

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

**Caracterización Fenotípica de Levaduras Nativas de 11
Variedades de Uva Procedentes de Cananea, Sonora**

TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Que para obtener el Título de

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Briana Lizeth López Ponce

Hermosillo, Sonora

Marzo de 2016

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

APROBACIÓN

Los miembros del jurado designado para revisar la Tesis Profesional de Briana Lizeth López Ponce la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de Químico Biólogo Clínico.

Dra. Maritza Lizeth Álvarez Ainza
Presidente

M. en C. Lucia Guadalupe Castellón Campaña
Secretario

Dr. Alfonso García Galaz
Vocal

M. en C. Griselda Macrina Moreno Ibarra
Suplente

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

En lo personal, los agradecimientos son una parte importante de la tesis, porque la realidad es que este trabajo no fue hecho solamente por mí, sino por muchas personas que estuvieron apoyándome académicamente y personalmente.

Primeramente quiero agradecer a **DIOS** por su inmensa bendición, por siempre cuidarme y darme fuerzas para levantarme y superar todos los obstáculos que enfrente estos últimos años.

A mis padres. Todas las palabras de afecto y cariño que existen no alcanzan para expresar mi gratitud. Muchas gracias por su amor incondicional, sus cuidados, su tolerancia, regaños, experiencias y sobre todo por siempre creer en mí. Papi y mami son mis Héroes. Le pido a diosito que me los siga llenando de buena salud y me permita tener la dicha de disfrutarlos por muchos más años. Los amo con todo mi corazón. **Este logro es también de ustedes.**

A mi baby hermosa. Aucenita desde la primera vez que te vi, jure cuidarte, amarte y protegerte siempre como hermana mayor que soy, pero es que en realidad, después de diosito, TU eres la persona que me ha dado fuerzas, mi motivo para salir adelante, en dos palabras: **mi todo.** Eres una niña llena de talentos, tienes un gran amor al arte y tienes un gran don preciosa, síguelo moldeando y veras que en un futuro dará mucho más frutos. Espero que algún día leas esta tesis que te **dedico** (aunque me digas veinte mil veces que no te gusta la ciencia) de perdida lee este apartado. Muchas gracias preciosa por ser mi razón de seguir adelante. Recuerda que siempre estaré para ti, en las buenas y en las malas. **Eres mi baby y por más grande que estés siempre serás mi baby. Te amo!!**

A mi grandma y mi grandpa. Muchas gracias por su apoyo tanto moral como económico, por estar pendiente de mi persona y de mis estudios académicos y por ayudarme en cualquier cosa que necesitaba sin pensarlo dos veces. Los amo.

A toda mi familia de Puerto. Vallarta, los amo a montones y los extraño mucho! Espero verlos pronto!!

A la Dra. Maritza Álvarez. Sinceramente no encuentro las palabras correctas, más bien no existen las palabras para **agradecerle** su inmenso apoyo durante lo que duro mi experimento y

sobre todo los últimos días del escrito. Es un ser humano intachable la cual admiro y respeto.
Muchas gracias este logro también es suyo!!!

Al Dr. Alfonso García. Que me apoyo durante mi proyecto y también económicamente para poder asistir a un congreso donde compartí mis resultados. Gracias también por haber aceptado ser mi Director de tesis de Maestría. Muchas gracias Dr. por haberme aceptado en el laboratorio y estar al pendiente de mi tesis y sobre todo muchas gracias por el conocimiento que ha dejado en mi durante mi primer semestre de maestría.

A las maestras Griselda Macrina y Lucia Castellón. Muchas gracias por llenarme de conocimientos durante mi licenciatura y por formar parte de mi comité.

Alejandra Zamora. Muchas gracias ale, tu tesis me sirvió de mucho apoyo para poder finalizar la mía. **Mil gracias!!!**

Fer y Dey González. Muchas gracias chicas. Fernanda muchas gracias por haber compartido conmigo la mitad de tu tesis, fuiste una excelente compañera. Dey muchas gracias por tu compañía y tus consejos.

A todo el personal del laboratorio de microbiología del centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo S. A. y me refiero a **Germancito, Arleth, Claudia, Isabel, Rosalba y Doña Isaura.** Muchas gracias por aceptarme en el laboratorio (después de dejarme de ver como bicho raro), los quiero chicos, gracias por formar parte de esta etapa, gracias por los convivios que pasamos juntos, por las risas, por las pláticas, por las bromas, los sustos y sobre todo por darme de comer cuando no llevaba lonche. La pase increíble con ustedes y la sigo pasando porque seguirán soportándome durante mi maestría. En verdad los considero como mi **segunda familia** a cada uno de ustedes incluyendo a Ale, las gemelas y los Dres. **Muchas gracias. No hay mejor ambiente de trabajo que el que se vive en el laboratorio.**

A la Universidad de Sonora y todos los profesores que formaron parte de mi formación académica. **Muchas gracias.**

A todo el personal de **Castaway Kids México** por haberme permitido formar parte de esta hermosa organización y así desarrollar mi espíritu altruista. En especial gracias a **Carole, Eva Recentio y Frank Cintas. Son un amor de personas. Los quiero mucho.**

A mis queridos **amigos** y en especial a Cesar Rosales, Sue Durán, Jesús Carpio, Daniel Winkler, Nick Recentio y Klarissa Stovall. Muchas gracias por formar parte de mi vida, cada uno de ustedes ocupa un espacio en mi corazón. Gracias por su amistad.

A mis queridas químicas del IMSS # 54 de Empalme, Sonora por sus conocimientos otorgados durante mis prácticas profesionales. **Mil gracias.**

Gracias por formar parte de mi vida...

CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLA.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
RESUMEN.....	10
INTRODUCCIÓN.....	11
OBJETIVOS.....	14
General.....	14
Particulares.....	14
ANTECEDENTES.....	15
Historia de la Vinificación en México.....	15
Importancia de la Industria Vinícola en México.....	16
Producción de Vinos, Consumo e Ingresos al País.....	16
Variedad de Uvas Utilizadas en México.....	17
Principales Estados Productores de Vino en México	17
Características Agronómicas y Climáticas para la vinificación en Cananea.....	18
Levaduras.....	23
Características Generales.....	23
Clasificación de las Levaduras.....	25
Identificación Fenotípica de Levaduras.....	26
Cultivos Iniciadores.....	28
Levaduras en el Mundo del Vino.....	28
Vinificación de Vino Tinto y Vino Blanco.....	27
Selección de Levaduras.....	31
<i>Saccharomyces</i> y No- <i>Saccharomyces</i> en el Proceso de Fermentación del Vino	31
Fermentación Alcohólica.....	33
Evolución Poblacional Durante la Fermentación Alcohólica.....	34
MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
Cepas de Estudio	36
Identificación Fenotípica.....	36
Morfología Colonial.....	36
Morfología Microscópica.....	36

Crecimiento en Agar Lisina.....	37
Identificación de la Producción de H ₂ S.....	37
Fermentación de Carbohidratos.....	37
Análisis de Similitud entre Cepas.....	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
Aislamiento de Levaduras.....	40
Morfología Colonial.....	40
Morfología Microscópica.....	42
Crecimiento en Agar Lisina.....	43
Identificación de Producción de H ₂ S.....	45
Fermentación de Carbohidratos.....	47
Análisis de Similitud Entre Cepas.....	48
CONCLUSIONES.....	61
RECOMENDACIONES.....	62
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Clasificación de los géneros de levaduras más frecuentes en mostos y vinos.....	25
2	Cepas control utilizadas en este estudio.....	39
3	Morfologías coloniales observadas en la fase inicial.....	41
4	Morfologías coloniales observadas en la fase logarítmica.....	41
5	Morfologías coloniales observadas en la fase estacionaria.....	56
6	Perfiles fenotípicos de cepas descritas en otros trabajos.....	57

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Amplitud térmica por mes de regiones vinícolas en el mundo.....	21
2	Precipitaciones por mes de regiones vinícolas en el mundo.....	22
3	Diferentes géneros y morfologías de levaduras.....	24
4	Fases de esporulación.....	27
5	Evolución poblacional durante la fermentación alcohólica.....	35
6	Morfologías coloniales observadas en medio PDA.....	42
7	Morfología microscópica observada durante la fermentación alcohólica.....	43
8	Ausencia y presencia de crecimiento en agar Lisina por diferentes cepas de levaduras aisladas de uva.	44
9	Cepas de <i>Saccharomyces</i> y no- <i>Saccharomyces</i> encontradas en las diferentes fases de fermentación.....	45
10	Ausencia y presencia (color marrón) de H ₂ S en medio BiGGY.	46
11	Cepas positivas y negativas a producción de H ₂ S encontradas en las diferentes fases de fermentación.....	46
12	Dendrograma del perfil de carbohidratos de la fase inicial.....	49
13	Dendrograma del perfil de carbohidratos de la fase logarítmica.....	52
14	Dendrograma del perfil de carbohidratos de la fase inicial y logarítmica.....	55
15	Dendrograma de cepas aisladas de tiempo 0 y 1 con cepas encontradas en la bibliografía.....	61

RESUMEN

El vino es un producto complejo resultado de una interacción biológica y bioquímica entre el jugo de uva y diferentes microorganismos como levaduras y bacterias. A lo largo del proceso fermentativo participan diferentes especies de levaduras, en las fases iniciales predominan las cepas no-*Saccharomyces*, mientras que en otras fases fermentativas predominan las cepas *Saccharomyces* debido a la producción de etanol y una disminución de pH que restringen a las especies no-*Saccharomyces*, sin embargo se ha observado que muchos géneros de no-*Saccharomyces* están involucrados hasta el final de la fermentación. La identificación de las cepas nativas fermentativas es muy importante para los productores ya que les permite seleccionar aquellas con las mejores características fenotípicas para obtener vinos con cualidades sensoriales asociadas a una región geográfica además de que las cepas nativas seleccionadas minimizan fluctuaciones en la calidad del vino. En este trabajo se planteó como objetivo general caracterizar fenotípicamente cepas de levaduras obtenidas en el proceso de fermentación de 11 variedades de uva cultivadas en Cananea, Sonora. Se realizó la observación de la morfología colonial y microscópica, la producción de H₂S, el crecimiento en medio lisina, así como la determinación de su perfil de carbohidratos con las cuales se llevó a cabo un análisis de similitud entre cepas. Se aislaron 660 cepas de las cuales 645 correspondían a levaduras y 15 a bacterias, según la morfología colonial y microscópica. 117 cepas no crecieron en agar lisina y 528 si crecieron, por lo que se sospecha de 117 cepas de *Saccharomyces*. 215 cepas dieron negativo a la de producción de H₂S mientras que 430 fueron positivas. Los carbohidratos más utilizados por las levaduras al inicio y durante el curso de la fermentación fueron glucosa, sacarosa y fructosa. Con los análisis de similitud se observaron 112 perfiles de cepas, donde también se pudo observar que hay grupos de cepas con perfiles idénticos que agrupan cepas que provienen de la misma variedad o no, o de cepas encontradas en los diferentes tiempos de fermentación aislados. Sin embargo, no se encontraron similitudes con las cepas control de la Colección Española de Cepas Tipo en el análisis de similitud con las cepas aisladas en este estudio. Se realizó un segundo análisis de las cepas aisladas entre las cepas aisladas y las encontradas en la bibliografía el cual muestra altos porcentajes de similitud entre *Hansenula polymorpha* (100 %), *Kluyveromyces marxianus* (90 %) y *Pichia guillermondii* y *Saccharomyces cerevisiae* (80 %).

INTRODUCCIÓN

El vino ha sido acompañante del ser humano desde las antiguas civilizaciones. Los primeros cultivos de la vid de los que se tienen conocimiento datan desde 12,000 a. C. en Asia menor y 3000 a. C en Egipto donde las uvas pasas encontradas en el yacimiento de El Omari, situado al sudoeste de la actual ciudad de El Cairo, dan fe de que la *Vid* fue una de las primeras plantas cultivada en Egipto; y los hallazgos en las tumbas de los primeros faraones de figuras de cerámica, destinadas a contener vino para su utilización en la otra vida, manifiestan su consumo. (Ortiz, 2013; Terruños, 2006).

Hoy en día, la industria vinícola de México se integra por los productores de uva de mesa, uva pasa, jugo de uva concentrado, de vino y de los licores de uva (brandy) (Font y cols., 2009). De acuerdo con los datos de SAGARPA, se tiene un registro de catorce estados que se dedican a la producción de uva para vino en la República Mexicana, entre ellos destaca Baja California como la principal región vinícola de México, Coahuila, Querétaro, Zacatecas y Aguascalientes (SAGARPA, 2005).

La viticultura es una de las actividades más rentables en México, la cual se encuentra concentrada en el Noroeste de México principalmente en Sonora. En este estado se tiene la mayor producción de vid, aunque la mayoría de la uva producida es uva de mesa. La actividad vinícola en México genera 2.5 millones de jornales y 200 millones de dólares en divisas (INIFAP, 2010).

En Sonora, hace algunos años, hubo intentos fallidos para la producción de uva destinada a la producción de vinos de mesa. Los resultados indicaron que la calidad de las uvas producidas en el desierto fueron bajas para los estándares necesarios para la producción de vino principalmente por la inadecuada selección del sitio, en zonas de elevadas temperaturas y el control de esta en la fermentación, motivos que derivaron en un producto de baja calidad que no fue aceptado en el mercado (IICA-COFUPRO, 2010).

Sin embargo, durante la década de 1980, se volvió a explorar la posibilidad de producir vinos en el Estado. Se observó que en la localidad de Elgin, Arizona, en los Estados Unidos de América, ubicado aproximadamente a 100 Km al norte de Cananea, se encuentran cultivos de uva para vino de los cultivares de Cabernet Sauvignon así como otras variedades. Por lo anterior, se propuso que en el municipio de Cananea sería un lugar apropiado para el establecimiento de plantaciones de uva para vino. Se analizaron y compararon datos climáticos con respecto a esta localidad de Arizona y Cananea y se encontraron características muy

similares entre las localidades y se llegó a la conclusión que la vid puede ser cultivada en la zona (INIFAP, 2010).

De acuerdo con estudios realizados en el proyecto de la Fundación Sonora para vinicultura en Cananea, desde el año 2008 con ayuda de técnicos chilenos y franceses se busca la creación de un nuevo polo vitivinícola en el estado de Sonora, donde actualmente se encuentran cultivos de prueba de diferentes tipos de vid como Malbec, Toriga y Roussane por mencionar algunos. Además se lograra en mediano plazo el desarrollo de un cluster dedicado a la producción de vinos de diferentes grados de calidad. Además esto se ligara con un empaquetamiento turístico y económico que complemente la actividad y genere un derrame en la región.

El vino es un producto complejo resultado de una interacción biológica y bioquímica entre el jugo de uva y diferentes microorganismos como levaduras, bacterias ácido lácticas y bacterias ácido acéticas. El proceso de vinificación comienza en los viñedos, continua hacia la fermentación posteriormente a la maduración y concluye en el empaquetamiento de botellas. De todos los microorganismos involucrados, las levaduras juegan el papel más importante, ya que conducen la fermentación alcohólica, la cual consiste en la conversión de los azúcares presentes en la uva a etanol y CO₂ (Jolly y col., 2006).

Durante las primeras fases de las fermentaciones espontáneas pueden desarrollar diferentes géneros de levaduras como las especies conocidas como no-*Saccharomyces*: *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Candida* y *Pichia*, procedentes de la uva o de los tanques de fermentación. En estos procesos naturales las especies de *Saccharomyces* acaban sustituyendo al resto de los microorganismos en el caldo de cultivo y son las que completan la fermentación (Zuzuarregui, 2006).

La identificación de las levaduras presentes en los cultivos de prueba tiene mucha importancia. De acuerdo a diferentes reportes, es conocido que durante el proceso de fermentación de tequila, aguardiente y vino, se produce una sucesión de especies de levaduras, donde *S. cerevisiae* predomina al final. Esta sucesión natural es posiblemente debido y afectada por la producción de etanol por las cepas de *S. cerevisiae* y una disminución de pH de los mostos de fermentación, lo que restringe a las especies no-*Saccharomyces* que son más sensibles a etanol y pH ácido. Este conocimiento es muy importante para los productores para seleccionar la levadura con las mejores características para el proceso de fermentación en este producto (Álvarez-Ainza, y col., (2009), Lachance (1995), Morais y col, (1997), y Querol y col, (2003).

El uso de levaduras comerciales en la fermentación se ha ido convirtiendo en una práctica común, sin embargo existe la controversia sobre su uso ya que pueden reducir la producción de algunos componentes de utilidad enológica tales como alcoholes superiores y otros subproductos metabólicos de las levaduras silvestres que originan la fermentación espontánea. Además, se le ha atribuido un efecto negativo sobre la biodiversidad de las levaduras naturales presentes en las bodegas, dado que utilizadas en gran cantidad, las levaduras comerciales podrían competir y eliminar las cepas autóctonas existentes en las bodegas (Santamaría y col., 2007; Combina y col., 2005).

Es por eso que hoy en día existe la tendencia de utilizar levaduras nativas ya que asegura el mantenimiento de las propiedades sensoriales típicas de los vinos producidos en una región dada como la adaptación a la materia prima (Zamora, 2006), como la humedad, la temperatura y las características del mosto a fermentar así como el contenido en azúcares reductores, acidez y pH. Por estas razones, podrían dominar mejor la fermentación y se convertirían en el agente biológico más importante responsable de la vinificación (Mas y col., 2002).

Para obtener vinos con determinadas cualidades, se requiere la selección de cepas adecuadas, de modo que la calidad de los vinos es influenciada directamente por la evolución de la flora microbiana durante la fermentación (Barrajón y col., 2007) y en particular sobre sus características aromáticas (Ribéreau-Gayon y col., 2000). Es por eso que las levaduras nativas seleccionadas deben tener ciertas características para que sean las convenientes para la elaboración de vino otorgando tipicidad (Abad, 2006; Mas y col., 2002) permitiendo lograr un producto de calidad homogénea y predecible (Barrajón y col., 2007).

Para llevar a cabo el proceso de selección es esencial establecer cuáles son sus propiedades enológicas así como identificar los microorganismos presentes por género y especie mediante caracterización microscópica y macroscópica, diferenciar cepas *Saccharomyces spp.* y no-*Saccharomyces spp.*, evaluar criterios favorables como tolerancia al etanol y desfavorables como producción de H₂S y producción de ácidos volátiles (Degré, 1993), determinar la variabilidad de las cepas de mayor predominancia y realizar pruebas de fermentación de las cepas enológicamente adecuadas (Mas y col., 2002).

Por lo tanto, la identificación y selección de la cepa adecuada para cada tipo de fermentación es una estrategia importante para garantizar una mejora de las características del producto final (Mas y col., 2002). Por lo que el objetivo de este trabajo fue realizar la caracterización fenotípica de cepas de levaduras nativas, obtenidas en el proceso de fermentación de 11 variedades de uva en Cananea, Sonora.

OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar fenotípicamente cepas de levaduras obtenidas en el proceso de fermentación de 11 variedades de uva cultivadas de Cananea, Sonora.

Objetivos Particulares

- 1) Caracterizar la morfología macro y microscópica de levaduras obtenidas en el proceso de fermentación de 11 variedades de uva cultivadas en Cananea, Sonora.
- 2) Diferenciar las levaduras obtenidas en grupos *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*.
- 3) Evaluar la producción de H₂S de las levaduras aisladas.
- 4) Determinar el perfil de fermentación de carbohidratos de las levaduras de la fase Inicial y fase logarítmica de las cepas que no producen H₂S.

ANTECEDENTES

Historia de la Vinificación en México

México es considerado el productor más antiguo de vino de América. En la época precolombina los indígenas utilizaban las vides silvestres para hacer una bebida parecida al vino con frutas y miel conocida como vino de Acahul, ya que las vides de la región eran muy ácidas y no se podía producir vino con ellas (Ortiz, 2013).

Los primeros indicios de la viticultura mexicana se originaron como tal en el siglo XVI con la llegada de los españoles al nuevo mundo. Después de la conquista de México, Hernán Cortés mandó traer de España vides europeas, de las cuales se plantaron mil pies de vid por cada 100 indígenas. Iniciaron cosechando alrededor de la ciudad de México, capital del virreinato, en Querétaro, Guanajuato y San Luis Potosí. Posteriormente, se utilizaron las tierras fértiles del Valle de Parras en Coahuila, Baja California y Sonora para su cultivo. En 1593 la Hacienda Santa María de las parras fue la primera bodega comercial en México (Van de Vyver, 2007).

Con la adaptación de las vides, se derivó en el desarrollo de la vitivinicultura en la nueva colonia y como consecuencia se dejaron de traer vinos de España, lo cual provocó que los productores españoles tuvieran menos ingresos y un descontento por sus escasas ventas, esto hizo que el Rey Felipe II prohibiera plantar más vides y la destrucción de las mismas, aunque la iglesia católica logró mantener la vid dentro de sus misiones ya que era utilizada para las ofrendas religiosas. Con la creación de nuevos conventos y misiones se aumentaban más viñedos, y con ello, el vino iba de la mano con el crecimiento de la religión (Van de Vyver, 2007).

A partir de este hecho, la producción del vino en el país se volvió más difícil, posteriormente la industria vitivinícola se detuvo por la época del Porfiriato, la guerra de la independencia y la revolución siendo estas épocas negras en la vitivinicultura nacional. En el año de 1920 los vinos mexicanos se comenzaron a producir seriamente, aunque debido a la falta de infraestructura, la nula selección de variedades y desconocimiento de la viticultura, los productos no eran de buena calidad (Font y col, 2009).

En 1948 se formó la asociación Nacional de vitivinicultores por las empresas productoras de vino más importantes (Contreras y Ortega, 2005) cuya finalidad es la de fomentar el desarrollo del cultivo de la vid, la industrialización de la uva y comercializar los productos

obtenidos; así como proteger y mejorar la calidad de los productos vitivinícolas, es a partir de esa década que la producción de vino mexicano comienza a crecer. Entre 1970 y 1980, la producción de vinos se triplicó y la calidad de los mismos mejoró, además se crearon casas productoras de vino como la Fundación de la Casa de Piedra de Hugo D'Acosta en 1977, Francisco Javier González inicia las Bodegas del Altiplano en Zacatecas en el año de 1981 y una de las más importantes la Fundación de Monte Xanic por Ricardo Hojel y Hans Backhoff y Jaime Navarro en Ensenada, Baja California entre otras (Van de Vyver, 2007).

De esta manera en los años noventa, las bodegas con verdadera vocación vinícola iniciaron la producción de vinos de la más alta calidad, invirtiendo en equipo y aplicando tecnologías europeas de punta, para competir con los buenos vinos importados de todas las regiones vinícolas del mundo. Hoy en día el vino mexicano se exporta a 21 países, entre los cuales destacan Estados Unidos, Alemania, Inglaterra, Japón, Francia y España. (Font y col., 2009).

Importancia de la Industria Vinícola de México

Producción de Vinos, Consumo e Ingresos al País

La industria vinícola de México se integra por los productores de uva de mesa, uva pasa, jugo de uva concentrado, de vino y de los licores de uva (brandy). En el país existen cerca de 3,350 hectáreas destinadas al cultivo de uva para la producción de vino Según la Asociación Nacional de Vitivinicultores (2008) destaca Baja California con 2,500 hectáreas, Zacatecas con 150, Coahuila con 200, Querétaro 400 y Aguascalientes con 100. (Font y col, 2009).

El mercado de vino mexicano creció un 10.2 % en 2011 para alcanzar un valor de \$723.4 millones de pesos, obteniendo una tasa de crecimiento anual de 10.8% en el periodo 2007-2011. Por otro lado el volumen de litros creció un 9.1 % en 2011 para llegar a 57.7 millones de litros, obteniendo una tasa de crecimiento anual de 9.7 % en el periodo 2007-2011. Hablando sobre la categoría de segmentación, el vino es el mayor segmento del mercado representando el 89.6% (2011) del valor total del mercado siguiéndole el champagne con el 5.7 %, vino fortificado con el 2.5 % y el vino espumoso con el 2.2 % (E. Internacional, 2013).

El consumo per cápita de vino en México también se ha incrementado, ya que en el 2003 se consumían aproximadamente 200 mL/persona/año, cifra que aumentó a 340 y para 2007 alcanzó los 500. Con el tiempo, el bajo consumo inicial de vino en el país ha cambiado, ya que el vino mexicano empieza a ser considerado importante internacionalmente, gracias al

sector restaurantero, en busca de romper las fronteras nacionales e incrementar la demanda, lo cual ayudaría a lograr mejores condiciones laborales y por ende aumentar el empleo en el sector.

Variedad de Uvas Utilizadas en México

Actualmente, en el territorio mexicano, la plantación de viñedo cubre alrededor de 70 mil hectáreas de cultivo, de las cuales la mayor parte de las variedades son de uvas blancas y tintas. De las variedades tintas para vino tinto se encuentran: Barbera, Cabernet sauvignon, Merlot, Pinot Noir, Zinfandel, Carignane, Ruby cabernet, Garnacha, Misión, Nebbiolo, Cabernet franc, Petit syrah, Ruby red, Malbec, Tempranillo, uva Lenoir, rosa del Perú, Gamay y Pinot gris. Entre las variedades blancas para vino blanco se encuentran: Chardonnay, Sauvignon blanc, French colombard, Chenin blanc, semillón, Ugni blanc, Traminer y Málaga (Cata del Vino, 2014).

Principales Estados Productores de Vino en México

De acuerdo con datos de la SAGARPA (2005), se tiene un registro de catorce estados que se dedican a la producción de uva en la República Mexicana, sin embargo, los principales estados productores de vino se encuentran en el centro. Comenzando con Aguascalientes con sus regiones de Calvillo, Paredón y Los Romo, donde la tradición vitícola se inició a finales del siglo XVI, siendo tan antigua como la misma ciudad. Querétaro cuenta con un clima templado sub húmedo y de lluvias abundantes, en esta región, en la que se ubica la empresa Freixenet, a la altura de 1,900 m del suelo, la drenación es un factor importante para el desarrollo de uvas blancas como Chenin, Sauvignon blanc y Macabeu y tintos como Pinot noir, Gamay, Malbec y Cabernet sauvignon. También cuenta con las zonas de San Juan del Río, Ezequiel Montes y Tequisquiapan, caracterizada por un excelente clima óptimo para la producción de la vid. Zacatecas posee zonas de Ojo Caliente y Valle de la Macarena, destacada por estar situada en la parte más alta y fresca de México, y su bodega de mayor renombre es Casa Cachola, la cual produce vinos de excelente calidad, las cuales las principales uvas para vino blanco son Chenin blanc y Colombard, mientras que para los tintos son Ruby cabernet y Petit syrah. Un elemento muy importante en la maduración del vino de esta región es la acumulación de grava, arcilla y arena en el terreno (Cata del vino, 2014).

Hacia el norte, se encuentra el estado de Coahuila, nombrada la cuna del vino americano, con un clima muy caluroso y una precipitación media, más abundante en los meses de abril a octubre. Los valles de Parras, Arteaga y Saltillo son las principales zonas de cultivo, sus empresas productoras de vino más importantes son Casa Madero y Bodega Ferriño. La Casa Madero es uno de los productores más importantes de la zona, siendo el Merlot, Sauvignon, y Syrah las cepas tintas más utilizadas, gracias a que el clima propicia una maduración lenta. También, con la superficie más grande de viñedos en el país, principalmente para la producción de aguardientes y principal productor de uva de mesa (alrededor del 95 %), se encuentra el estado de Sonora, en regiones de la costa de Hermosillo, Pesqueira y Caborca (IICA-COFUFRO, 2010).

El estado de Baja California, considerado la principal región vinícola de México situada en una estrecha península entre el Mar de Cortés y el Océano Pacífico a 100 kilómetros hacia el sur y al lado occidental de Estados Unidos. Esta región acumula el 90 % de la producción nacional de vino, cuenta con 10 mil hectáreas de cultivo, de las cuales 60 % se encuentran en tierras del Valle de Santo Tomás y San Vicente, el otro 35 % en el Valle de Guadalupe y San Antonio de las Minas, y el resto en las zona del Valle de Ojos Negros y Tecate. En este estado encontramos uvas para vino blanco Chenin Blanc, Sauvignon Blanc y Chardonnay y para los tintos Nebbiolo, Zinfandel, Merlot, Cabernet Franc y Cabernet Sauvignon.

En la zona de Ensenada y Tecate, al norte de Baja California, podrás disfrutar de La Ruta del Vino, un viaje por el Valle de cultivo Guadalupe, en donde es posible visitar las casas vinícolas de mayor antigüedad o renombre, como L.A. Cetto, Casa Pedro Domeq, Monte Xanic y Casa de Pierda, así como otras empresas reconocidas como Allied Domecq México, Cavas Valmar, Chateau Camou, Mogor Badán, Viña Adobe Guadalupe, Vinisterra, Bodega San Rafael y Bodegas Barón Balché, entre otras (Cata del vino, 2014).

Características Agronómicas y Climáticas para la Vinificación en Cananea, Sonora

La viticultura es una de las actividades más rentables en México, donde esta actividad se encuentra concentrada en el noroeste de México especialmente en el estado de Sonora. En este estado se tiene la mayor producción de vid, especialmente de uva de mesa. Esta actividad genera 2.5 millones de jornales y 200 millones de dólares en divisas (Martínez y col., 2010).

El estado de Sonora ha tenido intentos fallidos para la producción de uva para elaborar vinos de mesa. Los intentos se dieron pero la calidad de los vinos obtenidos se catalogó como baja, lo que redundó en la desaparición de esta industria en el estado. Los resultados indicaron

que la calidad de las uvas producidas en el desierto fueron bajas para los estándares necesarios para la producción de vino, así mismo, los procesos enológicos no ocurrieron de acuerdo a las expectativas. En los años 80 se exploró la posibilidad de producir vinos en el desierto de Arizona y actualmente es una industria que se basa en la superficie de alrededor de 3,500 has (Martínez y col., 2010).

Los viñedos de Arizona no están localizados en pleno desierto pero si en la regiones más altas, en los valles de la sierra, vista en el suroeste y Este del estado, así como al norte de Phoenix. Lo que indica que si en el desierto aparentemente las variedades actuales no producen uvas de calidad para hacer vinos de mesa, es posible utilizar otras adaptadas a estas condiciones, o bien explorar a las actuales en las regiones altas donde el clima es más benigno (Martínez y col., 2010).

El consumo de vino de mesa en México ha tenido un crecimiento y se sabe que el consumo de vino importado es mayor que el que se produce en el país, por lo que, sería un mercado potencial interno pero también externo, como el vino de Arizona que actualmente ya se consume en otros estados e incluso en otros países (Martínez y col., 2010).

El clima es de los principales factores ambientales que afectan el desarrollo de los cultivos, se considera como el principal factor abiótico que puede causar daños irreversibles en las plantas cultivadas de una manera indirecta (falta de frío, heladas, golpes de aire y sol, granizo, sequía, etc.), así también puede influir en el desarrollo de plagas y enfermedades. Ante estas situaciones los productores demandan información meteorológica actualizada y confiable. En el área de Hermosillo, Sonora, la actividad agrícola principal es la viticultura, especie de alta inversión en su proceso de producción y la cual es frecuentemente afectada por la presencia de fenómenos climáticos adversos, que afectan cualquier etapa fenológica de la planta, desde la errática acumulación de frío necesario para la adecuada brotación, hasta excesos de temperatura y humedad relativa que inciden en los problemas de rompimiento de bayas y falta coloración (Susarrey y Moreno, 2010).

La escala de Winkler clasificó las regiones vitícolas de California, en Estados Unidos con base en unidades de calor, su modelo ha sido utilizado en diferentes regiones del mundo con el fin de determinar el potencial para establecer los cultivos de vid. En base a este análisis a Sonora se le ha clasificado dentro de la región V, la cual es la que posee mayor número de unidades de calor donde la producción de uvas para vino aparentemente es crítica. En las zonas V de acuerdo a Winkler las uvas aportan una alta acidez y el color es más bajo de su escala que fluctúa de I a V, de acuerdo con este criterio las dificultades que se han encontrado para producir vinos de mesa en los valles de desierto de Sonora debido al clima, se podrían

reproducir en todas las áreas de sonora. Sin embargo las experiencias de Arizona demuestran que la zona V podría subdividirse de acuerdo a otros criterios, como altura, precipitación y tipo de suelo entre otros (Susarrey y Moreno, 2010).

La ciudad de Cananea, Sonora se encuentra al norte del estado, el área de Sonora donde se localiza la parte montañosa del estado y el clima dominante es de tipo semiárido subhúmedo, con una temperatura máxima mensual de 23.5°C y una mínima promedio de 15.3 °C. Así mismo, presenta 545 mm de precipitación promedio al año, siendo el periodo de lluvias más importante, durante los meses de junio a septiembre (Susarrey y Moreno, 2010).

En Cananea no existían cultivos de uva ni se habían evaluado anteriormente, sin embargo en la localidad de Elgin, Az, en Estados Unidos de América, ubicado aproximadamente a 100 km al norte de Cananea, se encuentran cultivares de uva para vino, se produce Cabernet Sauvignon, entre otros, lo que hace pensar que en el municipio de Cananea es posible el establecimiento de plantaciones de uva para vino. Las temperaturas ambientales durante el año son muy similares. Incluso Elgin llega a ser más frío que Cananea por lo es más factible que en Cananea se desarrolle mejor la vid (Susarrey y Moreno, 2010).

Requerimientos climáticos para cultivos de Vid. *Vitis vinifera* es originaria de Asia Menor según la mayoría de los botánicos, desde el siglo VI a. de C. se cree fue llevado a Europa donde se desarrollaron las mayoría de las variedades que actualmente existen para la elaboración de vinos. Se ha comprobado que la vid puede prosperar desde los 0 hasta los 3000 m de altura, dependiendo de la latitud, ya que a bajas latitudes se puede compensar con gran altitud, mientras que a latitudes medias o altas, se recomiendan menores alturas. Se considera que la vid se adapta bien a climas que acumulan más de 250 horas de frío invernal. El rango térmico para el desarrollo es de 10 a 35 °C, con un óptimo para la fotosíntesis de 25 a 30 °C. Para un periodo de madurez de floración, lo más conveniente son temperaturas de 24 a 26 °C. Dentro de los factores climáticos, quizá el de mayor influencia en las características de los vinos es la temperatura, a altas temperaturas se tiende hacia vinos con alta graduación alcohólica y baja acidez, mientras que en temperaturas bajas se originan vinos con menor grado alcohólico y mayor acidez (Susarrey y Moreno, 2010).

El régimen térmico afecta además otras variables organolépticas como el sabor y el aroma del vino, ambos relacionados con el proceso de maduración. Temperaturas superiores a los 35 °C inhiben la formación de antocianinas, responsables del color. La vid es una especie de clima templado que requiere de variaciones estacionales bien marcadas. Las noches frescas favorecen el desarrollo del color de las bayas y el bouquet, siempre y cuando se acompañe de

días templados que ayuden a la acumulación de unidades de calor. La oscilación térmica óptima parece estar alrededor de los 10 °C (Susarrey y Moreno, 2010).

Según estudios de caracterización climática la Región de Cananea presenta valores de temperaturas máximas y mínimas promedios las regiones tradicionalmente vitivinícolas: Burdeos en Francia, Napa Valley en Estados Unidos y Valle de Maipo en Chile como se puede observar en las Figuras 1 y 2. El régimen térmico de Cananea se comporta muy similar a dichas regiones. La amplitud térmica de Cananea es más estable que las demás regiones comparadas (Susarrey y Moreno, 2010).

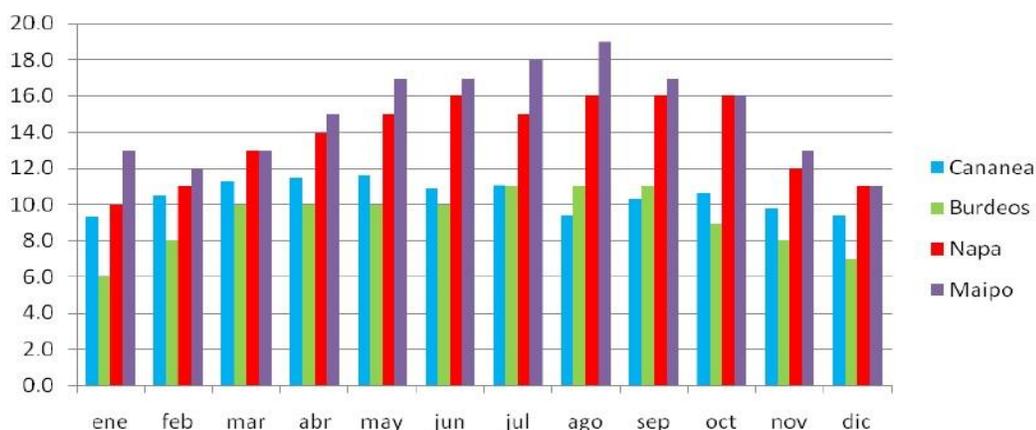


Figura 1. Amplitud térmica por mes de regiones tradicionales vinícolas en el mundo (Susarrey y Moreno, 2010).

El factor de precipitación es que se observa con mayor diferencia en las regiones. De las cuatro regiones Burdeos tiene la mayor estabilidad en cuanto a las precipitaciones, manteniéndose alrededor de los 50 mm en todos los meses, excepto diciembre. Cananea presenta valores similares en los primeros meses del año, aunque con un decremento importante en los meses de abril, mayo y Junio. En julio y agosto se observa un amplio incremento en las precipitaciones, que llegan hasta los 200 mm (Susarrey y Moreno, 2010).

En cananea también se hicieron estudios de suelo y de perfiles edafológicos (análisis de la composición y naturaleza del suelo en su relación con las plantas y el entorno que las rodea) para la plantación experimental de uva para vino. Los aspectos esenciales a tomar en cuenta para la elaboración de vino son el clima, el suelo/roca, la planta y el manejo para tener uvas de calidad (Porta y cols., 2013; Susarrey y Moreno, 2010).

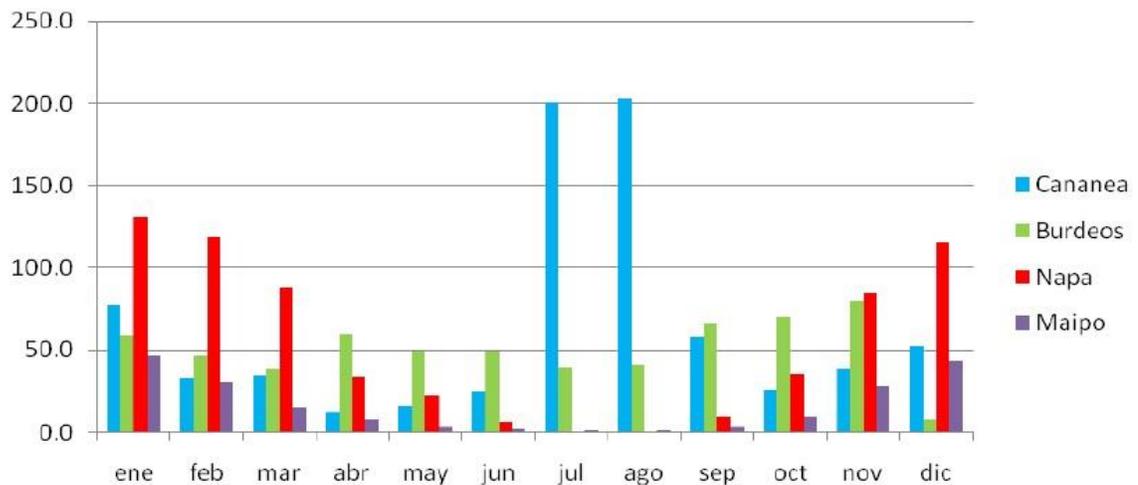


Figura 2. Precipitación por mes de regiones vinícolas en el mundo (Susarrey y Moreno, 2010).

El sitio pertenece a una terraza aluvial con pendientes leves que no representan ningún obstáculo para la vid. Estos depósitos recientes poco consolidados presentan en general una clasificación burda de los clastos y los sitios de muestreo, presentan toda la gama de tamaño de grano desde un tamaño de 30-40 cm hasta el tamaño de arena. Se detectó suelo con alta potencialidad vitivinícola, mediana, susceptible a ser corregida, y con problemas estructurales, excesos o carencias de elementos o características del perfil de suelo que impiden el establecimiento de un viñedo de alta calidad (Moreno y col, 2010).

Además también se hizo un estudio acerca de las plagas que afectan a la vid. Las plagas y enfermedades que se presentaron tanto en especies silvestres como cultivadas son las mismas que ya se conocen en el estado según la bibliografía, y actualmente se conocen medidas para su combate y solo se requiere monitorearlas para tomar las medidas pertinentes y evitar infestaciones que pongan en riesgo las plantaciones (Martínez-Díaz y col., 2010). Así mismo, las plantas como la uva pueden estar colonizadas por microorganismos que no las afectan como otros hongos no patógenos ya sea filamentosos o levaduras, los cuales en dado momento pueden proporcionar protección contra las plagas o servir como inóculos al procesar la uva para vinos.

Levaduras

Las levaduras son los microorganismos más importantes y ampliamente utilizados en la industria. Se cultivan para obtener grandes cantidades de levaduras ya sea para panificación u algún otro proceso industrial como inóculos, por sus componentes celulares, y por los productos finales que se producen en la fermentación alcohólica. Las células de levaduras se utilizan en la fabricación de pan y también como fuente de alimento, de vitaminas y de factores de crecimiento. La fermentación a gran escala por las levaduras es responsable de la producción de alcohol para fines industriales, pero como mejor se conoce a la levadura es por su papel en la fabricación de bebidas alcohólicas: como la cerveza, vinos y licores. Sin embargo, la producción de células de levaduras y de alcohol por las levaduras, son procesos industriales muy diferentes (Madigan y col, 2000).

Características Generales

Las levaduras son hongos unicelulares y la mayoría son Ascomycetos. Normalmente son células ovaladas o cilíndricas de 1-10 μm de ancho por 2-3 μm de longitud y la división es habitualmente por gemación de manera asexual pero puede ser en algunos casos y condiciones de manera sexual. Durante el proceso de gemación, se origina una pequeña yema que aumenta de tamaño gradualmente y se separa de la célula madre. Las levaduras normalmente no desarrollan un micelio, si no que permanecen en estado unicelular durante todo el ciclo del crecimiento. Las células de levaduras son mucho más grandes que las bacterianas y pueden distinguirse no sólo por su tamaño sino por la presencia obvia de elementos intracelulares tales como el núcleo. En cuanto su forma ésta varía dependiendo de la especie puede ser forma elíptica, esférica, alargada o apiculadas (Figura 3). Algunas se reproducen sexualmente mediante apareamiento, originando un cigoto y eventualmente ascosporas (Madigan y col, 2000).

Las levaduras generalmente prosperan en hábitats con abundante azúcar, tales como frutas, flores e incluso la corteza de los árboles. Algunas de ellas viven en simbiosis con animales, especialmente insectos y sólo algunas son patógenas para animales y el hombre (Madigan y col, 2000).

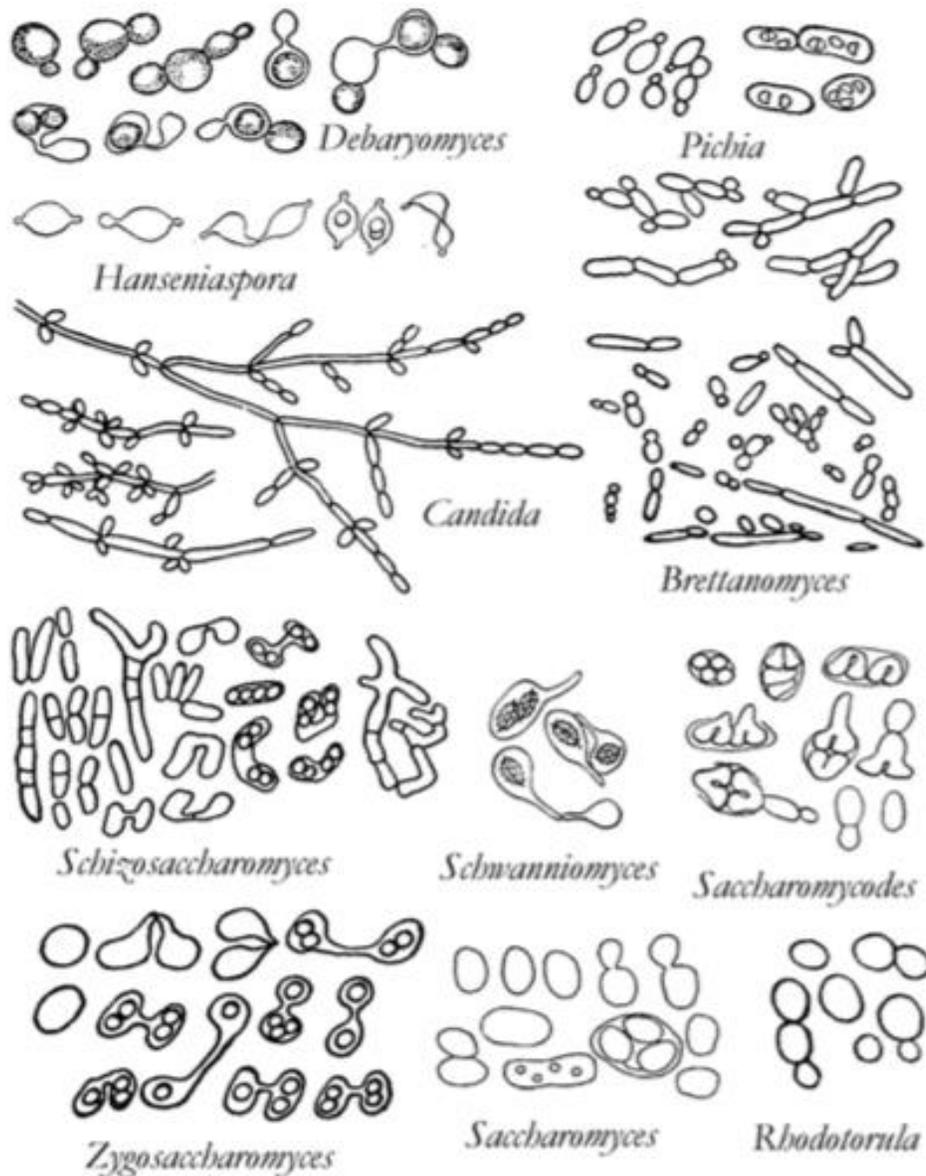


Figura 3. Diferentes géneros y morfologías de levaduras (Salle, 1965).

Las levaduras más importantes desde el punto de vista comercial son las cepas cerveceras y panaderas de la especie de *Saccharomyces cerevisiae*. El hábitat original de estas levaduras son indudablemente las frutas y los zumos de las frutas, pero las levaduras comerciales de hoy en día son probablemente bastante diferentes de las cepas silvestres, debido entre otras cosas, a la manipulación por parte de los microbiólogos industriales a través de los años. *S. cerevisiae* es el hongo mejor conocido por ser fácilmente manipulable y construir

un modelo excelente para el estudio de problemas importantes que conciernen a la biología de eucariotas (Madigan y col, 2000).

Clasificación de Levaduras

Las levaduras pertenecen al dominio *Eukaryota* y dentro de éste, en el reino *Fungi*, que agrupa a los hongos verdaderos. Dentro de ésta, las levaduras se incluyen en 2 de las 5 subdivisiones de los *Eumicetos*, la *Ascomycotina*, representada por aquellas capaces de formar ascosporas, llamadas por ello esporógenas y la *Deuteromycotina* representada por las células incapaces de formar esporas denominadas asporógenas o no esporógenas.

Los géneros de levaduras esporógenas están englobados en la familia *Saccharomycetaceae* y se distribuyen en tres subfamilias. Las levaduras no esporógenas constituyen la familia *Cryptococcaceae*, como se observa en la Tabla 1. Conviene resaltar que por debajo de los taxones de los géneros y especie, las levaduras pueden ser clasificadas en subespecies y variedades, las cuales a menudo adquieren el rango de especies, tras nuevas revisiones taxonómicas, o por el contrario, varias especies son unificadas en una sola como subespecie de las mismas, con lo que la clasificación se complica aún más y se incrementa el número de sinonimias (Mesas y Alegre, 1999).

Tabla 1. Clasificación de los géneros de levaduras más frecuentes en mostos y vinos.

1) Levaduras esporógenas	
Subdivisión	<i>Ascomycotina</i>
Clase	<i>Hemiascomycetes</i>
Orden	<i>Endomycetales</i>
Familia	<i>Saccharomycetaceae</i>
Subfamilia	<i>Shizosaccharomycetoidae</i>
Género	<i>Schizosaccharomyces</i>
Subfamilia	<i>Nadsonioideae</i>
Géneros	<i>Hansanospora</i> <i>Saccharomycodes</i>
Subfamilia	<i>Saccharomycetoideae</i>
Géneros	<i>Dekkera</i> <i>Hansenula</i> <i>Kluyveromyces</i> <i>Pichia</i> <i>Saccharomyces</i> <i>Torulaspota</i> <i>Zygosaccharomyces</i>
2) Levaduras no esporógenas	
Subdivisión	<i>Deuteromycotina</i>
Clase	<i>Blastomycestes</i>
Familia	<i>Cryptococcaceae</i>
Géneros	<i>Brettanomyces</i> <i>Candida</i> <i>kloekera</i>

Tomado de: Mesas y Alegre, 1999.

Identificación Fenotípica de Levaduras

La identificación de una cepa de levadura se lleva a cabo mediante el examen y la determinación de sus características, que son comparadas con descripciones estándar de especies conocidas. Las características examinadas son de tipo morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. Existen muchos sistemas de identificación, aunque no hay ninguno perfecto, los cuales van de una simple observación al microscopio, pruebas bioquímicas a técnicas más sofisticadas basadas en métodos moleculares. También en enología, es decir, en la evaluación de vinos se utilizan otras pruebas denominadas pruebas enológicas, las cuales consisten en pruebas de fermentación, tolerancia a etanol, determinación del factor killer, ya que en vinos es usual utilizar cepas de levaduras seleccionadas y por lo mismo se evalúan para utilizar aquellas que den las mejores características organolépticas a la bebida (Deák, 1992; Frazier y Westhoff, 1998; Orbera, 2004).

El factor killer es un fenómeno importante en fermentaciones. En la elaboración de vino existe una preocupación acerca de las consecuencias que esa toxina tiene en otras levaduras durante la fermentación. Las cepas killer han sido encontradas en vinos de diferentes regiones del mundo. Las levaduras, llamadas asesinas o killer, cuyo genotipo es (K+, R+), secretan al medio toxinas proteicas capaces de matar a otras cepas denominadas sensibles (K-, R-). Por otra parte, las cepas llamadas neutras (K-, R+), que no producen toxinas, pero son resistentes a éstas. Estas proteínas tóxicas son secretadas al medio y posteriormente son adsorbidas por receptores situados en la pared celular de levaduras sensibles, produciendo un cambio en la permeabilidad de la membrana plasmática. El factor killer, fue descubierto en especies de *S. cerevisiae* aunque también existe en otros géneros de levaduras que las producen. Si situamos a la levadura en un entorno competitivo podremos decir que la cepa killer o neutra tendrá mayores posibilidades de sobrevivir que una cepa sensible (Bernardi, 2013).

Pruebas morfológicas. Las pruebas morfológicas macroscópicas se caracterizan por la observación de la morfología colonial, así como el color de éstas, si tienen crecimiento en forma de película en la superficie de medios líquidos o crecimiento de la masa por todo el medio líquido. Las microscópicas se basan en el examen detallado de la forma de reproducción vegetativa, de la morfología celular y de la formación de pseudomicelio (Deák, 1992; Frazier y Westhoff, 1998).

Uno de los criterios utilizados para la identificación de las levaduras es la producción de esporas o ascosporas, si no las producen son levaduras esporógenas, en caso de producirlas,

la forma de producción varía. Otro criterio es el aspecto de las ascosporas, es decir su forma, tamaño y color, así como también el número de esporas que se produzcan dentro del asca (Frazier y Westhoff, 1998).

La forma de reproducción sexual es una prueba importante de diferenciación, la cual puede ser por gemación, fisión, gemación-fisión combinadas y por artrosporas (Frazier y Westhoff, 1998). En la figura 4 podemos observar las fases de la esporulación (Hidalgo, 2011).

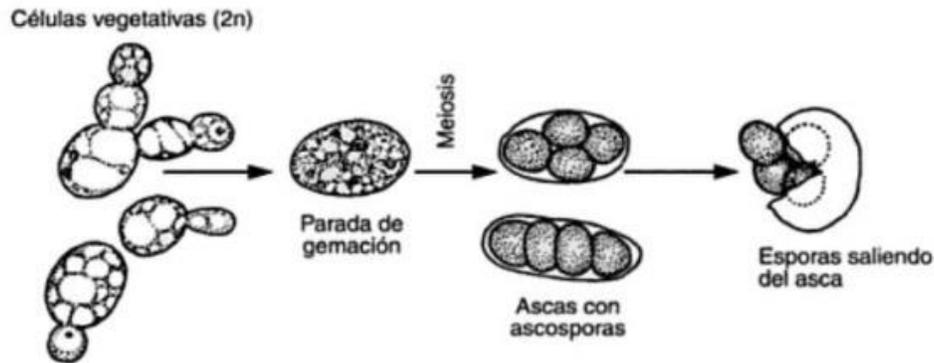


Figura 4. Fases de esporulación (Hidalgo, 2011).

Pruebas bioquímicas. Entre los principales criterios bioquímicos destacan la capacidad para fermentar glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa, lactosa y rafinosa. Así como también el crecimiento en 18 sustratos carbonados como la d-xilosa, L-arabinosa, D-ribosa, L-ramnosa, D-galactosa, sacarosa, maltosa, celobiosa, trehalosa, lactosa, rafinosa, almidón, eritriol, ribitol, D-manitol, inositol, ácido succínico y ácido cítrico.

También se utiliza la asimilación de nitratos, crecimiento a 37° C, crecimiento en medios con vitaminas y la producción de almidón, de lipólisis, actividad ureásica, producción de ácido y producción de compuestos amiláceos. Una de las pruebas importantes a nivel tecnológico e industrial es la que utiliza lisina como única fuente de nitrógeno en un medio de cultivo, porque distingue las levaduras *Saccharomyces* de las no-*Saccharomyces*, ya que para el género *Saccharomyces* es imposible crecer en un medio que sólo tiene lisina y las no-*Saccharomyces* crecen sin problema (Frazier y Westhoff, 1998; Mas y col, 2002). Sin embargo, en el estudio de Álvarez-Ainza, 2006, donde se caracterizaron cepas de *Saccharomyces* a nivel molecular,

previamente identificadas fenotípicamente por Zamora-Quñones, se observó que fenotípicamente hay cepas de no-*Saccharomyces* estrechamente relacionadas a cepas *Saccharomyces* ya que la caracterización molecular no coincidió con lo reportado para cepas *Saccharomyces*.

Cultivos Iniciadores

El uso más importante de las levaduras y además conocido desde hace mucho tiempo atrás, es como cultivos iniciadores para la producción de alcohol etílico a partir de materiales que contengan carbohidratos. Este proceso es utilizado en destiladoras, cervecerías, panaderías, vinaterías, laboratorios químicos, manufacturas domésticas y muchas otras industrias (Pelczar, 1985).

Las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* son las más utilizadas por las diferentes industrias, ésta especie es altamente especializada, ya que poseen un alto potencial en diferentes ambientes o nichos ecológicos, donde los humanos las utilizan para diferentes actividades como producción de alcohol, enzimas, antibióticos, etc. Este proceso de utilización y/o selección de una especie de levadura por sus características puede ser llamado domesticación y puede ser responsable de las características genéticas especiales de las levaduras industriales (Querol y col, 2003).

En industrias para producción de alcohol por ejemplo, es necesario que la levadura desarrolle un cultivo vigoroso, tolere al alcohol y sea capaz de producirlo en grandes cantidades. Por lo que se ha puesto mucha atención en seleccionar levaduras y desarrollar cepas de levaduras que reúnan las características adecuadas según la industria. Entre los géneros seleccionados están *Bretanomyces*, *Bullera*, *Candida*, *Debaromyces*, *Endomyces*, *Endomycopsis*, *Eremascus*, *Hansianospora*, *Kloeckera*, *Lipomyces*, *Metschnikowia*, *Nadsonia*, *Nematospora*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomycoides*, *Saccharomycopsis*, *Sachizosaccharomyces*, *Schwianniomyces*, *Sporobolomyces*, *Torulopsis*, *Trichoposrum* y *Trigonopsis* (Pelczar, 1985).

Levaduras en el Mundo del Vino

Vinificación del Vino Tinto y Vino Blanco

La vinificación es el conjunto de operaciones llevadas a cabo para transformar las uvas en vino. Los diferentes tipos de vino tienen procedimientos diferentes de vinificación e instalaciones, incluso cambia de un lugar a otro según el vino que se quiere obtener y las costumbres y tradiciones del lugar (Peynaud, 1977).

Los vinos se clasifican con base en distintos criterios, entre los más importantes tenemos el color, el contenido de azúcar, alcohol y de gas carbónico. Por lo que respecta al color, los vinos blancos son de color amarillo, con tonos que van de paja al verduzco. Su contenido alcohólico varía entre 8.5 a 11.5 % y el de azúcares residuales es inferior a 2 g/L y se elaboran con uva blancas (Navarre, 1998). Los vinos tintos son aquellos cuyo color es el rojo que puede incluir tonos de rubí a púrpura. Su graduación alcohólica se sitúa entre 8.5 y 12.5 % y su contenido en azúcares residuales menor a 2 g/L. Estos se elaboran con uvas rojas, con un tiempo de maceración adecuado para permitir la extracción suficiente de la materia colorante de los hollejos como Antocianinas.

El proceso de vinificación comienza con la selección de uva la cual es recolectada conociéndose a este proceso como vendimia y es transportada a la bodega en cajas, una vez en la bodega se procede al estrujado que consiste en romper el hollejo de la uva de modo que libere la pulpa y el zumo, sin romperse la semilla.

En la vinificación de tintos esta operación debe de ser eficiente, ya que los componentes del hollejo como son la pectina, proteínas, taninos, Flavonas (precursor de colorante en uvas blancas) y Antocianinas (en uvas tintas), intervienen en la constitución del color y el cuerpo del vino (Peynaud, 1977). Después se añade una dosis de anhídrido sulfuroso que servirá como antioxidante, bactericida y fungicida, además que activa la difusión de color en la maceración, un proceso que mencionaremos más adelante. Al segundo procedimiento se le conoce como Encubación y comprende la introducción de la vendimia estrujada en la cuba de fermentación, hasta el Descube (Gil y col, 2009) una vez introducida, es bombeada a depósitos cerrados de acero inoxidable donde se va fermentando debido a las levaduras que transforman los azúcares en alcohol etílico. En la cinética de la fermentación la temperatura es uno de los factores que más influyen.

En las vinificaciones en vino blanco, la temperatura de fermentación idónea es una temperatura entre 15-20° C ya que así se favorece una mayor producción y retención de los aromas. En las vinificaciones en tinto, por el contrario, se utilizan temperaturas de fermentación más elevadas (22-28° C) porque lo que interesa es que haya una mayor extracción de los compuestos fenólicos de los hollejos de la uva, responsables del color tinto del vino, la cual se ve favorecida cuanto mayor es la temperatura (Torija, 2002). Durante la fermentación se

desprende anhídrido carbónico el cual tiende a empujar los hollejos hacia la parte superior del depósito y estos forman el “sombrero” (Blouin y Peynaud, 2003) dicha masa debe mantenerse húmeda, para lo cual se rocía con el propio mosto en un proceso llamado “remontado” o se realizan “bazuqueos” que consiste en ejercer presión para romper y hundir el sombrero. Al mismo tiempo sucede la maceración, en la cual se produce un intercambio de compuestos entre las partes sólidas de la uva (principalmente hollejos) y el mosto compuesto de azúcares principalmente glucosa, ácidos orgánicos, enzimas, sustancias nitrogenadas y vitaminas.

Los vinos dedicados a crianzas largas, necesitan concentraciones de color y taninos superiores que los otros, pues eso les garantiza su conservación en el tiempo, por este motivo de maceración, la fermentación puede variar en función de si el vino va a tener un mayor o menor grado de crianza. Una vez decidido el momento oportuno, se separa la fracción líquida de la pasta, mediante el “sangrado” de los depósitos y prensado de hollejos, llevándose el mosto/vino a otro depósito donde se realizará la fermentación lenta o de acabado, a esta separación la conocemos como Descube (García, 2011).

Existe una diferencia entre la elaboración del vino blanco y tinto, donde en el vino blanco se hace un Desfangado, que consiste en la remoción del mosto y hollejo del jugo de uva procedente del estrujado antes de ser Encubado para proceder con la fermentación. Debido a este proceso suele disminuir la concentración de nitrógeno asimilable y de proteínas. La adición de compuestos nitrogenados al inicio de la fermentación, suele ser importante para intentar evitar una ralentización o parada de fermentación. Normalmente se suele añadir una sal de amonio, siendo las preferidas el sulfato o fosfato de amonio (Ribéreau-Gayon y col, 2000).

Una vez superados los controles de calidad, se trasladan a “barricas” de madera o roble para su crianza. En esta fase, el vino sufre un proceso de oxidación de sus componentes, a través del oxígeno que penetra por los poros de la madera, por otro lado, el alcohol del vino es capaz de disolver los aromas. De esta forma, el vino transforma su color, con pérdida de tonos violáceos y la aparición de tonos rojos anaranjados. Los aromas se hacen más complejos y las sensaciones gustativas se suavizan, reafirmando su estructura. El vino también es sometido durante su pertenencia en la barrica, a periodos “trasiegos” para eliminar por decantación sus impurezas. Alcanzado el punto óptimo de evolución en madera, se procede a la homogenización de las barricadas, se filtra y pasa a embotellamiento.

La crianza en botella es almacenada en oscuros botelleros, apiladas en posición horizontal. En este ambiente exento de oxígeno y condiciones de temperatura y humedad, se originan complejas reacciones que acabará con pulir el vino, adquiriendo su total dimensión.

Selección de Levaduras

Se han utilizado las levaduras seleccionadas con excelentes resultados en muchos países, obteniéndose productos finales con muy buena calidad y además uniforme, comparándola con los productos obtenidos en las fermentaciones espontáneas. Pero a pesar de que ya existen levaduras comerciales para realizar las fermentaciones, se ha observado que es más efectivo 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 ya que se cree que las levaduras que se encuentran en una microzona son: específicas del área, totalmente adaptadas a las condiciones climáticas de la zona, además también están completamente adaptadas a la materia prima, es decir, al mosto a fermentar y responsables al menos parcialmente, de las características únicas de la bebida (Esteve-Zarzoso y col., 2000; Mas, 2002, Álvarez-Ainza, 2006).

Para seleccionar una levadura propia de una zona, el primer paso es conocer la flora autóctona de esa zona y por medio de estos estudios se confirma que muchas cepas *Saccharomyces* llevan a cabo las fermentaciones alcohólicas espontáneas, aunque muy pocas son predominantes al final de la fermentación, pudiéndose así seleccionar aquellas que se encuentren durante todo el proceso de la fermentación alcohólica y que cumplan con las características enológicas deseadas según la bebida (Esteve-Zarzoso y col., 2000; Mas, 2002).

***Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* en el Proceso de Fermentación del Vino**

El rol más importante de las levaduras en el proceso de fermentación es convertir el azúcar en etanol, y aunque el sabor del vino viene directamente de la variedad de la uva, el tipo de levadura presente en una variedad afecta el sabor del vino y la calidad por la producción y excreción de metabolitos durante el crecimiento (Fleet, 1993; Lambrechts y Pretorius, 2000).

Las especies encontradas en viñedos se dividen en dos grupos, *Saccharomyces* y No-*Saccharomyces*. Del grupo *Saccharomyces*, la especie *cerevisiae* es llamada la "levadura del vino" ya que es la responsable de convertir los azúcares a etanol gracias a su tolerancia a este y por jugar un papel en la formación de metabolitos secundarios de suma importancia (Fleet, 1993). Por otro lado, la importancia del uso de levaduras No-*Saccharomyces* en la producción de vino ha sido inmensamente discutida, géneros que se han investigado acerca de la

importancia de estas durante la fermentación involucran a *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Torulaspota* entre otras.

La microbiota en uvas es afectada por un número de factores como la altitud del viñedo, condiciones climáticas, variedad de la uva, prácticas vinícolas, aspecto de la uva y prácticas de conservación en barril (Bisson y Kunkee, 1991). Sin embargo, a pesar de estos factores las especies de levaduras son similares alrededor del mundo pero la proporción entre regiones es diferente (Amerine y col., 1967).

Por otro lado se ha reportado que dependiendo del clima de una región podemos encontrar a la levadura en su estado telemórfico (reproducción sexual) o anamórfico (reproducción asexual); por ejemplo en regiones tibias a calientes la forma telemórfica *H. uvarum* tiende a reemplazar la forma anamórfica *K. apiculata* y esta se encuentra en regiones frías (Bisson y Kunkee, 1991).

En el pasado se creía que todas las No-*Saccharomyces* morían después de comenzada la fermentación alcohólica por el incremento de la concentración del alcohol, bajo pH y deficiencia de oxígeno (Jackson, 1994; Combina & cols., 2005), pero trabajos recientes han demostrado que algunos géneros sobreviven en la etapa tardía de la fermentación (Fleet y col, 1984; Granchi., 1998; Zhore y Erten, 2002; Combina y col, 2005), este crecimiento es más evidente en fermentaciones espontaneas en donde no se inoculan cepas de *S. cerevisiae* en etapas iniciales (Querol y col, 1990).

Las levaduras No-*Saccharomyces* encontradas en mosto de uva y durante la fermentación se clasifican en tres grupos, levaduras aerobias como *Pichia* spp., *Candida* spp. y *Rhodotorula* spp., levaduras apiculadas con poca actividad fermentativa como *Kloeckera* spp. y levaduras con metabolismo fermentativo como *Torulaspota* spp y *Zygosaccharomyces* spp. (Fleet y col, 1984; Torija y col., 2001; Combina y col, 2005).

Los metabolitos resultantes de levaduras No-*Saccharomyces* durante la fermentación incluye el glicerol, acetaldehído, ácido acético y alcoholes superiores (Fleet y col, 1984; Bisson y Kunkee, 1991; Boulton y col, 1996). El glicerol, después del etanol es el metabolito más producido (Scanes y col, 1998) que contribuye en la sensación de suavidad del vino en la boca (Ciani y Maccarelli, 1898). Se ha comprobado que en las fermentaciones espontáneas se encuentra más concentración de glicerol indicando que las levaduras No-*Saccharomyces* juegan un papel en esta producción (Romano y cols., 1997; Henick-Kling y col., 1998) como *C. stellata* que produce entre 10-14 g/L (Ciani y Picciotti, 1995) a comparación de 4-10 g/L que produce *S. cerevisiae*. (Radler y Schütz, 1982). Si combinamos *C. stellata* y *S. cerevisiae* el resultado de glicerol es mayor, estos fueron los resultados de Ferrato y cols., quienes en el año

2000 llevaron a cabo un experimento con jugo de uva el cual se le inoculo primeramente *S. cerevisiae* y después de tres días se inóculo *C. stellata* y comparándolo con un control conteniendo solamente *S. cerevisiae* se obtuvo un 70 % más de glicerol y 0.05 g/L menos de ácido acético.

Algunas levaduras apiculadas como *Klockera* y *Hanseniaspora spp.* (Forma esporulada) son importantes por su capacidad de producir niveles altos de compuestos volátiles, sin embargo esto no es un impedimento para que los metabolitos secundarios contribuyan en el aroma y en el sabor del vino. Un ejemplo claro es la producción de 2-fenil-etilacetato por *H. guilliermondii* (Rojas y col, 2003), éste proporciona olor a rosa, miel y frutas (Lambrechts y Pretorius, 2000).

Otra levadura investigada es *Pichia fermentans* la cual produce el alcohol 2-feniletanol dando un olor a rosas y además la producción del compuesto aumenta la biomasa durante la parte inicial de la fermentación (Huang y col., 2001). Otras investigaciones hechas por Clemente-Jimenez y col. (2005) concluyeron que la mezcla de la levadura con cepas de *S. cerevisiae* incrementan los compuestos aromáticos como acetaldehído y glicerol. Además otras especies del mismo género has sido sugeridas para la producción de vinos con bajo porcentaje de alcohol (Erten y Campbell, 2001).

Otro rol fundamental de las levaduras No-*Saccharomyces* se da en las fermentaciones lentas o "atascadas". Durante la fermentación, la glucosa es el carbohidrato más utilizado aún que la fructosa, por lo tanto suele suceder un desequilibrio entre carbohidratos, siendo una levadura glucofílica, *Saccharomyces cerevisiae* no metaboliza la fructosa por lo tanto levaduras fructofílicas como *C. stellata* y *Z. bailli* entran en acción, una vez restaurado el desequilibrio *S. cerevisiae* continua la fermentación (Sütterlin y col, 2004).

Como pudimos observar el uso de levaduras No-*Saccharomyces* abarca una amplia gama y resultan efectivas en alguna etapa de la fermentación, la clave está en la apropiada selección de las cepas y el establecimiento de protocolos efectivos de inoculación para la obtención de vinos de calidad.

Fermentación Alcohólica

Theodore Schawnn y sus colaboradores propusieron en 1837 que las células de levaduras eran las responsables de la conversión de azúcares a alcohol proceso al que denominaron fermentación alcohólica. Ellos estaban convencidos que la fermentación alcohólica se debía a la inestabilidad química de degradar azúcares a etanol, en ese tiempo Pasteur no estaba de

acuerdo, de ahí se cree que el tomo el interés en la fermentación por sus estudios de esteroquímicas de las moléculas. Pasteur creía que las fermentaciones eran llevadas a cabo por organismos vivos que producían compuestos asimétricos con el alcohol isoamílico con actividad óptica. Y que estos compuestos asimétricos tenían una conexión con la actividad óptica y la vida (Prescott, 2002).

En 1856, Pasteur se unió a los estudios de Bigo un industrial en Francia. En esa industria Bigo producía etanol a partir de azúcares de remolacha, pero tenía problemas con los rendimientos de etanol y su producto se volvía agrio, por lo que solicitó a Pasteur que lo apoyara. Pasteur se dio cuenta que la fermentación estaba fallando porque la levadura usualmente responsable de la formación de etanol había sido reemplazada por microorganismos que producían más bien ácido acético en vez de etanol. Así Pasteur, demostró que todas las fermentaciones son debidas a las actividades de levaduras y bacterias específicas, publicó muchos reportes de investigaciones realizadas entre 1857 y 1860, y estos sucesos llevaron a estudios de enfermedades del vino donde se desarrolló la pasteurización para preservar el vino durante su almacenamiento (Prescott, 2002).

Evolución poblacional durante la fermentación alcohólica

La importancia de estudiar fermentaciones alcohólicas espontáneas radica en que es la única forma de conocer la dinámica poblacional propia de una bodega o región vitivinícola (Torija, 2002). Esto hace que las fermentaciones espontáneas no sean producto de la acción de una única especie o cepa de levadura, sino una sucesión de especies y cepas de levaduras diferentes a lo largo de la fermentación (Kunkee y Amerine, 1970; Lafon-Lafourcade, 1979; Zambonelli, 1988).

En una uva sana y madura que sea prensada asépticamente, la población de levaduras total en el mosto puede variar entre 10^3 - 10^5 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL), aunque el número de especies diferentes presentes en la uva será limitado.

En la microflora de la uva prevalecen los mohos y principalmente las levaduras apiculadas caracterizadas por su bajo poder fermentativo, siendo las especies mayoritarias *Kloeckera apiculata* y su fase imperfecta *Hanseniaspora uvarum* (Boulton y cols., 1996). La especies oxidativas pertenecientes a los géneros *Candida* (especialmente *C. stellata* y *C. pulcherrima*), *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Kluyveromyces* etc., se encuentran en menor número. Y *Saccharomyces*, la especie fermentativa se encuentra raramente a menos de 50

UFC/mL. Estas levaduras son las responsables de los primeros días de la fermentación (Querol y col, 1990; Longo y col, 1991; Fleet y Heard, 1993).

En la fase exponencial que dura entre dos y cinco días donde debido a la presencia de algunos factores selectivos como la anaerobiosis, el sulfitado, la elevada concentración de azúcares, y la presencia de etanol, estos géneros reducen su número dando paso al crecimiento de otras especies más tolerantes al etanol como son las de *Saccharomyces*. De hecho, *S. cerevisiae* es considerada la principal especie responsable de las fermentaciones alcohólicas (Ribéreau-Gayon, 1985).

Algunos estudios realizados han mostrado que algunas especies de no-*Saccharomyces* (especialmente *K. apiculata*, *C. stellata* y *C. colliculosa*) también contribuyen a la fermentación, ya que estas especies sobreviven más de lo que se pensaba inicialmente, pudiendo alcanzar poblaciones máximas de 10^6 - 10^7 UFC/mL (Fleet y col, 1984; Heard y Fleet, 1986). Por tanto, este crecimiento es cuantitativamente significativo y seguramente influenciará la composición organoléptica del vino. Además, las modificaciones que produzcan éstas en la composición del mosto tendrán un efecto en la cinética de la fermentación y comportamiento bioquímico de *Saccharomyces*.

Continúa la fase estacionaria que dura aproximadamente ocho días y a pesar de que el número de células no aumenta, la velocidad de fermentación sigue manteniéndose en su valor máximo debido a que las levaduras son metabólicamente activas. Finalmente el cultivo entra en una fase de muerte de hasta varias semanas donde decrece el número de células viables hasta 10^5 células/mL aproximadamente, lo cual va acompañado de una disminución en la velocidad de fermentación favorecida también por los efectos tóxicos del etanol y el agotamiento de nutrientes (Figura 5).

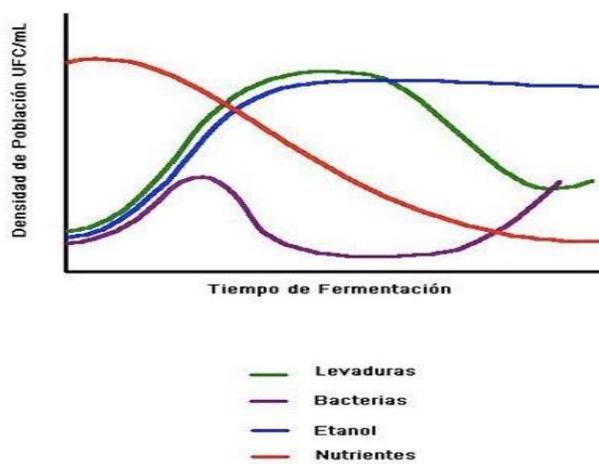


Figura 5. Evolución poblacional durante la fermentación alcohólica (Collado 2001).

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de Estudio

Las cepas utilizadas en este estudio provienen de una colección de cepas silvestres resguardadas en el laboratorio de Microbiología Molecular, obtenidas en un muestreo de uvas, de diferentes variedades (Petit Verdot, Malbec, Syrah, Toriga, Merlot, Mourvedre, Cabernet Sauvignon, Tempranillo, Grenache, Roussanne y Marssanne), que se llevó a cabo en el municipio de Cananea, Sonora durante el mes de septiembre del 2014, para obtener vinos y seguir la fermentación natural. El muestreo se llevó a cabo por la estudiante de maestría Fernanda González-Silva y el equipo de trabajo de la Dra. Evelia Acedo Félix.

Se realizó un aislamiento de cepas en tres fases de fermentación la inicial (tiempo 0), la logarítmica o exponencial (tiempo 1) y la estacionaria (tiempo 2). El sembrado se realizó por estría utilizando agar PDA (Agar 15g/L, Papa 4g/L y Dextrosa 20g/L; Becton, Dickinson and Company) acidificado con Acido tartárico al 10% para obtener un pH de 3.5 (Zamora, 2006) las placas se incubaron (Quincy Lab, inc. Modelo 12-MOE) durante 48 horas a 30 ° C. Las placas se utilizaron posteriormente para llevar a cabo pruebas fenotípicas.

Identificación Fenotípica

Morfología Colonial

A partir de las colonias puras de cada una de las cepas sospechosas de levadura aisladas previamente en el medio Agar Papa Dextrosa (PDA), se registraron las características coloniales en cuanto a su forma, color, borde, superficie y apariencia según Frazier y Weathoff (1998).

Morfología Microscópica

A cada una de las 660 cepas se le realizó la tinción de Shaeffer-Fulton, la cual consistió en la utilización de verde de malaquita al 5 % y un calentamiento de la muestra sobre un portaobjetos

hasta emitir vapores, después se lavó con agua y se cubrió con safranina al 0.5 % durante 30 segundos, posteriormente se lavó con agua y se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente la laminilla se observó a 100 X para apreciar la morfología característica de las levaduras y buscar la posible presencia de esporas. Esta tinción permite ver la forma vegetativa de la levadura de color rojo y la forma esporulada de color verde (Mendoza, 2005).

Crecimiento en Agar Lisina

Este medio es utilizado para distinguir a las cepas del género *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*, ya que las primeras no pueden desarrollar en un medio donde se tenga como única fuente de carbono a la lisina.

El medio lisina se preparó añadiendo 6.6 g del agar lisina (OXOID LTD) en 100 mL de agua destilada previamente estéril más 1 mL de lactato potásico al 50 % (Sigma-Aldrich), se llevó a ebullición hasta dilución completa, se dejó enfriar a 50° C y se añadió 0.1 mL de ácido láctico (OXOID LTD) por cada 100 mL de agua destilada para ajustar el pH 4.8 ± 0.2 . Las cepas fueron sembradas por estría en placas y se incubaron a 30° C por 48 horas (Quincy Lab, inc. Modelo 12-MOE), (Más y col, 2002).

Identificación de la Producción de H₂S

Para la determinación de la producción de H₂S se inoculó directamente mediante una asada el agar Biggy (Agar 16g/L, Sulfito de Bismuto 5g/L, Glucosa 10g/L, Glicina 10g/L y Extracto de levadura 1g/L). Este es un medio parcialmente selectivo para diferenciar cepas que producen este ácido, se utiliza principalmente para observar la producción de H₂S entre especies del género *Candida*, Las especies de *Candida* reducen la sal de bismuto a bismuto y el sulfito a sulfuro, mediante un proceso de reducción de sustrato. El bismuto y el sulfuro se combinan en un precipitado de color marrón a negro que tiñe las colonias y puede difundirse en el medio. Así mismo, los compuestos de bismuto y azufre inhiben numerosas bacterias. (Beckton, Dickinson and Company).

Fermentación de Carbohidratos

Para fines de este trabajo sólo se evaluó la fermentación de carbohidratos para las cepas H₂S negativo únicamente de la fase inicial y logarítmica. El fundamento de esta prueba bioquímica se basa en la propiedad que tienen diferentes géneros de levadura para utilizar ciertos azúcares en condiciones anaeróbicas. Los carbohidratos utilizados fueron: glucosa, maltosa, sacarosa, lactosa, galactosa, melibiosa, celobiosa, xilosa, rafinosa, trehalosa, melecitosa, fructosa, inulina y almidón. La preparación de carbohidratos se llevó a cabo pesando 1 g de cada uno y disolviendo en 10 mL de agua destilada, se esterilizaron por filtración (millipore, 0.22 µm), y se obtuvo 1 mL de esta solución y se agregó a 9 mL del medio de fermentación caldo base TPY (Tryptona 10 g/L, Peptona 5 g/L, Extracto de Levadura 2.5 g/L, Tween 80 1 g/L, K₂HPO₄ 2 g/L, MgCl₂ 6H₂O 0.5 g/L, ZnSO₄ 7H₂O 0.25 g/L, CaCl₂ 0.15 g/L y Cisteína-HCL 0.5 g/L), adicionado con púrpura de Bromocresol como indicador a pH 7 para llevar el carbohidrato a una concentración final de 1 % (van der Walt y Yarrow, 1984).

Así mismo, se tomó una colonia aislada y se inoculó en 1mL de caldo YEPD y se incubó a 30° C por 48 horas (Quincy Lab, inc. Modelo 12-MOE). Una vez incubadas las cepas estas fueron lavadas con solución salina estéril realizando lavados y centrifugando a 4,000 rpm por 4 minutos, las veces que fueran necesarias para obtener un sobrenadante claro libre de medio (dos o tres veces).

Para el medio de fermentación se utilizó el caldo base TPY con carbohidrato y púrpura de Bromocresol a pH 7.0 como indicador. El estudio se realizó en placas ELISA, a cada pozo se le agregaron 50 µL de cepa de levadura libre de medio YEPD previamente lavado adicionando 150 µL de caldo base TPY para cada uno de los carbohidratos, posteriormente se agregaron de 3 a 4 gotas de aceite mineral estéril y se incubaron a 30 ° C durante 48 horas (Zamora, 2006). Esta determinación se realizó por triplicado para cada cepa. Los resultados positivos fueron observados por el vire de color del medio de púrpura a amarillo a consecuencia de la disminución de pH. Para validar esta prueba se utilizaron cepas control de la Colección Española de Cepas Tipo las cuales se describen en la tabla 2. Así mismo, durante el desarrollo de la técnica se dejaron pozos con el caldo y el carbohidrato a probar sin inocular para verificar que no se ha contaminado previo a la inoculación.

Análisis de Similitud Entre Cepas

Las características bioquímicas evaluadas (producción de H₂S, crecimiento en lisina, y las pruebas de fermentación de carbohidratos) se analizaron en el Software BioNumerics. Los resultados de las pruebas fueron clasificados como 0(-) y 1(+), y se construyó una matriz simétrica. Se realizó el análisis de similitud de las cepas utilizando el coeficiente de Dice y se elaboraron los agrupamientos, utilizando el método de matriz de distancias UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean). Obteniendo así dendrogramas que mostraron las semejanzas que existen a nivel de cepas (Peña-Malvera y cols., 2010; Núñez-Colin y cols., 2011; Zamora, 2006).

Tabla 2. Cepas control utilizadas en este estudio

Clave	Especie	Origen
CECT 1891	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CECT
CECT 1940	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	CECT
CECT 1939	<i>Saccharomyces paradoxus</i>	CECT
CECT 11039	<i>Saccharomyces kluyveri</i>	CECT
CECT 10685	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	CECT
CECT 11406	<i>Debaryomyces etchellsii</i>	CECT
CECT 1451	<i>Dekkera bruxellensis</i>	CECT
CECT 11162	<i>Dekkera anomala</i>	CECT
CECT 11885	<i>Candida ethanolica</i>	CECT
CECT 11869	<i>Candida intermedia</i>	CECT
CECT 1018	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	CECT
CECT 11202	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	CECT
CECT 1112	<i>Pichia anomala</i>	CECT
CECT 1456	<i>Pichia guillermondi</i>	CECT

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de Levaduras

De las tres fases de la fermentación (tiempo 0, 1 y 2) se aislaron en total 660 cepas de las cuales 15 cepas correspondieron a bacterias y 645 cepas a levaduras.

Morfología Colonial

Las diferentes morfologías observadas en la fase inicial, logarítmica y estacionaria, se observan en las Tablas 3, 4 y 5, en cada fase se observaron las características coloniales de 220 cepas. En la Figura 6 se puede observar una foto de las morfologías.

Tabla 3: Morfologías coloniales observadas en la fase inicial.

Forma	Bordes	Elevación	Superficie	Consistencia	Efecto de luz	Otros
puntiforme	ondulada	convexa	lisa	cremosa	brillante	blanco (borde) y rosa claro (centro)
circular	ondulada	convexa	lisa	cremosa	brillante	rosa fuerte.
puntiforme	ondulada	plana	lisa	cremosa	brillante	amarillo claro.
circular	lobulada	convexa	lisa	cremosa	brillante	blanca (centro) café claro (borde)
circular	entero	convexa	lisa	cremosa	brillante	blanca
puntiforme	entero	plana	lisa	cremosa	brillante	blanca

Tabla 4: Morfologías coloniales observadas en la fase logarítmica.

Forma	Bordes	Elevación	Superficie	Consistencia	Efecto de luz	Otros
circular	ondulada	convexa	lisa	cremosa	brillante	café claro.
circular	ondulada	plana	lisa	cremosa	brillante	rosa claro.
circular	ondulada	elevada	lisa	cremosa	brillante	blanca con elevación central.

Tabla 5: Morfologías coloniales observadas en la fase estacionaria.

Forma	Bordes	Elevación	Superficie	Consistencia	Efecto de luz	Otros
circular	entera	convexa	lisa	cremosa	brillante	crema, tamaño mediano.
circular	entera	convexa	lisa	cremosa	opaca	blanco-transparente.
circular	entera	plana	lisa	cremosa	brillante	blanca, tamaño mediano.
circular	entera	plana	lisa	cremosa	brillante	marrón, tamaño mediano.



Figura 6. Morfologías coloniales observadas en medio PDA.

Morfología Microscópica

Durante las fases de la fermentación mediante la tinción Shaeffer-Fulton se observaron células color rojo, con forma fusiforme, de tamaño mediano, piriforme, redondas de tamaño grande, redondas de tamaño mediano, y ovaladas de tamaño mediano, características similares a las ya reportadas para fermentaciones alcohólicas. En la Figura 7 se pueden apreciar algunas morfologías microscópicas, las cuales coinciden con lo reportado en la bibliografía, la mayoría de las cepas presenta dentro de su morfología microscópica las gemas características del tipo usual de reproducción de levaduras la gemación (Mesas y Alegre, 1999).

Así mismo, mediante esta técnica se pudo observar que de las 660 cepas algunas no correspondían a levaduras y se trataba de bacterias (15 cepas). También se observó que algunas células se reprodujeron sexualmente según lo describe Madigan y col. (2000) ya que se observaron ascosporas en las cepas procedentes de la uva Tempranillo durante la fase inicial y logarítmica así como también en las cepas correspondientes a Petit Verdot y Toriga durante la misma fase.

Se observó que al inicio de la fermentación alcohólica hubo mayor variedad de morfologías que conforme transcurría la fermentación, lo cual concuerda con la bibliografía, ya que ha sido reportado que la cantidad de especies es restringida en fermentaciones

espontaneas, porque no todas las especies de levaduras son capaces de resistir las condiciones adversas que va presentando el mosto como el aumento de etanol, alcoholes superiores, toxinas así como también el bajo pH (Querol y col, 1994; Pretorius, 2000; Romano y col, 2003).

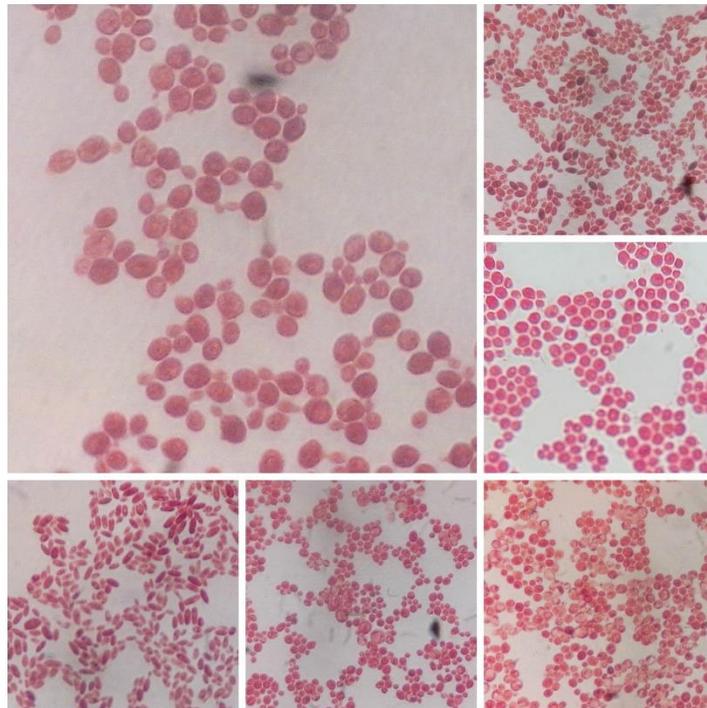


Figura 7. Morfología microscópica observada durante la fermentación alcohólica.

Crecimiento en Agar Lisina

En la Figura 8 observamos un ejemplo del desarrollo positivo y negativo en el medio lisina. En la fase inicial se observó que 204 cepas lograron desarrollar en el medio lisina por lo que se sospecha de cepas de los géneros *no-Saccharomyces* mientras que 13 cepas no desarrollaron, indicando posiblemente cepas *Saccharomyces*, en la fase logarítmica 28 cepas no desarrollaron y 190 cepas si desarrollaron y finalmente en la fase estacionaria 76 cepas no desarrollaron y 134 si lograron desarrollar (Figura 9). Cabe recordar que este medio es utilizado para distinguir a las cepas del género *Saccharomyces* y *no-Saccharomyces*, ya que las primeras no pueden crecer en un medio donde se tenga como única fuente de carbono una lisina (Mas y col., 2002).

Sin embargo, en trabajo anteriores en el laboratorio de Microbiología Molecular se ha observado que existen cepas tanto *Saccharomyces* que son capaces de crecer en este medio y cepas de no-*Saccharomyces* que no crecen, según la identificación fenotípica y molecular realizada a cepas aisladas de fermentaciones naturales durante el proceso de fermentación del bacanora (Zamora-Quíñonez, 2006; Álvarez-Ainza, 2006).



Figura 8. Ausencia y presencia de crecimiento en agar Lisina por diferentes cepas de levaduras aisladas de uva.

La cantidad de levaduras del género *Saccharomyces* aumentó conforme la fermentación avanzaba, éstas no lograron reemplazar a las no-*Saccharomyces* por lo que se puede inferir la existencia de otros géneros como *Kloeckera*, *Candida*, *Kluyveromyces* y *Torulaspota* ya que son levaduras que algunos estudios realizados han mostrado que son las que tienen la capacidad de sobrevivir a lo largo de la fermentación, esto concuerda con hallazgos para la bebida tequila donde se observó que especies de *Kloeckera* eran las responsables de fermentaciones en éste producto (Díaz-Montaño y col., 2008). Además de que se ha observado que algunas de estas especies de no-*Saccharomyces* contribuyen en el proceso de fermentación produciendo aromas agradables para las bebidas como el vino o tequila, ya que estas especies sobreviven más de lo que se pensaba inicialmente (Fleet y col., 1984; Díaz-Montaño y col., 2008; Álvarez-Ainza, 2011).

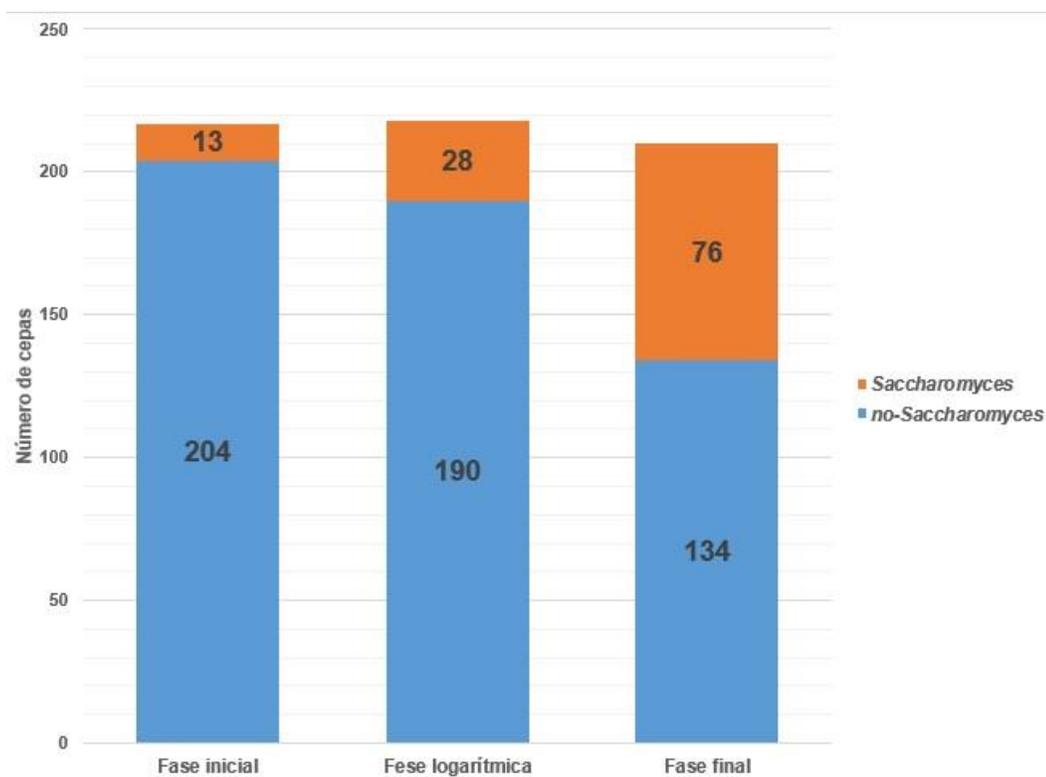


Figura 9. Cepas de *Saccharomyces* y *no-Saccharomyces* encontradas en las diferentes fases de fermentación.

Identificación de Producción de H₂S

Mediante siembra por estría en medio Biggy se evaluó la producción de H₂S. Las cepas positivas a producción de H₂S fueron 153, mientras que 64 fueron negativas en la fase inicial, en la fase logarítmica 137 cepas fueron positivas y 81 fueron negativas, por último en la fase estacionaria 140 fueron positivas y 70 fueron negativas. Con estos resultados podemos decir que más del 50 % de las cepas en las tres fases de la fermentación producen ácido sulfhídrico. En la figura 10 observamos un ejemplo positivo y negativo de la producción de ácido sulfhídrico. Mientras que en la figura 11 observamos el gráfico de las cepas positivas y negativas a producción de H₂S.



Figura 10. Ausencia y presencia (color marrón) de H₂S en medio BiGGY.

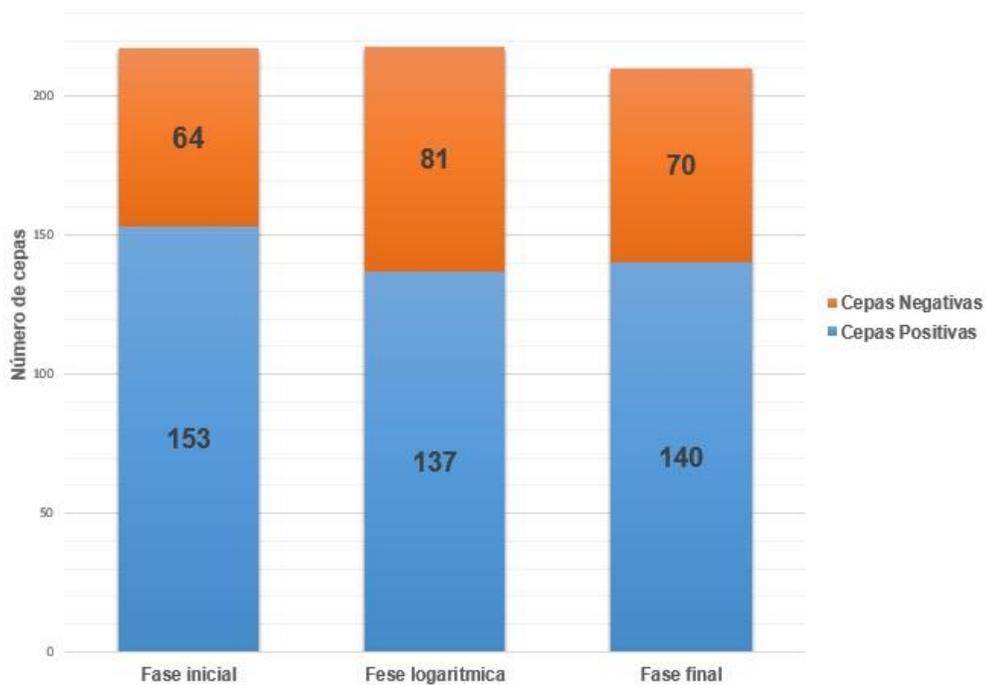


Figura 11. Cepas positivas y negativas a producción de H₂S encontradas en las tres fases de fermentación.

El ácido sulfhídrico y los compuestos azufrados causan aromas desagradables del vino, esta formación de compuestos se dan por enzimas y la biosíntesis de aminoácidos

azufrados, por lo tanto no es recomendable la selección de cepas que presentan elevada producción de estos compuestos y deben ser descartadas (Torija, 2002; Jolly y col, 2003).

Fermentación de carbohidratos

Para fines de este trabajo sólo se realizó el perfil de carbohidratos de las cepas que dieron negativa la prueba de H₂S en la fase inicial y logarítmica, es decir 64 cepas de la fase inicial y 81 cepas de la fase logarítmica. Hay que recordar que las cepas que producen el ácido sulfhídrico no son enológicamente deseables.

En la fase inicial 54 de ellas fermentaron glucosa, 43 galactosa, 37 maltosa, 43 sacarosa, 24 trehalosa, 12 melobiosa, 36 Lactosa, 19 celobiosa, 22 melecitosa, 23 rafinosa, 43 fructosa, 20 Inulina y 26 xilosa.

De nuestras 81 cepas negativas a producción de ácido durante la fase logarítmica, 68 de ellas fermentaron glucosa, 18 galactosa, 26 maltosa, 65 sacarosa, 25 trehalosa, 2 melobiosa, 29 lactosa, 1 celobiosa , 20 rafinosa, 49 fructosa, 15 Inulina y 1 Xilosa.

Después de glucosa, los carbohidratos más utilizados por las levaduras del tiempo 0 fueron galactosa, sacarosa y fructosa. El menos utilizado fue melibiosa y el almidón no fue utilizado por ninguna levadura. Después de glucosa, el segundo carbohidrato más utilizado por las levaduras del tiempo 1 fue sacarosa. Los menos utilizados fueron celobiosa y xilosa. melecitosa y almidón no fueron utilizados.

Como se puede observar se encontró una gran diversidad de cepas ya que la utilización de los carbohidratos por parte de las cepas evaluadas fue muy variable, lo cual es muy común en las fermentaciones espontáneas, donde al inicio la población es muy diversa y ésta se va restringiendo conforme avanza la fermentación alcohólica (Querol y cols., 2003). Así mismo, se puede observar que existen cepas de interés biotecnológico para otros tipos de productos diferentes al vino, como aquellas cepas que utilizan la inulina, en dado momento se pueden utilizar para la fermentación de bebidas procedentes de agave como el bacanora o aquellas cepas que utilizan la xilosa, ya que las levaduras al fermentar la xilosa producen un edulcorante muy potente actualmente de gran interés comercial, el xilitol.

Análisis de similitud entre las cepas

Para obtener el porcentaje de similitud entre las especies y cepas de levaduras, las características bioquímicas evaluadas (producción de H₂S, crecimiento en lisina, y las pruebas de fermentación de carbohidratos) se analizaron en el Software BioNumerics. Los resultados de las pruebas fueron clasificados como 0 (-) y 1 (+), y se construyó una matriz simétrica. Se realizó el análisis de similitud de las cepas utilizando el coeficiente de Dice y se elaboraron los agrupamientos, utilizando el método de matriz de distancias UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean).

El UPGMA es el método de reconstrucción filogenética más sencillo de todos, fue desarrollado para construir fenogramas (dendrogramas) taxonómicos, es decir, árboles que reflejaran las similitudes fenotípicas o genotípicas entre los OTUs (unidades taxonómicas operacionales, es decir cada una de las colonias aisladas en este caso), obteniendo así dendrogramas que mostraron las semejanzas que existen a nivel de cepas (Zamora-Quíñonez, 2006). Los dendrogramas permiten observar los agrupamientos entre las cepas en base a sus semejanzas, entre más semejantes son las características que se están analizando, más cercanas son las cepas y eso lo podemos observar mediante el porcentaje de similitud (Abrahamovich y Alpii, 2014).

En la Figura 12 se muestra el dendrograma del tiempo 0 en donde se encontraron 63 perfiles diferentes. Se observa un agrupamiento con 46 % de similitud donde se observa que sus características fenotípicas difieren bastante de los demás grupos. Se observó un grupo con 52 % de similitud incluyendo a una cepa control de *Kluyveromyces marxianus* (CECT).

Otro grupo de 67 % de similitud conteniendo las variedades de Merlot, Cabernet Sauvignon, Malbec, Mourvedre, Tempranillo, Petit Verdot, Syrah y controles como *Saccharomyces* sp., *Pichia* sp., *Candida* sp., y *Kluyveromyces* sp. Por último, encontramos un grupo de cepas con un 86 % de similitud entre ellas que incluye las variedades de Petit Verdot y Malbec. Así mismo, se observaron similitudes del 100 % entre cepas de diferentes tiempos y de procedentes de diferentes variedades de uva.

En el análisis del tiempo 1 se pudo observar un grupo con una similitud de un 66 % de un grupo de levaduras que incluye las variedades Merlot, Mourvedre, Syrah, Grenache, Marssanne y Malbec. Dentro de este grupo se tienen cinco grupos con similitud del 100 % que incluyen las variedades de Merlot, Malbec, Grenache, Marssanne, Syrah y Mourvedre.

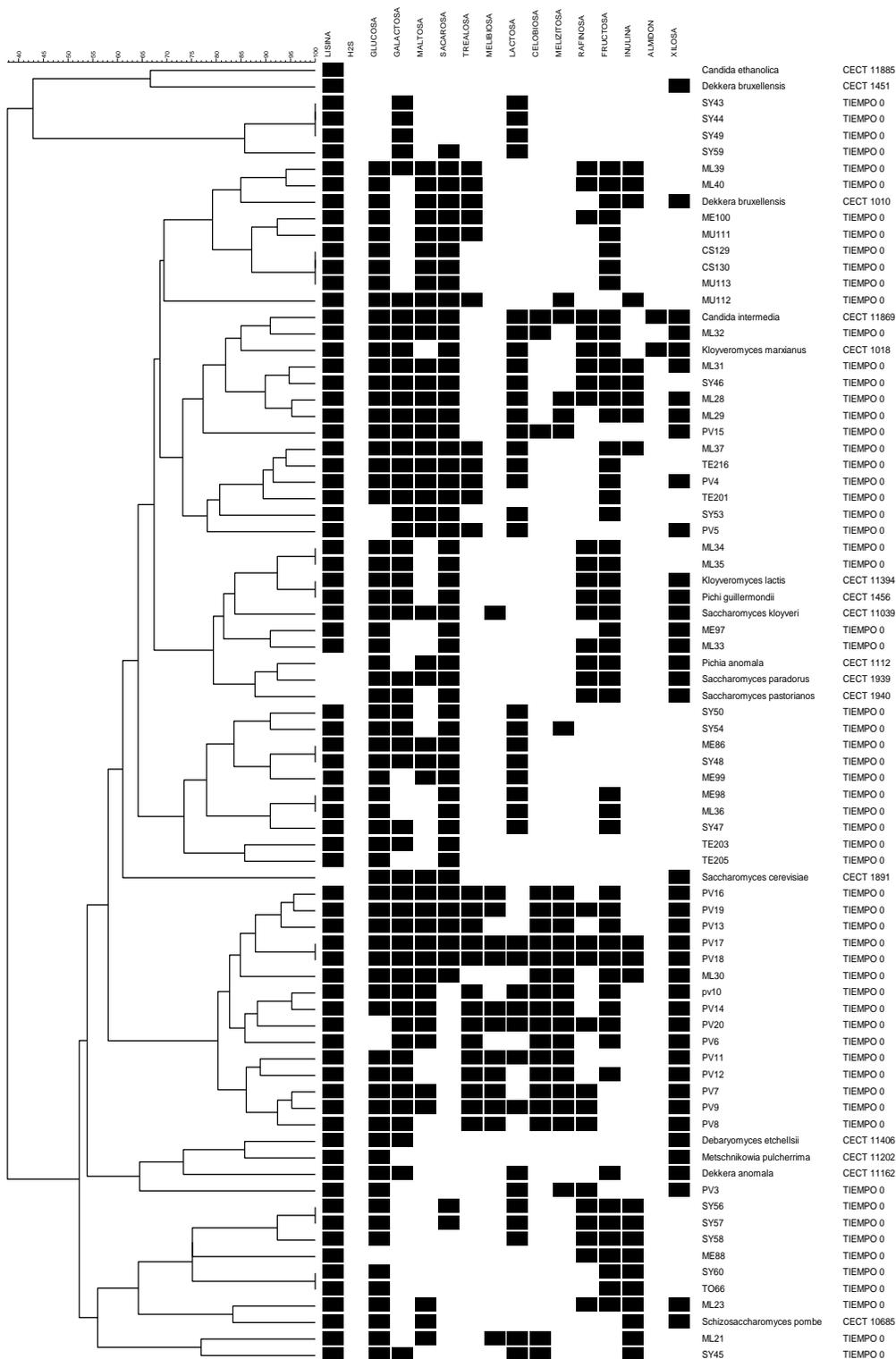


Figura 12. Dendrograma de perfil de carbohidratos de la fase inicial.

Otro grupo importante es el de 74 % de similitud conteniendo las variedades de Marsanne, Malbec, Mourvedre y Roussanne. Dentro de este grupo tenemos cuatro grupos con similitud del 100 % con variedades como Mourvedre, Malbec, Syrah, Grenache y Roussanne. En la figura 13 se muestran los 66 perfiles diferentes encontrados para las cepas aisladas en el tiempo 1.

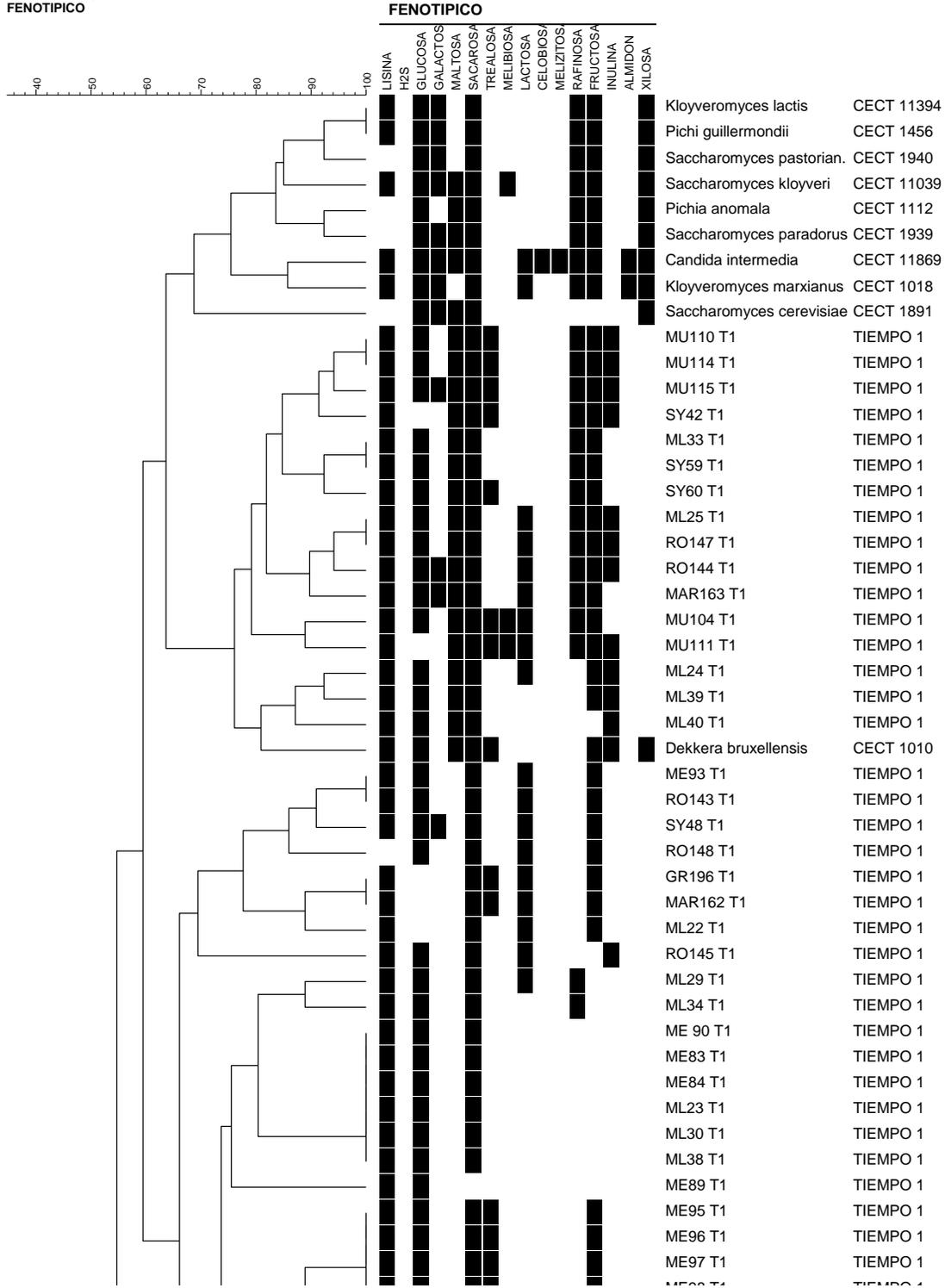
Se realizó también un tercer análisis (Figura 14) donde se incluyen todas las cepas evaluadas es decir tanto de la fase inicial como la logarítmica, donde se observó a pequeños grupos de cepas mezcladas con variedades de uva distintas y tiempos diferentes con una similitud del 100 % (27 grupos), lo que nos indica que la misma especie o cepa de levadura probablemente está persistiendo durante el curso de la fermentación y la observamos en diferentes variedades de uva, como lo observó Zamora-Quiñonez (2006), en sus aislamientos e identificación de levaduras provenientes de la fermentación de bacanora, donde se identificó y caracterizaron a cepas nativas aisladas de diferentes zonas de producción. Los grupos con 100 % de similitud constaron de dos a ocho cepas, tanto de diferentes variedades como diferentes tiempo y combinación de estos. Con estos resultados se puede inferir que el mismo género de una levadura se puede encontrar no solo en diferente tiempo de la fermentación, sino también en diferente variedad de uva.

Se puede observar que las cepas o sus características no son dependientes en su totalidad de la variedad de uva de donde se aisló, así mismo, podemos observar que algunas cepas comparten características de similitud con los controles utilizados, sin embargo ninguna cepa de las aisladas coincidió al 100 % de similitud con las cepas control en las características analizadas.

Estos hallazgos concuerdan con Zamora-Quiñonez (2006) y no es de extrañar ya que las cepas control provienen de una colección Europea por lo que se trata de cepas diferentes a las locales del municipio de Cananea, Zamora-Quiñonez (2006) no encontró alta coincidencia entre las cepas de la CECT y sus cepas nativas.

Así mismo, tampoco podemos determinar que especies o cepas de levaduras son, ya que por estudios previos realizados por Zamora-Quiñonez, 2006 y Álvarez-Ainza, 2006 en el laboratorio de Microbiología Molecular dirigidos por la Dra. Evelia Acedo, se tiene la experiencia de que una identificación fenotípica no siempre coincide con la real y se tienen que realizar estudios de identificación genómica.

Dice (> 50%MEAN)
FENOTIPICO



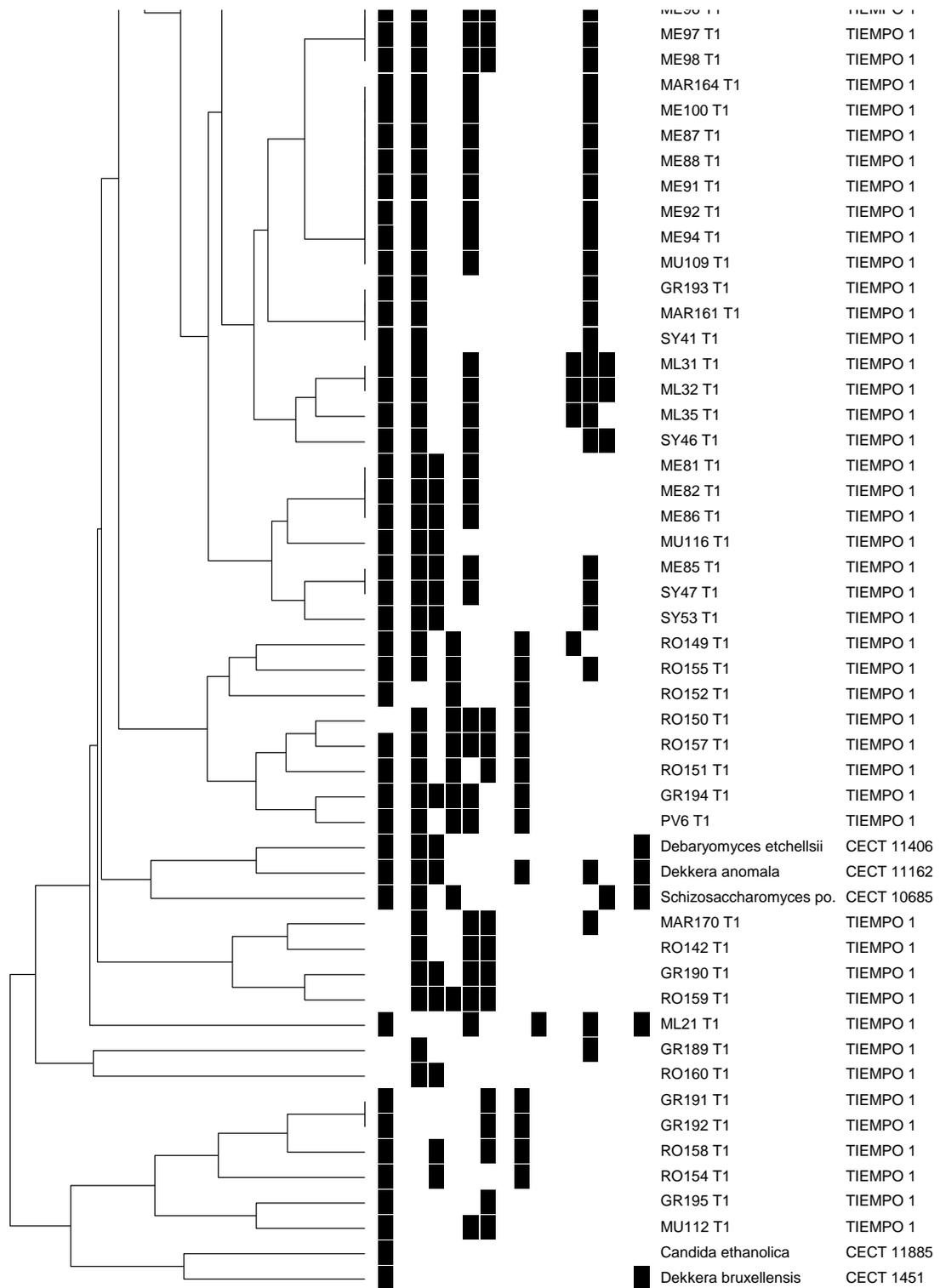
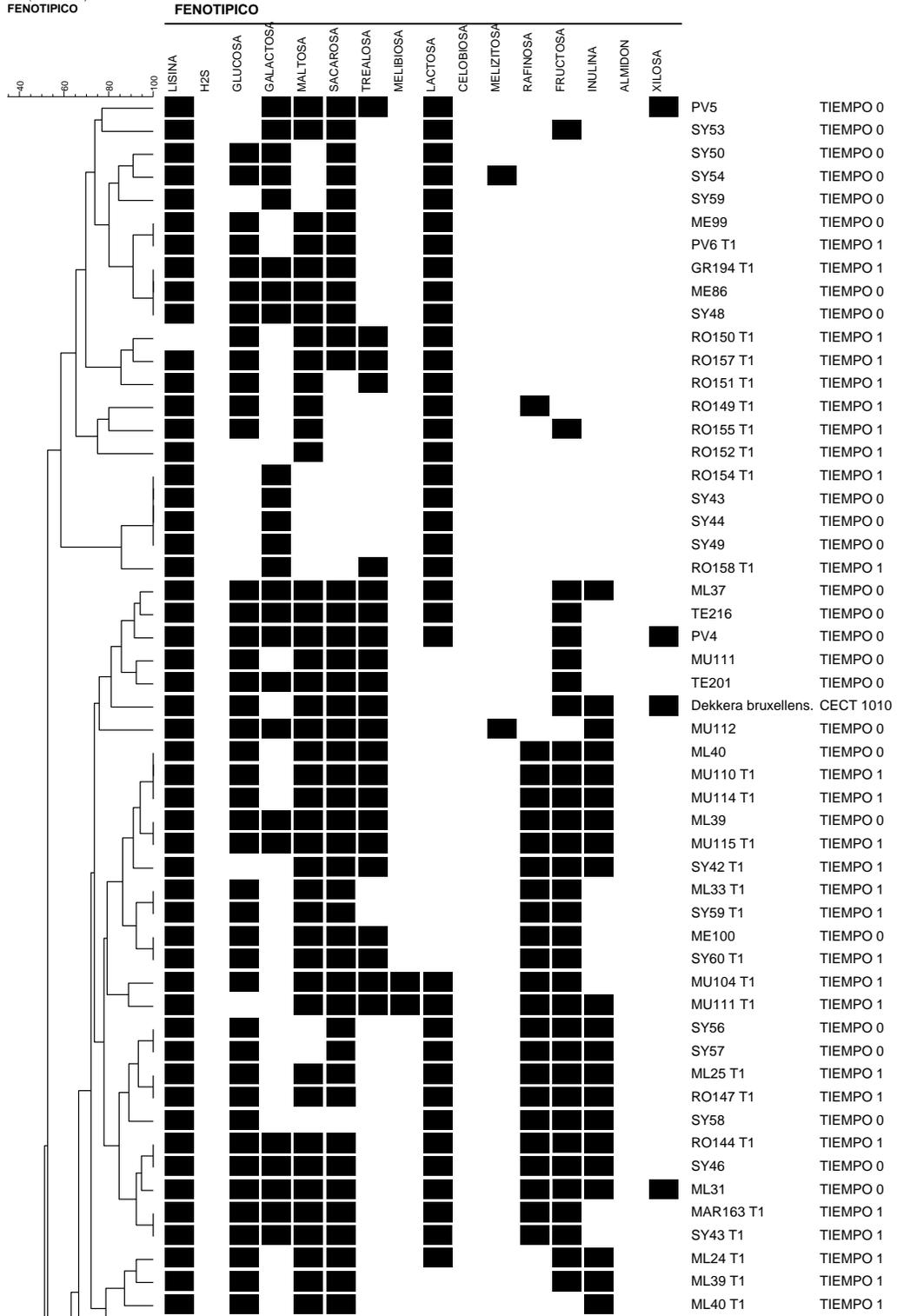


Figura 13. Dendrograma del perfil de carbohidratos de la fase logarítmica.

Dice (> 50%MEAN)
FENOTIPICO



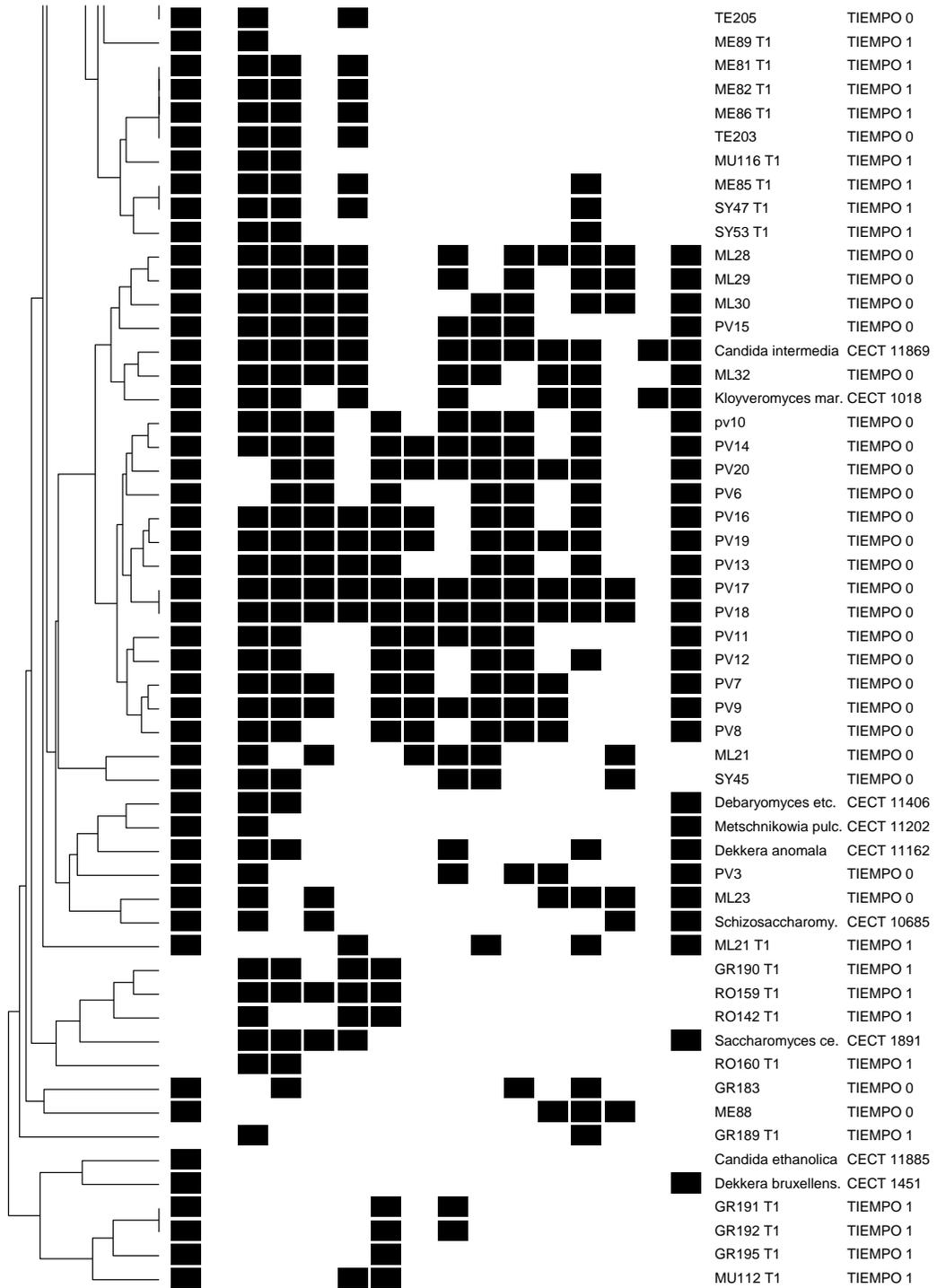


Figura 14. Dendrograma del perfil de carbohidratos de la fase inicial y logarítmica.

En dichos trabajos Zamora-Quiñones describió la identificación fenotípica de cepas aisladas de diferentes municipios donde se produce bacanora donde observó cepas con el mismo porcentaje de similitud entre los municipios que analizó pero también una alta variabilidad bioquímica lo que provocó la observación de dendrogramas complejos, lo que también se observa en los resultados de este trabajo por las mismas razones. Además dicha identificación no coincidió con la identificación molecular realizada por Álvarez-Ainza en el 2006 de las mismas cepas. Se ha observado también esto en otros productos como jugos de naranja donde la identificación fenotípica no coincide con la molecular, el estudio de Covadonga y col. (2002) compara diferentes métodos de identificación fenotípica donde observan que no todos los métodos fenotípicos coinciden con la identificación genómica y además en algunos casos no es posible determinar que especie es con los métodos fenotípicos, como son los métodos comerciales rápidos o sistemas API.

Sin embargo, debido a lo anterior se buscó en la bibliografía así como bases de datos, publicaciones de perfiles de cepas de lavaduras, donde se mostraran las características que en este trabajo se evaluaron, en particular se buscaron cepas que frecuentemente se observan en fermentaciones espontáneas. Una vez localizados algunos perfiles de cepas en la bibliografía y bases de datos estos se introdujeron y analizaron en software BioNumerics para poder determinar si existía similitud entre las cepas descritas en la bibliografía, así mismo en este análisis se analizaron perfiles de cepas aisladas por Zamora-Quiñonez (2006) y Álvarez-Ainza (2006). Los perfiles localizados se muestran en la Tabla 6, donde se observan perfiles obtenidos de Zamora-Quiñonez, 2006, de la bases de datos CBS: Knav Collections y V&E: <http://wineserver.ucdavis.edu/>.

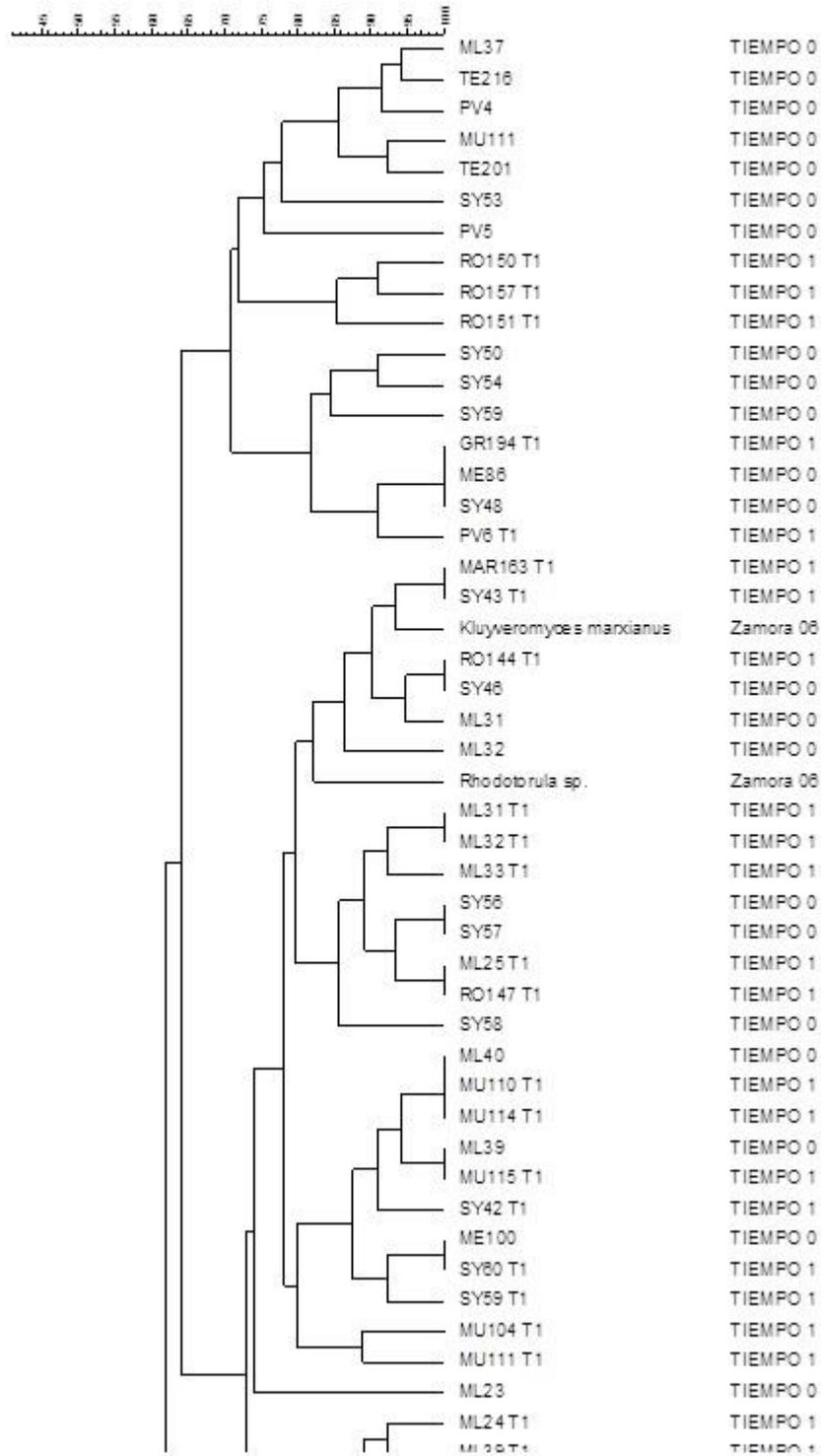
La Figura 15 muestra el análisis realizado entre las cepas aisladas en este estudio y las encontradas en la bibliografía así como las aisladas e identificadas por Zamora-Quiñonez (2006). El dendrograma muestra que hay agrupaciones con un 90 % de similitud entre las cepas aisladas de uva con la especie de *Kluyveromyces marxianus* aisladas e identificada por Zamora-Quiñonez (2006). También observamos un grupo con 100 % de similitud con la especie de *Hansenula polymorpha* (V&E), así como, una agrupación con alrededor un 80 % de similitud con cepas del género *Pichia* al igual que una agrupación con *Saccharomyces cerevisiae*.

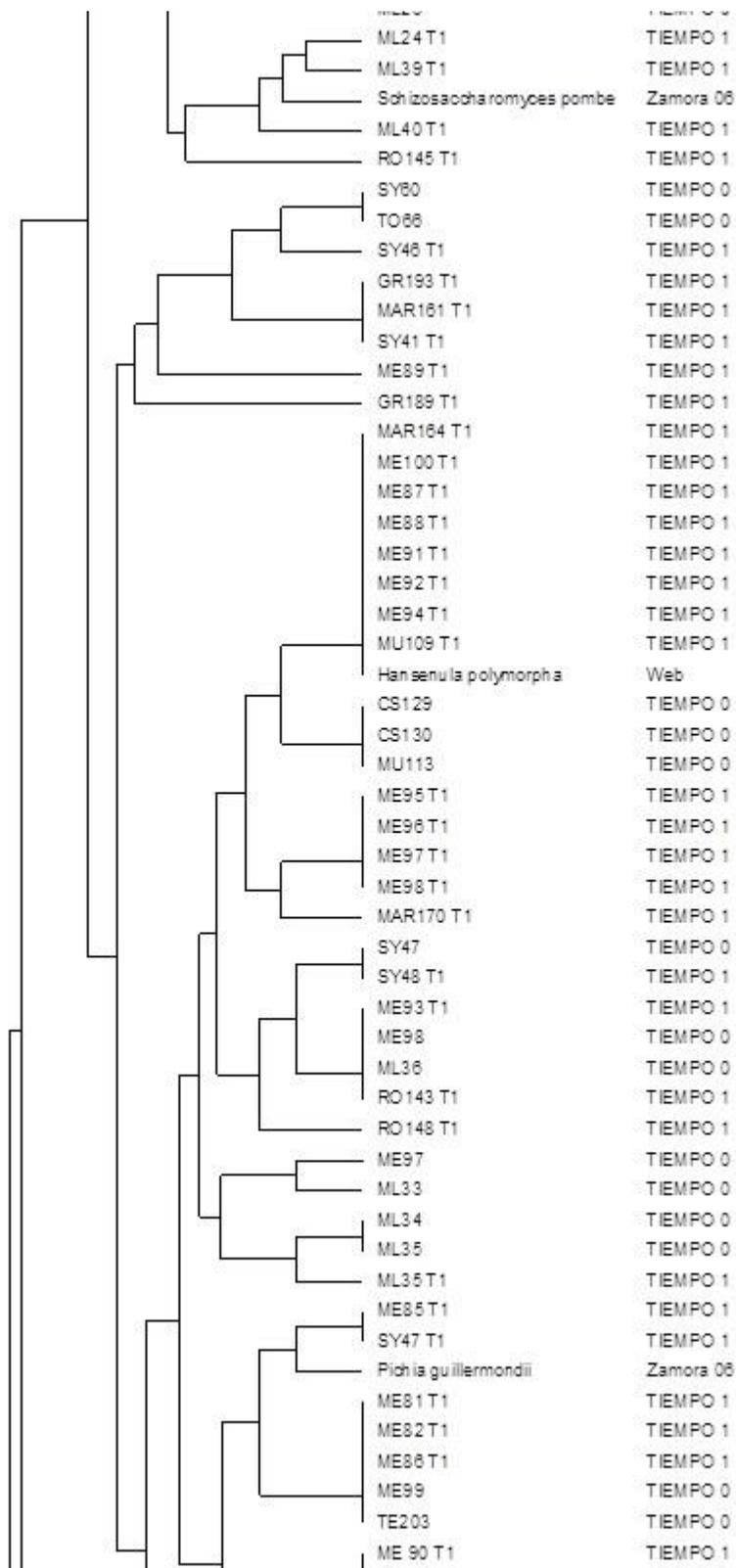
Tabla 6. Perfiles fenotípicos de cepas descritas en otros trabajos

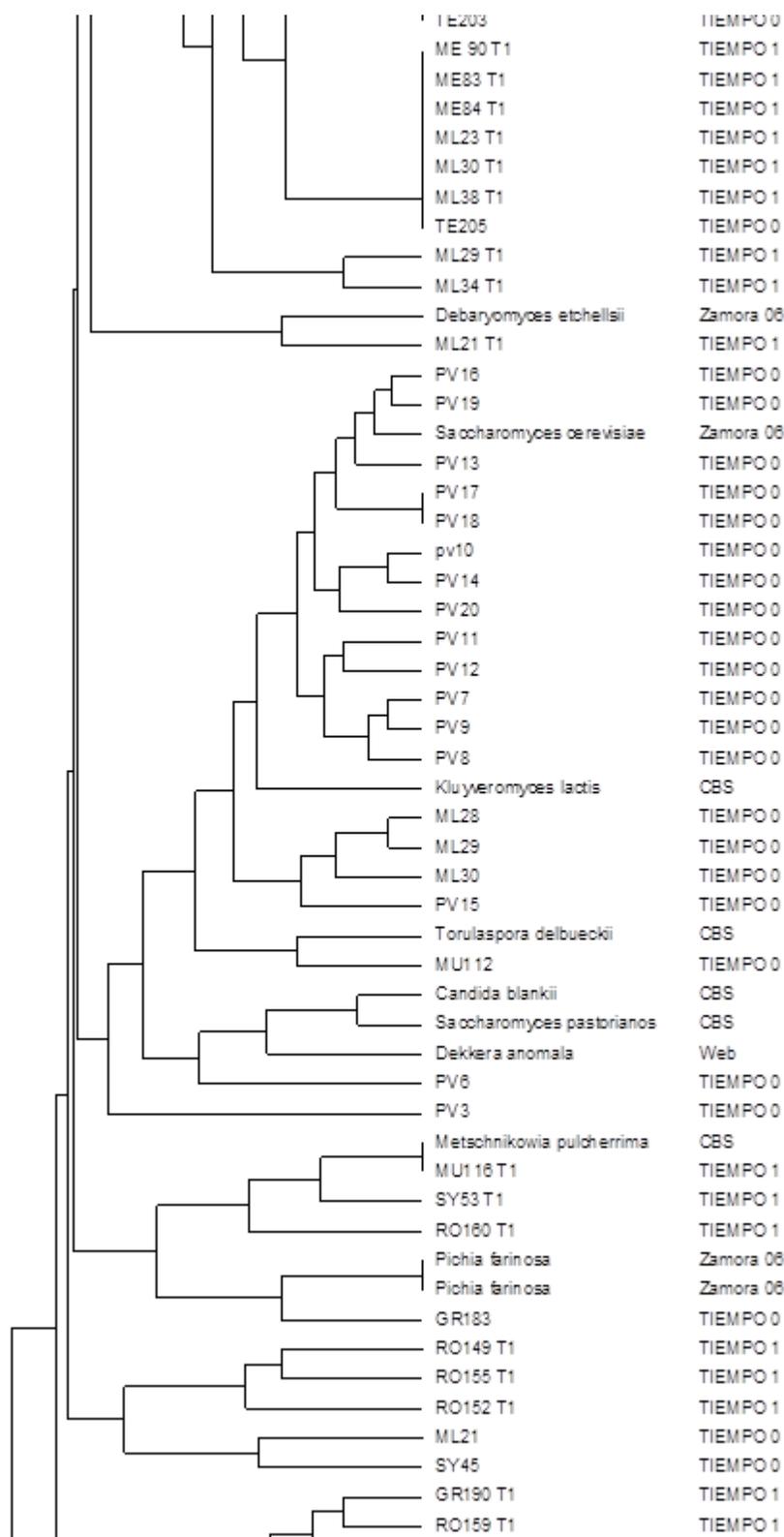
Especie	Carbohidrato														Fuente
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>															Zamora, 2006
<i>Kluyveromyces marxianus</i>															Zamora, 2006
<i>Pichia guilliermondii</i>															Zamora, 2006
<i>Pichia farinosa</i>															Zamora, 2006
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>															Zamora, 2006
<i>Rhodotorula sp.</i>															Zamora, 2006
<i>Hansenula polymorpha</i>															V&E
<i>Dekkera anómala</i>															V&E
<i>Debaryomyces etchellsii</i>															CBS
<i>Kluyveromyces lactis</i>															CBS
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>															CBS
<i>Saccharomyces paradoxus</i>															CBS
<i>Saccharomyces pastorianus</i>															CBS
<i>Candida blankii</i>															CBS
<i>Torulaspota delbrueckii</i>															CBS

1: glucosa, 2: galactosa, 3: maltosa, 4: sacarosa, 5: trehalosa, 6: melibiosa, 7: lactosa, 8: celobiosa, 9: melecitosa 10: rafinosa, 11: fructosa, 12: inulina, 13: almidón: 14: xilosa. CBS: Knaw Collections, V&E: <http://wineserver.ucdavis.edu/>.

Dist. (x 50%) (GAAP)
FENOTIPICO







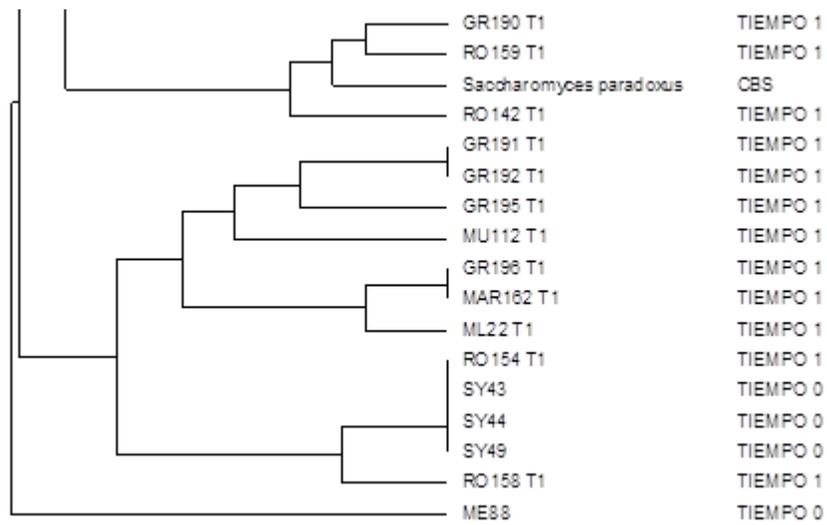


Figura 15. Dendrograma de cepas aisladas de tiempo 0 y 1 con cepas encontradas en la bibliografía (CBS: Klaw Collections, V&E: <http://wineserver.ucdavis.edu/>).

CONCLUSIONES

Se lograron aislar un total de 660 cepas de las 11 variedades de uva.

Se observaron colonias características de levaduras.

Al realizar la observación microscópica de cada aislamiento se encontró que 645 cepas correspondían a levaduras y las cepas restantes correspondían a bacterias. La morfología de estas levaduras fue de forma circular y fusiforme.

Se diferenciaron 117 cepas del género *Saccharomyces* y 528 no-*Saccharomyces*, por lo que podemos concluir que las cepas *Saccharomyces* no lograron reemplazar a las no-*Saccharomyces* en las etapas finales de la fermentación y sospecha de géneros como *Kloeckera* sp., *Candida* sp., *Kluyveromyces* sp., *Torulaspota* sp., entre otros.

Más del 50 % de las cepas produjeron ácido sulfhídrico, 430 cepas producen el H₂S y sólo 215 no lo produjeron.

Los carbohidratos más utilizados por las levaduras en la fase inicial y logarítmica fueron la glucosa, sacarosa y fructosa, donde se observaron 112 perfiles diferentes.

No se encontraron similitudes con las cepas control de la Colección Española de Cepas tipo en el análisis de similitud con las cepas aisladas en este estudio.

En el análisis de similitud entre las cepas aisladas y las encontradas en la bibliografía muestra altos porcentajes de similitud entre *Hansenula polymorpha* (100 %), *Kluyveromyces marxianus* (90 %) y *Pichia guillermondii* y *Saccharomyces cerevisiae* (80 %).

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar una caracterización molecular de las especies aisladas para conocer con exactitud el género y especie de estas y así crear una base de datos que será de suma importancia para conocer las levaduras nativas que se desarrollan en las diferentes variedades de la región.
2. Debido que en este trabajo solo se realizaron algunas pruebas de caracterización fenotípica es necesario la evaluación de pruebas Enológicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad-Arranz E. 2006. Selección de levaduras autóctonas para la elaboración de vinos tintos para bodegas y viñedos de Trujillo S.L. Universidad Politécnica de Madrid. Escuela Superior de Ingenieros Agrónomos. Madrid, España. 115 p.
- Abrahamoxich E, Alppi A. 2014. Diversidad de cepas de *Agrobacterium rubi* aislados de arándanos. Revista Argentina de Microbiología. 46 (3): 237-241.
- Álvarez-Ainza ML. 2006. Caracterización polifásica de cepas *Saccharomyces* que llevan a cabo la fermentación alcohólica, durante la elaboración del bacanora. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Hermosillo, Sonora, México. 74 p.
- Álvarez-Ainza ML, Zamora-Quiñonez A, Acedo-Félix E. 2009. Perspectivas para el uso de Levaduras Nativas Durante la Elaboración de Bacanora. Revista Latinoamericana de Microbiología. 51(1-2): 58-63.
- Álvarez-Ainza ML. 2011. Parámetro de calidad, características sensoriales del bacanora y selección de un cultivo iniciador para la fermentación de azúcares de *Agave angustifolia* Haw. Tesis de Doctorado. Centro de investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Hermosillo, Sonora, México.
- Amerine MA, Berg HW, Cruess WV. 1967. The technology of winemaking. Connecticut: The AVI Publishing Company, Inc. 799 p.
- Arias CR, Burns JK, Friedrich LM, Goodrich RM, Parish ME. 2002. Yeast species associated with orange juice: evaluation of different identification methods. Applied and Environmental Microbiology. 68(4): 1955-1961.
- Barrajón-Simancas NB, de Vidales Calvo MR, Infante SA. 2007. Éxitos y fracasos en la inoculación de levaduras seco activas en bodegas de Castilla La Mancha. Cuadernos de estudios manchegos, Universidad de Castilla La Mancha. I.S.S.N.: 0526-2623. 17p.
- BD, Becton Dickinson and Company (1897). BiGGY Agar (Bismuth Glucose Glycine Yeast Agar). Disponible en: (fecha de acceso: 10 de Noviembre de 2014).
- Bernardi AM. 2013. Selección de levaduras vínicas provenientes de la provincia de Mendoza. 1era ed. Universidad Nacional de Cuyo, Facultad de Ciencias Agrarias. Argentina, México. 57 p.

- Bisson LF, Kunkee RE. 1991. Microbial interactions during wine production. Mixed cultures in Biotechnology. Zeikus JG, Johnson EA. (eds). New York: McGraw-Hill. Inc. pp. 39-68.
- Boulton RB, Singleton VL, Bisson LF, Kunkee RE. 1999. Principles and Practices of Winemaking. Springer Science & Business Media, 2013. 604 p.
- Blouin J, Peynaud É. 2003. Enología práctica conocimiento y elaboración del vino. 4a Edición. Madrid España: Editorial Mundi-prensa. 353 p.
- Cata del Vino. Blog del vino México (2014). Geografía de los vinos y bodegas en México. México, 2014. Disponible en: <http://www.catadelvino.com/blog-cata-vino/geografia-de-los-vinos-y-bodegas-en-mexico>. (Fecha de acceso: 12 de Noviembre de 2014).
- CBS- KNAW COLLECTIONS, Fungal Biodiversity Centre. (2007). Fungal & Yeast Collection. Disponible en: <http://www.cbs.knaw.nl/Collections/>. (Fecha de acceso: 9 de febrero de 2016).
- Ciani M, Picciotti G. 1995. The growth Kinetics and Fermentation behavior of some non-*Saccharomyces* yeast associated with winemaking. Biotechnology Letter. 17: 1247-1250.
- Collado, Q. 2001. Levaduras y la Fermentación Alcohólica (II). Disponible en: <http://www.verema.com/opinamos/tribuna/articulos/levaduras03.asp,12>. (Fecha de acceso: 12 Enero de 2016).
- Combina, M., Elía, A., Mercado, L., Catania, C., Ganga, A., & Martínez, C. 2005. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. International journal of food microbiology, 99(3): 237-243.
- Contreras C. y Ortega I. 2005. Bebidas y regiones. Historia e impacto de la cultura etílica en México. 1era ed. DF, México: Plaza y Valdés S.A. de C.V. 200 p.
- Clemente-Jiménez, JF, Mingorance-Cazorla L, Martínez-Rodríguez S, Las Heras-Vázquez, FJ, Rodríguez-Vic F. 2005. Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation. International Journal of Food Microbiology. 98(3): 301-308.
- Deák, T. 1992. Experiences with the Déak and Beuchat simplified identification scheme for food borne yeast. Modern methods in food mycology. Samson RA & cols. (eds). Amsterdam: Elsevier. pp 47-54.
- Degré, R. 1993. Selection and commercial cultivation of wine yeast and bacteria. Wine microbiology and biotechnology. Fleet GH. (ed). Switzerland: Harwood Academic publishers. pp 421-447.
- E.I., Euromonitor International (2013). Wine in Mexico. MarketLine Insustry profile. Disponible en: http://store.marketline.com/Product/mexico_wine?productid=MLIP1635-0014. (Fecha de acceso: 10 de noviembre de 2014).

- Esteve-Zarzoso BA., Gostíncar R, Bobet F, Uruburu F, Querol A. 2000. Selection and Molecular Characterization of wine yeast isolated from the “El penedes” area (Spain). *Food Microbiology*. 17(5): 553-562.
- Font Playán I, Pérez PG, Martínez AS. 2009. La industria vinícola mexicana y las políticas agroindustriales: Panorama general. 1era ed. México: Redpol (publicación electrónica). 30 p.
- Fleet GH. 1993. The microorganisms of winemaking— isolation, enumeration and identification. *Wine microbiology and biotechnology*, 1-25.
- Fleet GH, Heard G.M. 1993. Yeast growth during fermentation. *Wine Microbiology and Biotechnology*. Fleet GH. (ed). Switzerland: Harwood Academic Publishers, pp. 27-54.
- Fleet GH, Lafon-Lafourcade S, Ribéreau-Gayon, P. 1984. Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Applied Environmental Microbiology*. 48(5): 1034-1038.
- García J. 2011. *Enología avanzada*. Málaga, España: Editorial Vértice. 411 p.
- Granchi L, Ganucci D, Messini A, Rosellini D, Vincenzini M. 1998. Dynamics of yeast populations during the early stages of natural fermentations for the production of Brunello di Montalcino wines. *Food Technology and Biotechnology*. 36: 313-318.
- Gil M, García F, García P. 2009. *Hostelería el vino y su servicio*. Madrid España: Editorial Parainfo. 348 p.
- Henick-Kling T, Edinger W, Daniel P, Monk, P. 1998. Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. *Journal of Applied Microbiology*, 84(5):865-876.
- Hidalgo J. 2011. *Tratado de Enología Vol. I*. Madrid: Mundi-Prensa. 1823 p.
- Huang CJ, Lee SL, Chou CC. 2001. Production of 2-phenylethanol, a flavor ingredient, by *Pichia fermentans* L-5 under various culture conditions. *Food research international*, 34(4): 277-282.
- IICA-COFUFRO, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura- Coordinadora Nacional de Las Fundaciones Produce, A.C. (2010). *Modelo de la agricultura moderna en México en el Siglo XXI. Programa de documentación de casos de éxito*. Disponible en: <http://www.redinnovagro.in/casosexito/48sonorauvademesa.pdf>.
- INIFAP, Instituto Nacional de Investigadores Forestales, Agrícolas y Pecuarias (2010). *Seminario de Viticultura. Memoria Técnica # 29*. Disponible en: <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/handle/123456789/1685>. (Fecha de acceso: 12 de Noviembre de 2014).

- Jackson RS. 1994. Wine science: principles and, applications. 4ta ed. San Diego: Academic Press. 984 p.
- Jolly NP, Augustyn PH, Pretorius IS. 2003. The effect of non-Saccharomyces yeasts on fermentation and wine quality. *South African Journal of Enology and Viticulture* 24(2): 55-62.
- Jolly NP, Augustyn PH, Pretorius IS. 2006. The role and use of non-Saccharomyces yeasts in wine production. *South African Journal of Enology and Viticulture*. 27(1): 15.
- Kunkee RE, Amerine, M. 1970. Yeasts in winemaking. The Yeasts, Vol III. *Yeast Technology*. Rose AH, Harrison JS (eds). London: Academic Press. pp. 5-72.
- Lachance M. 1995. Yeast communities in natural tequila fermentation. *Journal of Antonie Van Leeuwenhoek*, 68(2): 151–160.
- Lafon-Lafourcade S, Larue F, Ribéreau-Gayon P. 1979. Evidence for the existence of "survival factors" as an explanation for some peculiarities of yeast growth, especially in grape must of high sugar concentration. *Applied Environmental Microbiology*. 38(6): 1069-1073.
- Lambrechts MG, Pretorius IS. 2000. Yeast and its importance to wine aroma. Review. *South African Journal of Enology and Viticulture*. 21(1): 97-129.
- Longo E, Cansado, J., Agrelo, D. y Villa, T.G., 1991. Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from northwest, Spain. *American Journal of Enology and Viticulture*. 42(2): 141-144.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J, Brock TD. 2000. *Biología de los microorganismos*. Decida ed. Madrid, España: Pearson Education/Prentice Hall. 986 p.
- Martínez, D. G., Armenta, C. A., Miranda B. J.L., Vergugo, Z. W., Moreno, F. C., Susarrey, G. J.G., Reralta, V. R. 2010. Ciclo Biológico y comportamiento agronómico de la vid en Cananea, Son., con base en el análisis del clima. Tomado de Memoria Técnica #29 de [INIFAP] Instituto Nacional de Investigadores Forestales, Agrícolas y Pecuarias. 2010. Seminario de Viticultura. 1^{ra} ed. Hermosillo, Sonora. pp 32-46.
- Mas A, Torija MJ, Beltrán G, Novo M, Hierro N, Poblet M, Guillamón JM. 2002. Selección de levaduras. *Tecnología del Vino*. pp 39-44.
- Mendoza M. 2005. Importancia de la identificación de levaduras. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 25(1): 15-23.
- Mesas JM, Alegre MT. 1999. El papel de los Microorganismos en la Elaboración del vino. *Ciencias Tecnológicas Alimentarias*. 2(4): 174- 183.

- Morais PB, Martins MB, Klaczko LB, Mendonça-Hagler LC, Hagler AN. 1995. Yeast succession in the Amazon fruit *Parahancornia amapa* as resource partitioning among *Drosophila* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(12): 4251-4257.
- Morais PB, Rosa B, Linardi, C, Pataro P, Maia C. 1997. Characterization and Succession of yeast populations associated with spontaneous fermentations during the production of Brazilian Sugar Cane Aguardente. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 13(2): 241–243.
- Navarre J. 1998. *L'oenologie*. 7ma ed. París, Francia: Editorial Lavoisier. 354 p.
- Núñez-Colín CA., Escobedo-López D. 2011. Uso correcto del análisis clúster en la caracterización de gemoplasma vegetal. *Agronomía Mesoamericana*. 22(2): 415-427.
- Orberá T. 2004. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Revista Iberoamericana Micología*. 21: 15-19.
- Ortiz Barrera, E. 2013. Aislamiento, selección e identificación de levaduras enológicas nativas no-*Saccharomyces* en viñedos establecidos en Querétaro. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Querétaro Facultad de Química. Santiago de Querétaro, Querétaro, México. 99 p.
- Pelczar M, Reid R, Chang E. 1985. *Microbiología General*. 4a ed., 2a ed. al español. México: Mc-Graw Hill. 952 p.
- Peña MA, Bruno C, Teich I, Fernández E, Balzarini M. 2010. Análisis de conglomerados en la identificación de estructura genética a partir de datos de marcadores moleculares. *Matemática y Estadística. Revista Científica tambaga*. 1(5): 225-237.
- Peynaud E. 1977. *Enología práctica*. Madrid, España: Editorial Mundi-prensa. 414 p.
- Prescott LM. 2002. *Microbiology*. 5ta ed. McGraw-Hill. 579 p.
- Pretorius I. 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*. 16(8): 675-729.
- Querol A, Jiménez M, Huerta T. 1990. A study on microbiological and enological parameters during fermentation musts from poor and normal grape-harvest in the region of Alicante (Spain). *Journal of Food Science*. 55(6): 114-122.
- Querol A, Barrio E, Ramón D. 1994. Population dynamics of wine yeast strains in natural fermentations. *International Journal of food Microbiology*. 83: 3-10.
- Querol A, Fernández-Espinar MT, del Olmo M, Barrio E. 2003. Adaptive evolution of wine yeast. *International Journal of Food Microbiology*. 86(1): 3–10.
- Radler F, Schütz H. 1982. Glycerol production of various strains of *Saccharomyces*. *American Journal of Enology and Viticulture*. 33(1): 36-40.

- Ribéreau-Gayon P, Dubourdieu D, Doneche B, Lonvaud A. 2000. Handbook of enology. The microbiology of wine and vitifications. Vol. I. 2da ed. England: John Wiley & Sons, 2006. 512 p.
- Rojas V, Gil JV, Piñaga F, Manzanares P. 2003. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *International Journal of Food Microbiology*. 86(1): 181-188.
- Romano P, Suzzi G, Comi G, Zironi R, Maifreni M. 1997. Glycerol and other fermentation products of apiculate wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*. 82(5): 615-618.
- Romano P, Fiore C, Paraggio M, Caruso M, Capece A. 2003. Function of yeast species and strains in wine flavor. *International Journal of food microbiology*, 86(1): 169-180.
- [SAGARPA] Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2005. Estudio de demanda de uva de mesa mexicana. Disponible en: http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios_promercado/ESTUDIO_UVA.pdf. (Fecha de acceso: 4 enero de 2015).
- Santamaría P, Garijo P, Tenorio C, López R, Gutiérrez AR. Presencia de levaduras autóctonas en bodegas que practican la inoculación reiterada con Levaduras Secas Activas. 2007. Disponible en línea: http://oiv2007.hu/documents/viniculture/130_comunicaci_n_pilar_santamar_a.pdf. (Fecha de acceso: 15 de noviembre del 2014).
- Scanes KT, Hohmann S, Prior BA. 1998. Glycerol production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its relevance to wine: a review. *South African Journal for Enology and Viticulture*. 19: 17-24.
- Salle AJ. 1965. Bacteriología. 2da ed. Barcelona: Gustavo Gili. 875 p.
- Susarrey JG, Moreno FC. 2010. Estudio Climatológico de la Región de Cananea para la implantación experimental de uva para vino. Tomado de Memoria Técnica # 29 de [INIFAP] Instituto Nacional de Investigadores Forestales, Agrícolas y Pecuarias. 2010. Seminario de Viticultura. 1^{ra} ed. Hermosillo, Sonora. pp 47-53.
- Sütterlin KA, Hoffmann-Boller P, Gafner J. 2004. Kurieren von Gärstockungen mit der fructophilen Weinhefe *Zygosaccharomyces bailii*. *Proceedings of the 7th International Symposium on Innovations in Enology*. Intervitis Interfructa Vol. 10. 2004 p.
- Terruños. 2006. Sumario. Edición Especial: El vino en Egipto. Boletín de la fundación para la cultura del vino. Madrid, España. Pp 4-7. Disponible en: <http://culturadelvino.org/fcv/wp-content/uploads/pdf/publicaciones/terrunos14.pdf> (Fecha de acceso: 10 de enero de 2015).

- Torija MJ, Rozes N, Poblet M, Guillamón JM, Mas A. 2001. Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie van Leeuwenhoek*, 79(3-4): 345-352.
- Torija, M. M. J., 2002. Ecología de levaduras: selección y adaptación a fermentaciones vínicas. Universitat Rovira I Virgili. Departament de Bioquímica i Biotecnologia. Facultat D'enologia. Tesis de Doctorado. Disponible en línea: <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/8643/Tesismjt.pdf?sequence=1>. (Fecha de acceso: 15 de Marzo de 2015).
- Van de Vyver S. 2007. Vinos Mexicanos y Vinícolas de México. Historia. Disponible en línea: <http://vinomex.homestead.com/historiaMisioneros.html>. (Fecha de acceso: 5 de diciembre de 2014).
- Van der Walt JP, Yarrow D. 1984. Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts. *The yeasts, a taxonomic study*. 45-104.
- Viticulture & Enology, (1880). Department of Viticulture and Enology. 1935. Available in: <http://wineserver.ucdavis.edu/>. (Date of access: February 9th 2016).
- Westhoff DC, Frazier WC. 1998. *Microbiología de los alimentos*. 4ta ed. Zaragoza (España): Acribia, S.A. 701 p.
- Zambonelli C. 1988. *I lieviti selezionati*. *Microbiología e biotecnología dei vini*. 3era ed. Bologna: Edagricole-New Business Media 2003. 275 p.
- Zamora Quiñonez KA. 2006. Caracterización Fenotípica de levaduras presentes Durante el proceso de fermentación del bacanora. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora México. 85 p.
- Zohre DE, Erten H. 2002. The influence of *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrima* yeasts on wine fermentation. *Process Biochemistry*, 38(3): 319-324.
- Zuzuarregui A. 2006. Caracterización fisiológica y molecular de cepas vínicas *Saccharomyces* sp. Influencia en su comportamiento durante la vinificación (Doctoral dissertation, Universitat de València). Disponible en línea: <http://www.tdx.cat/handle/10803/9527>. (Fecha de acceso: 11 de Marzo de 2015).