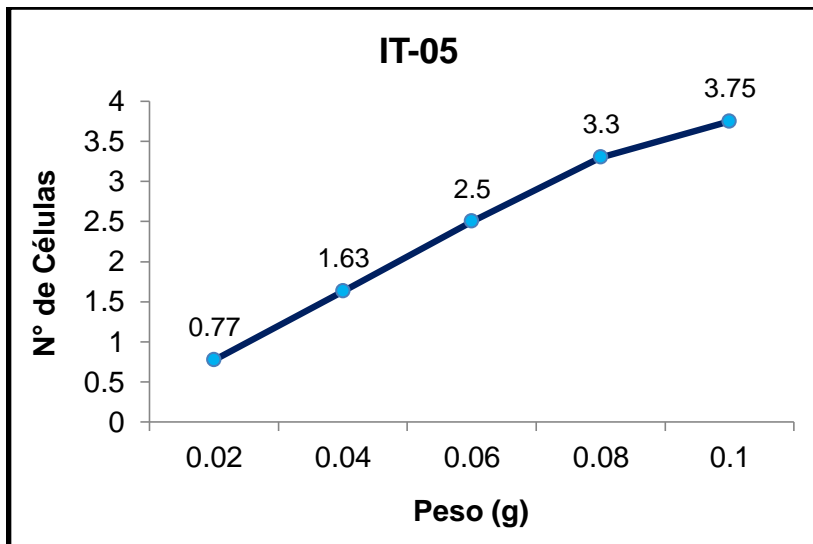
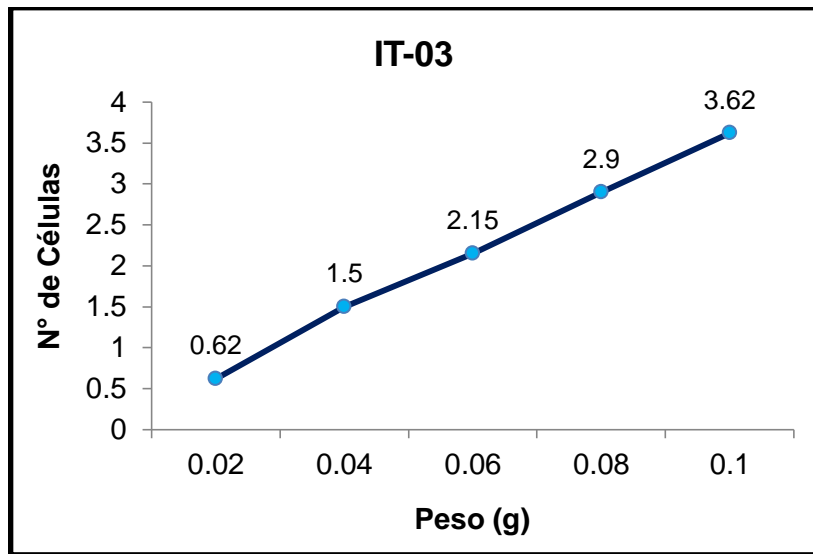
Anexo 1. Preparación del medio Agar Gorodkova.

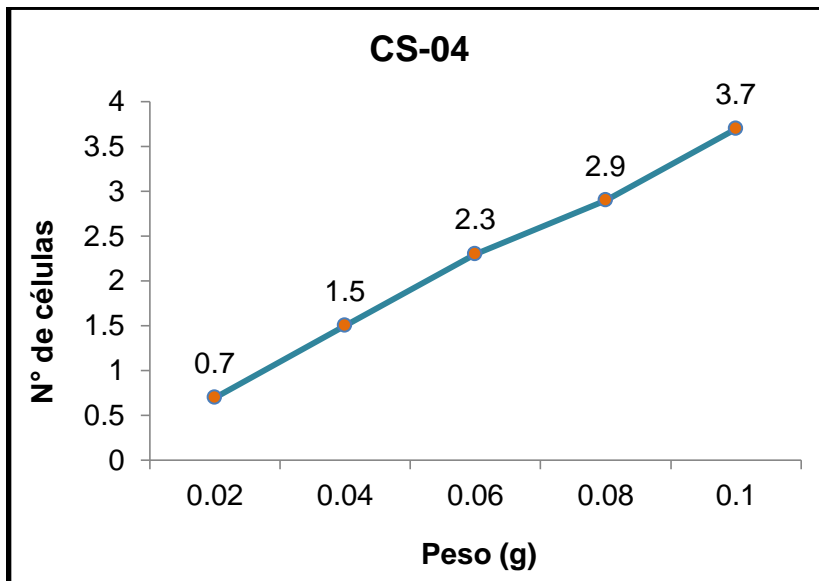
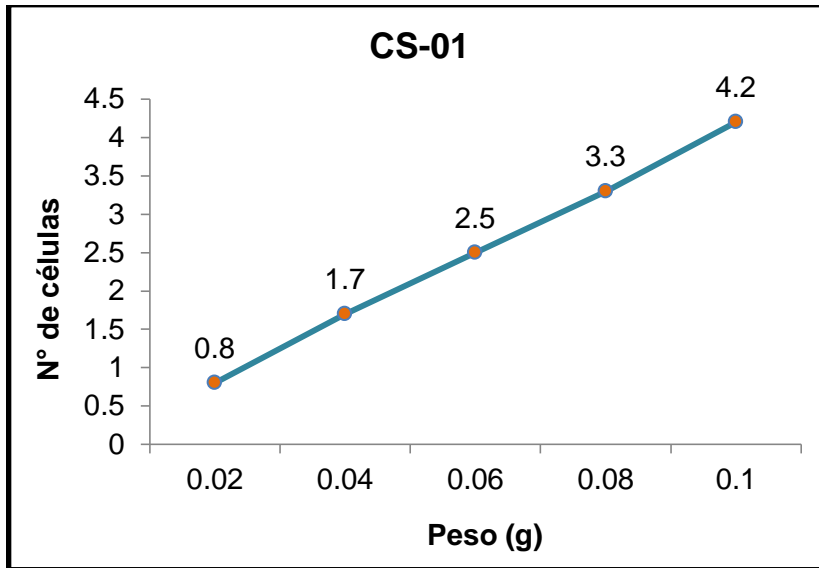
Glucosa	2,5 g
Extracto de carne	3,9 g
NaCl	5,0 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1000 mL

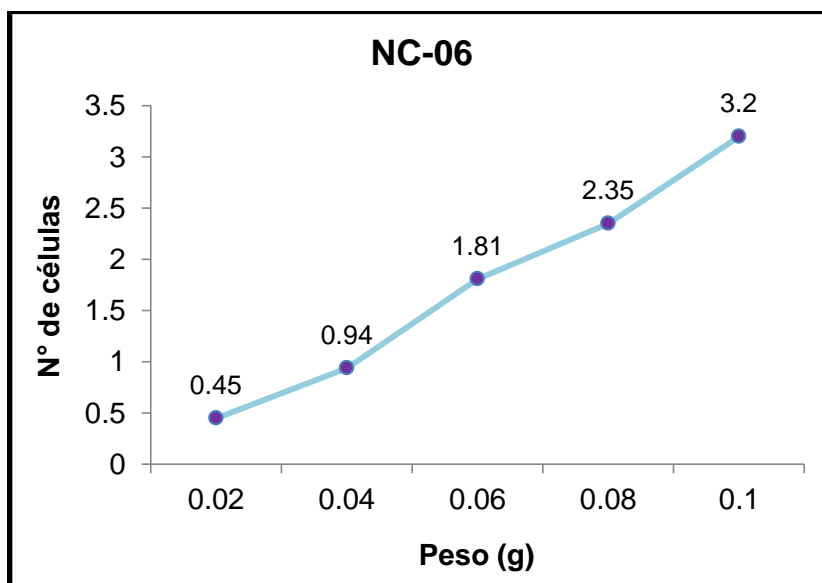
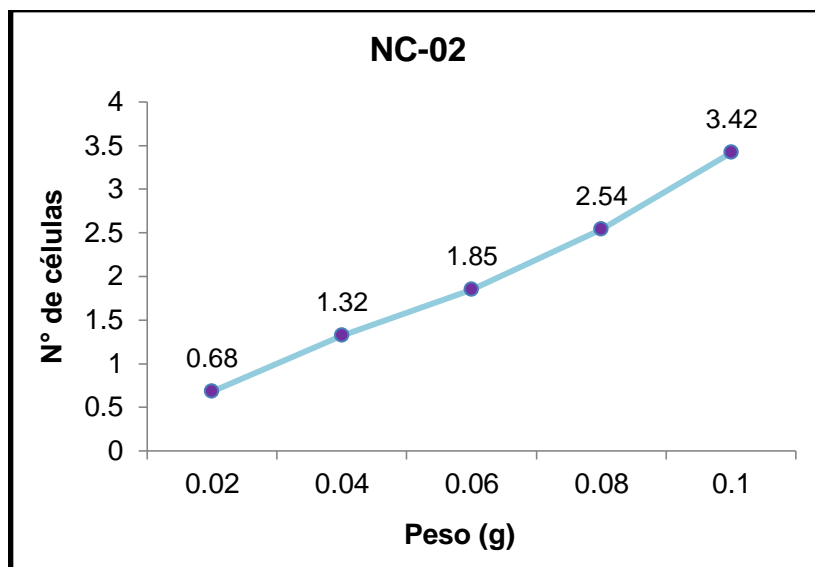
Preparación:

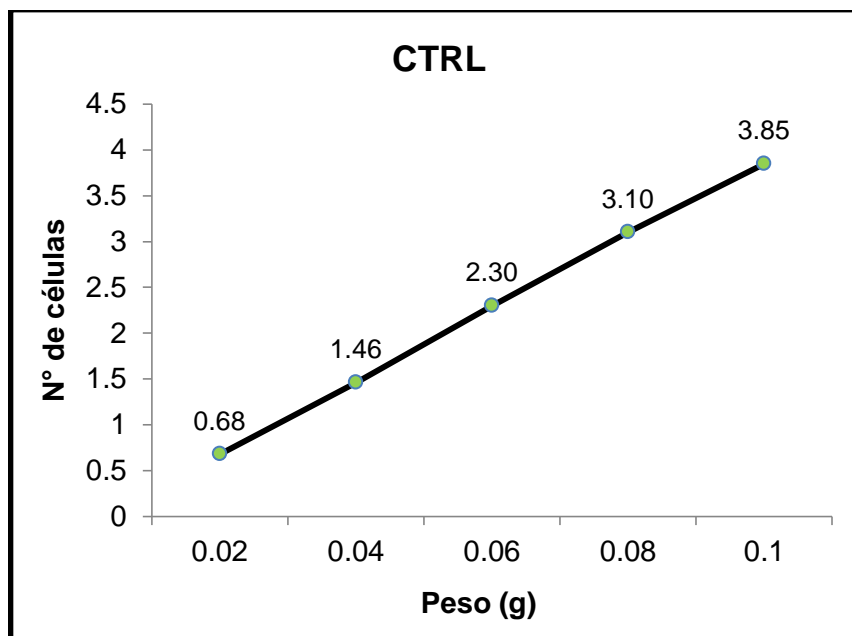
El agar lavado se disolvió en unos 900 mL de agua mediante calentamiento durante 15 a 20 minutos a 110 °C, tras lo cual las restantes sustancias se agregaron a la solución caliente. El sustrato caliente se vació en tubos de ensayo y se esterilizó durante 15 minutos a 120 °C. Este medio se usa para la identificación en la esporogénesis en levaduras.

Anexo 2. Curva patrón de cada cultivo seleccionado como *S. cerevisiae*.





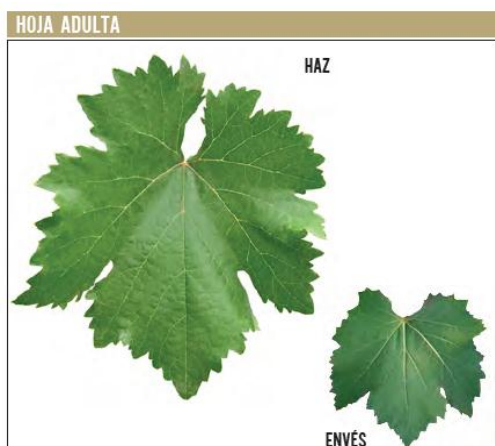




Fuente: Elaboración propia.

Anexo 3. Reconocimiento Ampelográfico de uva Negra criolla.

NEGRA CRIOLLA



Tamaño del limbo	Medio	
Forma del limbo	Pentagonal	
Número de lóbulos	5 lóbulos	
Coloración rojiza en los nervios principales del limbo	Haz	Punto Pecoliar
	Envés	Punto Pecoliar
Forma de los dientes	Ambos lados convexos	
Grado de apertura del seno peciolar	Abierto	
Forma de la base del seno peciolar	En "V"	
Dientes en el seno peciolar	Ausentes	
Grado de apertura de los senos laterales superiores	Lóbulos ligeramente superpuestos	
Forma de la base de los senos laterales superiores	En "V". Presenta dientes en los senos laterales superiores	
Densidad de los pelos tumbados entre los nervios principales en el envés del limbo	Media	
Profundidad de los senos laterales superiores	Media	



Longitud de racimo	Medio
Compacidad de racimo	Compacto
Forma de racimo	Cónico
Longitud de la baya	Mediano
Forma de la baya	Esférica
Color de la epidermis	Roja violeta oscuro
Suculencia de la pulpa	Muy jugosa
Consistencia de la pulpa	Blanda
Sabor particular	Herbáceo
Formación de pepitas	Bien formadas
Peso de los racimos	Bajo

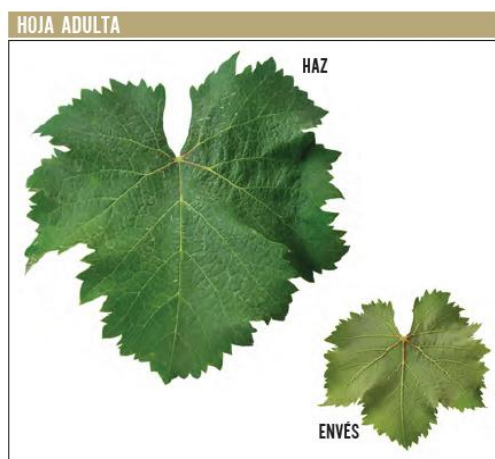


La zona para observar la profundidad de los senos laterales superiores es entre el nervio 1 y el nervio 2.

Fuente: Cáceres, 2012.

Anexo 4. Reconocimiento Ampelográfico de uva Italia

ITALIA



Tamaño del limbo	Pequeño	
Forma del limbo	Cuneiforme	
Número de lóbulos	5 lóbulos	
Coloración rojiza en los nervios principales del limbo	Haz	Hasta 1era Bifurcación
	Envés	Hasta 1era Bifurcación
Forma de los dientes	Ambos lados rectilíneos	
Grado de apertura del seno peciolar	Abierto	
Forma de la base del seno peciolar	En "V"	
Dientes en el seno peciolar	Ausentes	
Grado de apertura de los senos laterales superiores	Lóbulos ligeramente superpuestos	
Forma de la base de los senos laterales superiores	En "V". Presenta diente en los senos laterales superiores	
Densidad de los pelos tumbados entre los nervios principales en el envés del limbo	Alta	
Profundidad de los senos laterales superiores	Superficial	



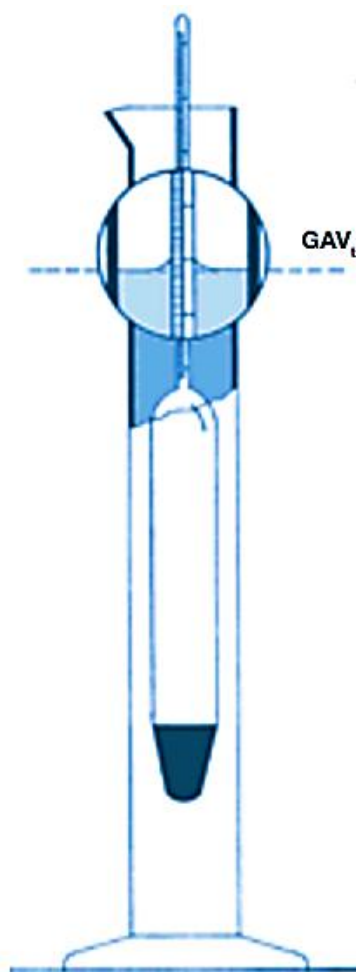
Longitud de racimo	Largo
Compacidad de racimo	Medio
Forma de racimo	Cónica
Longitud de la baya	Larga
Forma de la baya	Ovoide inversa
Color de la epidermis	Verde amarilla
Suculencia de la pulpa	Jugosa
Consistencia de la pulpa	Blanda
Sabor particular	Moscatel
Formación de pepitas	Bien formadas
Peso de los racimos	Elevado



Se debe observar la forma de los dientes entre el nervio 2 y el nervio 3, excluyendo los dientes terminales del nervio 2 y nervio 3.

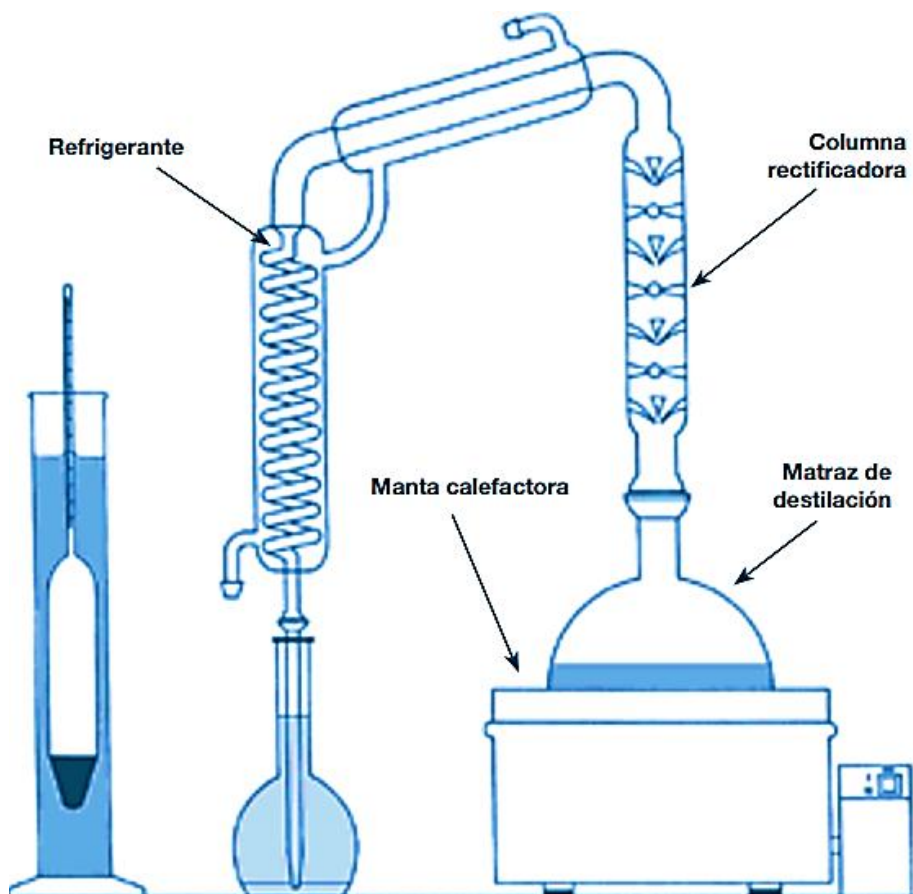
FUENTE: Cáceres, 2012.

Anexo 5. Figura de la lectura del grado alcohólico volumétrico (GAV) del destilado por aerometría.



Fuente: Carazolay col., 2000.

Anexo 6. Figura del aparato de destilación: manta calefactora, matraz de destilación, columna rectificadora y refrigerante.



Fuente: Carazolay col., 2000.

Anexo 7. Monitoreo del ° Brix durante la fermentación de VIT.

Mosto	Rep.	BRIX vs Días											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
VIT-C	R ₁	19	19,4	18	17,7	10,2	9,2	7,9	7,5				
	R ₂	19,1	19,6	18,2	17,6	9,9	9,1	7,8	7,6				
	R ₃	19,3	19,5	17,8	17,7	10	9,3	8	7,6				
	P	19,13	19,50	18,00	17,67	10,03	9,20	7,90	7,57				
VIT-E01	R ₁	19,2	16,8	15,5	15	14,3	13	11,8	10,5	9,8	8	7,3	6,9
	R ₂	19,1	16,7	15,7	15	14,2	12,9	12	10,6	9,8	8,1	7,4	6,9
	R ₃	19,2	16,8	15,6	15,1	14,5	12,9	11,8	10,5	9,7	8	7,4	6,7
	P	19,17	16,77	15,60	15,03	14,33	12,93	11,87	10,53	9,77	8,03	7,37	6,83
VIT-E02	R ₁	19,4	16,6	15,7	15	14,1	13,1	11,7	10,6	10	7,9	7,4	6,7
	R ₂	19,5	16,9	15,7	15	14,2	13,1	11,9	10,6	9,9	8,1	7,3	6,7
	R ₃	19,5	16,6	15,6	15,2	14,2	13,2	11,8	10,5	10	8	7,4	6,8
	P	19,47	16,70	15,67	15,07	14,17	13,13	11,80	10,57	9,97	8,00	7,37	6,73

VIT-C : Vino Italia Control

VIT-E1 : Vino Italia Experimental 1

VIT-E2 : Vino Italia Experimental 2

Fuente : Elaboración propia.

Anexo 8. Monitoreo del ° Brix durante la fermentación de VCS.

Mosto	Rep	BRIX vs Días														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
VCS-C	R ₁	20	20,9	20,5	17,9	15,6	13,8	12,7	11,5	10,9	9,8	9	8,4	8,1	8	7,4
	R ₂	20	21,1	20,5	18	15,9	13,6	12,7	11,3	11	9,9	9	8,3	8,3	7,9	7,2
	R ₃	20	21	20,8	17,9	15,9	13,9	12,9	11,8	11	9,8	9	8,4	8,2	7,9	7,5
	P	20,00	21,00	20,60	17,93	15,80	13,77	12,77	11,53	10,97	9,83	9,00	8,37	8,20	7,93	7,37
VCS-E1	R ₁	20	18	17,5	17,1	15,5	13,7	12,4	11,5	11,1	9,3	8,7	8,4	8,2	7,7	7,3
	R ₂	20,1	18,3	17,5	16,9	15,6	13,8	12,4	11,3	11	9,5	8,6	8,4	8,4	8	7,2
	R ₃	19,9	18,1	17,5	17	15,6	13,8	12,4	11,4	11	9,5	8,8	8,4	8	8,2	7,5
	P	20,00	18,13	17,50	17,00	15,57	13,77	12,40	11,40	11,03	9,43	8,70	8,40	8,20	7,97	7,33
VCS-E2	R ₁	20	18,2	17,4	17	15,4	13,6	12,3	11,4	11	9,5	8,7	8,3	8,1	7,7	7,4
	R ₂	20	18,2	17,3	17,1	15,4	13,6	12,3	11,3	10,9	9,4	8,6	8,4	8,1	7,7	7,4
	R ₃	19,9	18,3	17,4	17,1	15,5	13,7	12,4	11,3	11	9,5	8,6	8,4	8	7,7	7,5
	P	19,97	18,23	17,37	17,07	15,43	13,63	12,33	11,33	10,97	9,47	8,63	8,37	8,07	7,70	7,43

VCS-C : Vino Cabernet sauvignon Control

VCS-E1 : Vino Cabernet sauvignon Experimental 1

VCS-E2 : Vino Cabernet sauvignon Experimental 2

Fuente: Elaboración propia.

Anexo 9. Monitoreo del ° Brix durante la fermentación de VNC.

Mosto	R.	BRIX vs Días														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
VNC-C	R ₁	21,1	21,5	21,9	21	18,4	16,3	14,1	13,5	13,3	11,4	11,2	10,2	9,9	9	8,8
	R ₂	21,2	21,5	21,7	21,2	18,5	16,3	14	13,7	13,5	11,7	11	10,3	9,9	9	8,8
	R ₃	21,3	21,4	21,8	21,2	28,4	16,1	14	13,5	13,2	11,5	10,8	10,2	10,1	9	8,7
	P	21,20	21,47	21,80	21,13	21,77	16,23	14,03	13,57	13,33	11,53	11,00	10,23	9,97	9,00	8,77
VNC-E1	R ₁	21,2	21,5	21	20,2	16,5	15	14,4	13,9	13,1	12,1	11,5	10,5	10,2	9,5	9,3
	R ₂	21,3	21,5	20,9	20,2	16,6	15,1	14,3	13,8	12,9	12,2	11,6	10,3	10,2	9,6	9,4
	R ₃	21,2	21,6	20,8	20,1	16,6	15,1	14,3	13,6	12,9	12	11,5	10,3	10,1	9,5	9,4
	P	21,23	21,53	20,90	20,17	16,57	15,07	14,33	13,77	12,97	12,10	11,53	10,37	10,17	9,53	9,37
VNC-E2	R ₁	21,1	21,5	20	20,1	16,5	15,1	14,3	13,8	13	12,2	11,5	10,4	10,1	9,6	9,2
	R ₂	21,2	21,5	20,8	20,2	16,4	15	14,2	13,8	13	12,2	11,5	10,4	10	9,5	9,3
	R ₃	21,2	21,5	20,8	20,1	16,4	15	14,2	13,7	13	12,1	11,4	10,3	10	9,6	9,3
	P	21,17	21,50	20,53	20,13	16,43	15,03	14,23	13,77	13,00	12,17	11,47	10,37	10,03	9,57	9,27

VNC-C : Vino Negra criolla Control
VNC-E1 : Vino Negra criolla Experimental 1
VNC-E2 : Vino Negra criolla Experimental 2

Fuente: Elaboración propia.

Anexo 10. Monitoreo del °Bé durante la fermentación de VIT.

Mosto	Rep.	BAUMÉ vs Días											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
VIT-C	R ₁	11,4	12,5	12,5	11,1	3,7	1,9	0,5	0				
	R ₂	11,5	12,5	12	11	2,7	2,3	0,5	0				
	R ₃	11,5	12,6	12	11	3,9	1,8	0,5	0				
	P	11,47	12,53	12,17	11,00	3,43	2,00	0,50	0,00				
VIT-E1	R ₁	11,7	10,4	9,9	8	6,2	4,9	4,4	2,9	2,2	1,1	0,1	0
	R ₂	11,6	10,6	9,9	8	6,1	5,1	3,9	3	2,5	1,3	0,1	0
	R ₃	11,7	10,5	10	8	5,8	5	3,8	3	2,5	0,9	0	0
	P	11,67	10,50	9,93	8,00	6,03	5,00	4,03	2,97	2,40	1,10	0,07	0,00
VIT-E2	R ₁	11,5	10,2	10	8,1	6,4	4,7	4,2	2,9	2,3	1,3	0,2	0
	R ₂	11,4	10,3	10,1	7,9	6,1	4,7	4,1	2,9	2,4	1,2	0	0
	R ₃	11,5	10,5	10	8,1	6,3	4,9	3,9	3	2,3	1	0,1	0
	P	11,47	10,33	10,03	8,03	6,27	4,77	4,07	2,93	2,33	1,17	0,10	0,00

VIT-C : Vino Italia Control

VIT-E1 : Vino Italia Experimental 1

VIT-E2 : Vino Italia Experimental 2

Fuente: Elaboración propia.

Anexo 11. Monitoreo del °Bé durante la fermentación de VCS.

Mosto	Rep.	BAUMÉ vs Días														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
VCS-C	R ₁	11,5	12,2	11,58	10	6,7	5,9	4,6	4	3,5	2,8	2	1,5	1	0,6	0,1
	R ₂	11,5	12,6	12	9,9	6,6	6	4,5	4	3,5	2,7	2	1,7	1	0,6	0,3
	R ₃	11,5	12,3	12,1	10	7,3	6	4,6	4	3,3	2,5	2	1,5	1	0,5	0,1
	P	11,50	12,37	11,89	9,97	6,87	5,97	4,57	4,00	3,43	2,67	2,00	1,57	1,00	0,57	0,17
VCS-E1	R ₁	11,3	10,8	11	10,1	7	5,9	5	4,3	3,1	2,5	1,9	1,5	1	0,4	0
	R ₂	11,6	11,2	11	9,9	6,9	6	5	4,1	2,9	2,4	1,9	1,5	1	0,5	0
	R ₃	11,5	11,1	11	9,9	7	6	5	4,1	3	2,3	2	1,5	1	0,4	0
	P	11,47	11,03	11,00	9,97	6,97	5,97	5,00	4,17	3,00	2,40	1,93	1,50	1,00	0,43	0,00
VCS-E2	R ₁	11,5	11	10,8	10	7	6	5,3	4,1	3	2,7	1,6	1,3	0,8	0,1	0
	R ₂	11,6	11,1	10,9	10,1	6,9	5,8	5,1	4	3,2	2,6	1,8	1,4	0,6	0,2	0
	R ₃	11,5	11,1	10,9	10,1	6,9	5,9	5,1	4	2,9	2,4	2	1,5	1	0,1	0
	P	11,53	11,07	10,87	10,07	6,93	5,90	5,17	4,03	3,03	2,57	1,80	1,40	0,80	0,13	0,00

VCS-C : Vino Cabernet sauvignon Control
 VCS-E1 : Vino Cabernet sauvignon Experimental 1
 VCS-E2 : Vino Cabernet sauvignon Experimental 2

Fuente: Elaboración propia.

Anexo 12. Monitoreo del °Bé durante la fermentación de VNC

Mosto	Rep.	BAUMÉ vs Días														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
VNC-C	R ₁	12	12,6	12,9	12,1	8,4	8	6,5	5,2	4,5	2,9	2,7	2,6	2	1,1	0,4
	R ₂	12	12,6	13	12,1	8,5	8,1	6,6	4,9	4,4	3	2,7	2,6	2	1	0,4
	R ₃	12	12,5	13	12	8,3	8	6,6	5	4,4	3	2,9	2,5	2	1	0,5
	P	12,00	12,57	12,97	12,07	8,40	8,03	6,57	5,03	4,43	2,97	2,77	2,57	2,00	1,03	0,43
VNC-E1	R ₁	12,1	12,4	12	10,5	7	6,6	5,5	5	4,5	3,5	2,9	2,4	2	1,4	1,1
	R ₂	12	12,4	12	10,5	7	6,3	5,6	4,9	4,4	3,4	3,3	2,4	2,1	1,6	0,7
	R ₃	12	12,6	11,9	10,4	6,9	6,5	5,5	5,1	4,4	3,5	2,9	2,5	1,9	1,5	1
	P	12,03	12,47	11,97	10,47	6,97	6,47	5,53	5,00	4,43	3,47	3,03	2,43	2,00	1,50	0,93
VNC-E2	R ₁	12	12,5	12,2	10,4	6,9	6,5	5,4	5,1	4,6	3,4	2,8	2,3	1,9	1,1	0,3
	R ₂	12	12,4	12,1	10,4	7,1	6,6	5,6	5	4,6	3,3	3	2,4	2	1,2	0,5
	R ₃	12	12,4	12	10,3	7	6,5	5,6	5,1	4,5	3,5	3,2	2,3	1,9	1	0,5
	P	12,00	12,43	12,10	10,37	7,00	6,53	5,53	5,07	4,57	3,40	3,00	2,33	1,93	1,10	0,43

VNC-C : Vino Negra criolla Control
VNC-E1 : Vino Negra criolla Experimental 1
VNC-E2 : Vino Negra criolla Experimental 2

Fuente: Elaboración propia.

Anexo 13. Monitoreo del pH durante la fermentación de VIT.

Mosto	Rep.	pH vs Días											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
VIT-C	R ₁	4,01	3,96	3,9	3,8	3,6	3,7	3,8	3,7				
	R ₂	4,02	3,92	3,9	3,7	3,7	3,7	3,5	3,7				
	R ₃	3,9	3,83	3,8	3,7	3,9	3,8	3,6	3,4				
	P	3,98	3,90	3,87	3,73	3,73	3,73	3,63	3,60				
VIT-E1	R ₁	4,05	4,02	3,97	3,91	3,74	3,88	3,8	3,89	3,72	3,7	3,75	3,67
	R ₂	4,1	3,99	3,89	3,81	3,72	3,62	3,6	3,64	3,84	3,82	3,65	3,73
	R ₃	4	3,95	4	3,83	3,81	3,64	3,7	3,77	3,7	3,5	3,67	3,61
	P	4,05	3,99	3,95	3,85	3,76	3,71	3,70	3,77	3,75	3,67	3,69	3,67
VIT-E2	R ₁	4,01	3,98	3,91	3,89	3,75	3,73	3,77	3,78	3,75	3,71	3,68	3,72
	R ₂	3,97	3,99	3,87	3,91	3,77	3,69	3,67	3,84	3,76	3,68	3,69	3,64
	R ₃	3,96	3,96	3,95	3,83	3,69	3,71	3,71	3,69	3,75	3,76	3,72	3,69
	P	3,98	3,98	3,91	3,88	3,74	3,71	3,72	3,77	3,75	3,72	3,70	3,68

VIT-C : Vino Italia Control

VIT-E1 : Vino Italia Experimental 1

VIT-E2 : Vino Italia Experimental 2

Fuente: Elaboración propia.

Anexo 14. Monitoreo del pH durante la fermentación de VCS.

Mosto	Rep.	pH vs Días														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
VCS-C	R ₁	3,92	3,97	3,94	3,93	3,84	3,85	3,69	3,74	3,67	3,65	3,58	3,56	3,52	3,5	3,54
	R ₂	3,9	3,95	3,9	3,91	3,8	3,77	3,72	3,77	3,69	3,69	3,66	3,57	3,49	3,48	3,56
	R ₃	3,91	3,96	3,97	3,89	3,98	3,79	4	3,69	3,8	3,59	3,57	3,5	3,7	3,63	3,59
	P	3,91	3,96	3,94	3,91	3,87	3,80	3,80	3,73	3,72	3,64	3,60	3,54	3,57	3,54	3,56
VCS-E1	R ₁	3,89	3,94	4,1	3,9	3,83	3,68	3,74	3,7	3,65	3,61	3,73	3,58	3,66	3,63	3,78
	R ₂	3,88	3,89	3,89	3,92	3,85	3,79	3,77	3,74	3,77	3,88	3,91	3,96	3,63	3,98	3,74
	R ₃	4,01	4,1	3,9	3,89	3,9	3,76	3,66	3,67	3,69	3,58	3,44	3,57	3,59	3,55	3,68
	P	3,93	3,98	3,96	3,90	3,86	3,74	3,72	3,70	3,70	3,69	3,69	3,70	3,63	3,72	3,73
VCS-E2	R ₁	3,93	3,89	4,07	3,89	3,88	3,76	3,74	3,69	3,73	3,68	3,69	3,68	3,82	3,95	3,76
	R ₂	3,87	3,94	3,92	3,89	3,99	3,64	3,69	3,74	3,68	3,67	3,78	3,89	3,79	3,59	3,84
	R ₃	4,03	3,98	3,87	3,96	3,83	3,97	3,99	3,98	3,98	3,97	3,85	3,69	3,59	3,68	3,62
	P	3,94	3,94	3,95	3,91	3,90	3,79	3,81	3,80	3,80	3,77	3,77	3,75	3,73	3,74	3,74

VCS-C : Vino Cabernet sauvignon Control
 VCS-E1 : Vino Cabernet sauvignon Experimental 1
 VCS-E2 : Vino Cabernet sauvignon Experimental 2

Fuente: Elaboración propia.

Anexo 15. Monitoreo del pH durante la fermentación de VNC.

179

Mosto/ Vino	Rep.	pH vs Días														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
VNC-C	R ₁	3,87	3,94	4,08	3,85	3,73	3,74	3,87	3,77	3,67	3,65	3,66	3,76	3,76	3,61	3,61
	R ₂	3,87	3,9	3,88	3,82	3,85	3,89	3,77	3,75	3,67	3,78	3,56	3,55	3,63	3,66	3,64
	R ₃	3,97	3,89	3,68	3,99	3,79	3,65	3,69	3,61	3,74	3,58	3,74	3,61	3,52	3,64	3,66
	P	3,9	3,91	3,88	3,89	3,79	3,76	3,78	3,71	3,69	3,67	3,65	3,64	3,64	3,64	3,64
VNC-E1	R ₁	4,01	3,99	3,98	3,99	3,95	3,98	3,95	3,97	3,54	3,65	3,66	3,64	3,73	3,69	3,74
	R ₂	3,89	3,95	3,99	3,89	3,97	3,91	3,93	3,91	3,69	3,78	3,61	3,7	3,64	3,62	3,61
	R ₃	4,01	3,99	3,96	3,94	3,88	3,94	3,89	3,92	3,93	3,59	3,67	3,61	3,57	3,58	3,51
	P	3,97	3,98	3,98	3,94	3,93	3,94	3,92	3,93	3,72	3,67	3,65	3,65	3,65	3,63	3,62
VNC-E2	R ₁	3,99	3,94	3,86	3,88	3,95	4,02	3,91	3,77	3,76	3,57	3,64	3,61	3,64	3,59	3,65
	R ₂	3,94	4,03	4,05	3,91	3,99	3,94	3,89	3,94	3,53	3,68	3,69	3,67	3,65	3,68	3,68
	R ₃	4,02	3,88	3,89	3,99	3,81	3,83	3,95	3,93	3,89	3,63	3,56	3,61	3,59	3,61	3,55
	P	3,98	3,95	3,93	3,93	3,92	3,93	3,92	3,88	3,73	3,63	3,63	3,63	3,63	3,63	3,63

VNC-C : Vino Negra criolla Control

VNC-E1 : Vino Negra criolla Experimental 1

VNC-E2 : Vino Negra criolla Experimental 2

Fuente: Elaboración propia.

Anexo 16. Monitoreo de la temperatura durante la fermentación de VIT

Mosto/ Vino	Rep.	TEMPERATURA (°C) vs TIEMPO (días)										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
VIT-C	R ₁	20	20	20,7	21	21,2	20	20	20			
	R ₂	20,2	20,1	20,7	21	21,4	20	20	19,9			
	R ₃	20,2	20	20,9	21	21,5	20	20	20			
	P	20,13	20,03	20,77	21,00	21,37	20,00	20,00	19,97			
VIT-E1	R ₁	20	20,3	21	21	21,4	21,5	21	21,1	20,5	20	20
	R ₂	20	20,3	20,9	21	21,5	21,4	20,8	21	20,6	20	19,7
	R ₃	20	20,4	20,9	21	21,5	21	20,8	21	20,6	20	20
	P	20,00	20,33	20,93	21,00	21,47	21,30	20,87	21,03	20,57	20,00	19,90
VIT-E2	R ₁	20,1	20,3	20,8	21	21,5	21,4	21	21	20,5	20	20
	R ₂	20,2	20,3	20,8	21	21,5	21,4	21	21,2	20,5	20	20
	R ₃	20,1	20,2	20,9	21	21,5	21,5	21	21	20,6	20	20
	P	20,13	20,27	20,83	21,00	21,50	21,43	21,00	21,07	20,53	20,00	20,00

VIT-C : Vino Italia Control

VIT-E1 : Vino Italia Experimental 1

VIT-E2 : Vino Italia Experimental 2

Fuente: Elaboración propia.

Anexo 17. Monitoreo de la temperatura durante la fermentación de VCS.

Mosto/ Vino	Rep.	TEMPERATURA (°C) vs TIEMPO (días)														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
VCS-C	R ₁	20	20	21	21	21,3	21,5	21,4	21	20,6	20	20	19,8	19,9	20	19,9
	R ₂	20,1	20	21	21	21,4	21,5	21,5	20,6	20,6	20	19,8	19,8	19,9	20	20
	R ₃	20	20,1	21,1	21	21,3	21,5	21,5	20,7	20,6	20	19,8	19,7	20	20	19,9
	P	20,03	20,03	21,03	21,00	21,33	21,50	21,47	20,77	20,60	20,00	19,87	19,77	19,93	20,00	19,93
VCS-E1	R ₁	20	20,2	20,9	21	21,1	21,3	21,5	21	20,9	20,8	20	20	19,8	19,2	19,1
	R ₂	20,1	20,2	20,8	21	21,2	21,1	21,5	21	20,9	20,9	19,9	19,7	19	19,3	19
	R ₃	20,1	20,1	20,8	21	21,2	21	21,5	21	20,9	20,9	20	19,7	19	19	19
	P	20,07	20,17	20,83	21,00	21,17	21,13	21,50	21,00	20,90	20,87	19,97	19,80	19,27	19,17	19,03
VCS-E2	R ₁	20	20,1	20,9	21	21	21,2	21,5	21	20,9	20,8	19,9	20	20	20	20
	R ₂	20	20,2	20,9	21	21	21,2	21,5	21	20,9	20,8	19,9	20	20	20	20
	R ₃	20	20,1	20,8	21	21	21,2	21,5	21	20,9	20,9	20	20	20	20	20
	P	20,00	20,13	20,87	21,00	21,00	21,20	21,50	21,00	20,90	20,83	19,93	20,00	20,00	20,00	20,00

VCS-C : Vino Cabernet sauvignon Control
VCS-E1 : Vino Cabernet sauvignon Experimental 1
VCS-E2 : Vino Cabernet sauvignon Experimental 2

Fuente: Elaboración propia.

Anexo 18. Monitoreo de la temperatura durante la fermentación de VNC.

Mosto/ Vino	Rep.	TEMPERATURA (°C) vs TIEMPO (días)														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
VNC-C	R ₁	20	20,1	20,4	21	21,5	21,2	21	21	21	20	20	19	19	19	19
	R ₂	20	20,1	20,5	21	21,5	21,3	21	21,2	20,9	20	20,1	19	19,3	19	19
	R ₃	20	20,1	20,5	21	21,4	21,3	21	21,1	20,9	20,1	20,1	19	19,3	19	19
	P	20,00	20,10	20,47	21,00	21,47	21,27	21,00	21,10	20,93	20,03	20,07	19,00	19,20	19,00	19,00
VNC-E1	R ₁	20,2	20	20,5	21,5	21,7	21,5	21,1	21	21,1	20	20	20	20	20	19,9
	R ₂	20,2	20	20,5	21,5	21,6	21,6	21	21	20,8	20	19,9	19,8	20	19,8	20
	R ₃	20,1	20	20,5	21,5	21,7	21,6	21	21	20,8	20	19,9	19,8	19,9	19,9	20
	P	20,17	20,00	20,50	21,50	21,67	21,57	21,03	21,00	20,90	20,00	19,93	19,87	19,97	19,90	19,97
VNC-E2	R ₁	20	20	20,5	21	21,5	21,5	21	21	20,7	20,5	20	20	19,7	19,5	19,5
	R ₂	20	20	20,5	21	21,6	21,5	21	21	20,8	20	20	20	19,7	19,5	19,4
	R ₃	20	20	20,5	21,5	21,6	21,5	21	21	20,8	20	20	20	19,9	19,5	19,5
	P	20,00	20,00	20,50	21,17	21,57	21,50	21,00	21,00	20,77	20,17	20,00	20,00	19,77	19,50	19,47

VNC-C : Vino Negra criolla Control

VNC-E1 : Vino Negra criolla Experimental 1

VNC-E2 : Vino Negra criolla Experimental 2

Fuente: Elaboración propia.

Anexo 19. Resumen general del estudio analítico del vino blanco Italia (VIT).

Variedades	Rep.	Acidez total ác. tartárico (g/l)	Acidez volátil ác. acético (g/l)	Grado alcohólico (vol %)	Azúcar reductor (g/L)	SO ₂ total (mg/L)	pH
VIT-C	R ₁	5,24	1,21	9,3	1,5	207,15	3,82
	R ₂	4,59	1,13	8,9	1,9	174,92	3,79
	R ₃	5,16	1,21	9	2	203,11	4,11
	P	5,00	1,18	9,07	1,80	195,06	3,91
VIT-E1	R ₁	5,81	1,05	10	1,57	184,29	3,71
	R ₂	5,49	1,27	10,2	2,17	176,12	4,06
	R ₃	5,53	1,25	9,9	2,46	169,17	3,91
	P	5,61	1,19	10,03	2,07	176,53	3,89
VIT-E2	R ₁	5,21	1,09	10,5	1,47	168,94	3,61
	R ₂	4,89	1,23	10,9	1,24	149,55	4,16
	R ₃	5,33	1,29	10,1	1,66	189,05	3,88
	P	5,14	1,20	10,50	1,46	169,18	3,88

VIT-C : Vino Italia Control

VIT-E1 : Vino Italia Experimental 1

VIT-E2 : Vino Italia Experimental 2

P :Promedio

Fuente: Elaboración propia.

Anexo 20. Resumen general del estudio analítico del vino tinto Cabernet sauvignon (VCS)

Variedades	Rep.	Acidez total ác. tartárico (g/l)	Acidez volátil ác. acético (g/l)	Grado alcohólico (vol %)	Azúcar reductor (g/L)	SO ₂ total (mg/L)	pH
VCS-C	R ₁	4,75	0,56	12,5	2,99	110,15	3,25
	R ₂	4,29	0,43	11,2	1,59	121,12	3,92
	R ₃	5,45	0,31	11,8	2,93	114,11	3,79
	P	4,83	0,43	11,83	2,50	115,13	3,65
VCS-E1	R ₁	4,75	0,71	12,4	2,42	98,38	3,89
	R ₂	5,53	0,36	11,9	2,55	100,12	3,62
	R ₃	4,61	0,66	10,7	1,69	105,11	3,59
	P	4,96	0,58	11,67	2,22	101,20	3,70
VCS-E2	R ₁	4,15	0,32	11,4	2,42	100,23	3,89
	R ₂	6,92	0,59	10,7	2,55	101,25	3,62
	R ₃	4,04	0,46	12,5	1,69	104,13	3,59
	P	5,04	0,46	11,53	2,22	101,87	3,70

VCS-C : Vino Cabernet sauvignon Control

VCS-E1 : Vino Cabernet sauvignon Experimental 1

VCS-E2 : Vino Cabernet sauvignon Experimental 2

P :Promedio

Fuente: Elaboración propia.

Anexo 21. Resumen general del estudio analítico del vino tinto Negra criolla (VNC)

Variedades	Rep.	Acidez total ác. tartárico (g/l)	Acidez volátil ác. acético (g/l)	Grado alcohólico (vol %)	Azúcar reductor (g/L)	SO ₂ total (mg/L)	pH
VNC-C	R ₁	5,94	1,49	11,9	2,73	187,16	4,17
	R ₂	5,67	1,31	12,5	2,66	165,12	3,76
	R ₃	6,14	1,37	12,1	3,6	179,07	3,87
	P	5,92	1,39	12,17	3,00	177,12	3,93
VNC-E1	R ₁	5,91	1,44	11,7	2,58	174,83	3,91
	R ₂	5,89	1,32	12,1	3,67	186,41	4,13
	R ₃	6,41	1,48	10,7	3,29	162,11	3,99
	P	6,07	1,41	11,50	3,18	174,45	4,01
VNC-E2	R ₁	5,89	1,31	12,7	3,28	154,83	3,79
	R ₂	5,41	1,42	12,4	2,84	166,41	3,73
	R ₃	6,66	1,28	11,5	2,93	172,11	3,99
	P	5,99	1,34	12,20	3,02	164,45	3,84

VNC-C : Vino Negra criolla Control
VNC-E1 : Vino Negra criolla Experimental 1
VNC-E2 : Vino Negra criolla Experimental 2
P :Promedio

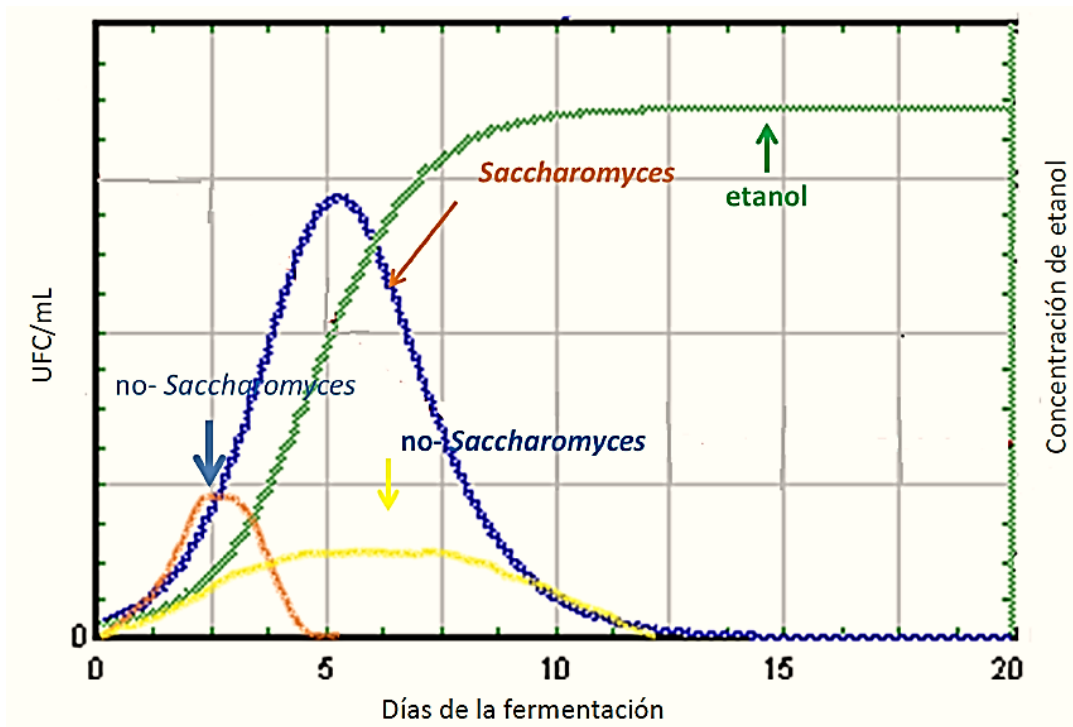
Fuente: Elaboración propia.

Anexo 22. NTP 212.014:2011. Tabla de requisitos físicos y químicos.

REQUISITOS FÍSICOS Y QUÍMICOS	Mínimo	Máximo	Tolerancia al valor declarado	Método de ensayo
Grado alcohólico volumétrico a 20/20 °C (% vol)	Para los vinos espumosos: 6,5 Para los demás vinos: 10,0	-	+/- 0,5	NTP 212.030
Extracto seco total a 100°C (g/L)	Para los vinos blancos y rosados: 16,0 Para los vinos tintos: 21,0	-		NTP 212.036
Acidez volátil, como ácido acético (g/L)	-	1,2		NTP 212.031
Sulfatos, como sulfato de	-	1,0		NTP 212.006

potasio (g/L)		<p>Para los vinos envejecidos en barricas durante al menos 2 años para los vinos endulzados para los vinos obtenidos mediante la adición de alcohol o espirituosos de los mostos o vinos: 1,5</p> <p>Para los vinos con adición de mosto concentrado, para los vinos dulces naturales: 2,0</p>		
Cloruros, como cloruros de sodio (g/L)	-	1,0		NTP 212.008
Alcohol metílico (mg/L)	-	<p>Para los vinos tintos: 400</p> <p>Para los vinos blancos y rosados: 250</p>		NTP 212.032
Acidez cítrica (g/L)	-	1,0		NTP 212.037
Acidez total, como acidez tartárica (g/L)	3,0	7,0		NTP 212.047
Anhidrido sulfuroso total	-	<p>Para vinos tintos que contengan como máximo 4 g/L de sustancias reductoras: 150,0</p> <p>Para vinos blancos y rosados que contengan como máximo 4g/L de sustancias reductoras: 200,0</p> <p>Para vinos blancos y rosados que contengan más de 4g/L de sustancias reductoras: 300,0</p> <p>Excepcionalmente en algunos vinos blancos dulces: 400,0</p>		NTP 212.215

Anexo 23. Gráfico sobre la dinámica de levaduras durante la fermentación.



Fuente: Navarre, 1998.

Anexo 24. Ficha de cata de la O.I.V.

		FICHA DE DEGUSTACIÓN					
Jurado	Nº	Muestra	Nº	Categoría	Nº		
		Excelente + → - Insuficiente					
Vista	Limpidez	<input type="checkbox"/> (5)	<input type="checkbox"/> (4)	<input type="checkbox"/> (3)	<input type="checkbox"/> (2)	<input type="checkbox"/> (1)	
	Aspecto aparte de la limpidez	<input type="checkbox"/> (10)	<input type="checkbox"/> (8)	<input type="checkbox"/> (6)	<input type="checkbox"/> (4)	<input type="checkbox"/> (2)	
Olfato	Franqueza	<input type="checkbox"/> (6)	<input type="checkbox"/> (5)	<input type="checkbox"/> (4)	<input type="checkbox"/> (3)	<input type="checkbox"/> (2)	
	Intensidad positiva	<input type="checkbox"/> (8)	<input type="checkbox"/> (7)	<input type="checkbox"/> (6)	<input type="checkbox"/> (4)	<input type="checkbox"/> (2)	
	Calidad	<input type="checkbox"/> (16)	<input type="checkbox"/> (14)	<input type="checkbox"/> (12)	<input type="checkbox"/> (10)	<input type="checkbox"/> (8)	
Gusto	Franqueza	<input type="checkbox"/> (6)	<input type="checkbox"/> (5)	<input type="checkbox"/> (4)	<input type="checkbox"/> (3)	<input type="checkbox"/> (2)	
	Intensidad positiva	<input type="checkbox"/> (8)	<input type="checkbox"/> (7)	<input type="checkbox"/> (6)	<input type="checkbox"/> (4)	<input type="checkbox"/> (2)	
	Persistencia armoniosa	<input type="checkbox"/> (8)	<input type="checkbox"/> (7)	<input type="checkbox"/> (6)	<input type="checkbox"/> (5)	<input type="checkbox"/> (4)	
	Calidad	<input type="checkbox"/> (22)	<input type="checkbox"/> (19)	<input type="checkbox"/> (16)	<input type="checkbox"/> (13)	<input type="checkbox"/> (10)	
Armonía - Juicio global		<input type="checkbox"/> (11)	<input type="checkbox"/> (10)	<input type="checkbox"/> (9)	<input type="checkbox"/> (8)	<input type="checkbox"/> (7)	
TOTAL		+	+	+	+	+	
Eliminado por defecto mayor							0

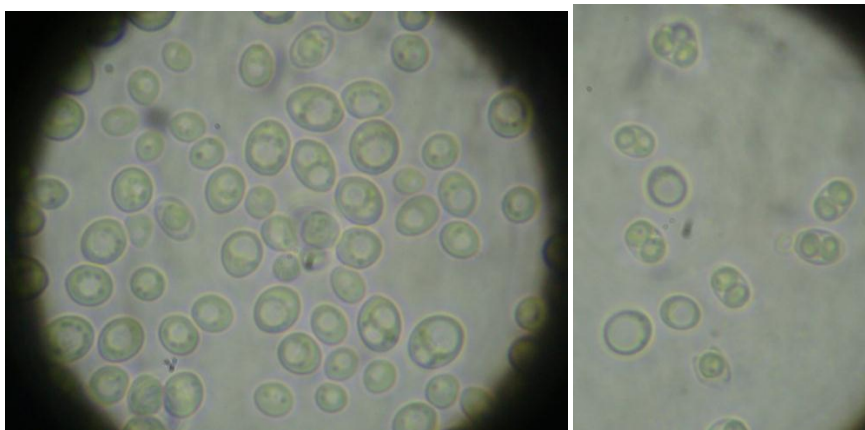
Fuente: O.I.V., 2012.

Anexo 25. Fotografía de la prueba de fermentación de glúcidos.



Fuente: Elaboración propia.

Anexo 26. Fotografía de la prueba de esporulación.



Fuente: Elaboración propia.

Anexo 27. Proceso de encorchado y encapsulado de los vinos obtenidos.



Anexo 28. Fotos del análisis sensorial realizada a los vinos obtenidos.







Mirella Verónica Yllanes Huanacuni
TESISTA



Mgr. Daladier Miguel Castillo Cotrina
ASESOR