



Universidad Católica de Cuyo
Facultad Don Bosco de Enología y Ciencias
de la Alimentación

Licenciatura en Enología e Industrias
Frutihortícolas

Alumno: Mayores Darío

Docente Asesor: Penizzotto Alberto

Docente de Revisión Formal: Caliguli Elena

Rodeo del Medio, Mendoza 2024

Influencia de *Lachancea thermotolerans* en fermentación secuencial con *Saccharomyces cerevisiae* sobre el descenso del pH y aumento de la acidez total

Lugar y Fecha: Mendoza, Rodeo del Medio, mes y año

Defensa oral

Libro: _____ Folio N°: _____ Acta N°: _____

Fecha: _____

Calificación: _____

Firmas y Aclaración del Tribunal Examinador

Índice general

AGRADECIMIENTOS	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	10
MARCO TEÓRICO	
Las levaduras	12
.Morfología, organización celular y caracteres del genoma	14
.Pared celular	14
.Función de la pared	14
.Estructura química y composición	15
.Factores que afectan su composición	16
.Membrana plasmática	16
.Composición y función	16
.Citoplasma celular	18
.Mitocondria y demás organelas de importancia	18
.El núcleo	19
.Fenómeno killer	19
.Clasificación de especies más importantes en enología	22
.Ecología de las levaduras de la uva y del vino	24
.Metabolismo de los azúcares	26
.Glicólisis	27
.Fermentación alcohólica	31
.Fermentación gliceropirúvica	33
.Respiración celular	34
.Regulación de las vías metabólicas de los azúcares	36
.Regulación respiración – fermentación	36

.Acumulación de glicerina	37
.Productos secundarios a partir del piruvato	38
.Formación de ácido acético	38
.Degradación de ácido málico por la levadura	39
.Metabolismo de los compuestos nitrogenados	40
.Síntesis de aminoácidos	40
.Mecanismo de asimilación del catión amonio y los aminoácidos	40
.Catabolismo de los aminoácidos	43
.Fermentación alcohólica de los aminoácidos	43
.Lachancea thermotolerans	47
.Historia de la clasificación de especies de Lachancea	49
.Taxonomía, morfología y fisiología	49
.Aislamiento y bioquímica de especies de levadura Lachancea	53
.Hábitats naturales	53
.Potencial enológico	53
.Comportamiento durante la fermentación	54
.Producción de enzimas extracelulares	57
.Impacto sobre los parámetros analíticos	59
.Ácido láctico, acidez titulable y pH	59
.Ácido málico	60
.Ácido acético	61
.Etanol	62
.Compuestos aromáticos	62
.Antocianos y polifenoles en general	64
.Metabolismo del nitrógeno	64
.Polisacáridos y manoproteínas	65
.Influencia sensorial en el vino	66
.Glutatión	67
.Combinación con otros microorganismos en la tecnología del vino	68
.Saccharomyces cerevisiae	68

. Oenococcus oeni	70
.Acidez y pH	71
. Conceptos Preliminares	71
.pH	71
.Acidez	72
.Poder tampón	74
. Ácidos del mosto y del vino	75
.Ácidos preexistentes en el mosto	75
.Ácido tartárico	75
.Ácido málico	75
.Ácido cítrico	76
.Ácidos de neoformación	77
.Ácido succínico	77
.Ácido acético	77
.Ácido láctico	78
. Origen y fuentes de obtención del ácido láctico	78
. Propiedades fisicoquímicas del ácido láctico	80
. Estado de combinación de los ácidos orgánicos	83
.Demostración matemática	84
DESARROLLO METODOLÓGICO	
.Estudio comparativo y evaluativo de Lachancea thermotolerans	88
. Origen de la uva	89
. Características generales del viñedo	89
. Cosecha	90
. Estado de madurez al momento de cosecha	91
. Recepción de la materia prima	94
. Fermentación	95
. Fase postfermentativa	98
RESULTADOS	100

. Seguimiento de la fermentación alcohólica	101
. Conservación	108
. Interpretación del análisis químico	111
. Análisis organoléptico	116
. Evaluación de costos	119
CONCLUSIONES	122
ÍNDICE DE TABLAS	128
ÍNDICE DE FIGURAS	130
REFERENCIA	132

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a Dios, a la Virgen María Auxiliadora y a mi familia por la oportunidad que me brindaron al poder realizar mi sueño de ingresar a la facultad, así como también al secundario hace diez años atrás.

Agradezco a Don Bosco, que sin él nada de lo acontecido en mi vida en estos últimos años hubiera sido posible porque fue el fundador de todo lo que viví en la institución.

Doy gracias a todos los docentes que pasaron en esta formación, tanto a nivel primario, secundario y universitario que me han brindado las herramientas para salir al mundo laboral y poder comenzar una vida digna de ser vivida. Especialmente agradezco al profesor Alberto Penizzotto que aceptó ser guía y tutor de este trabajo final, quien me ha brindado todo su apoyo. Además, muchas personas me brindaron ayuda cuando lo necesitaba, sin intereses ofrecieron su granito de arena para que pueda formular este proyecto, todo suma y todo vale.

Por último, mis agradecimientos son a la Facultad Don Bosco, a sus directivos que en el proceso de transición de la carrera me ofrecieron gratuitamente ayuda de todo tipo (económica, emocional, profesional). Estaré eternamente agradecido de esto y lo llevaré siempre en el corazón.

Resumen

Con un calentamiento global cada vez más acelerado, los enólogos buscan contrarrestar la velocidad de la respiración de las plantas y por consiguiente los productos obtenidos de mencionado fenómeno, caracterizados por una acidez cada vez más pobre. El objetivo de este proyecto es mostrar y comprobar a la bioacidificación como alternativa para acidificar y modificar el pH de los mostos y/o vinos; así mismo poder comparar diferentes formas de vinificación y realizar una evaluación práctica-económica, tan necesaria de apreciar en estos tiempos actuales.

La levadura *Lachancea thermotolerans* se vende en el mercado como un método eficaz de acidificación aportando no solo este beneficio sino también otros parámetros organolépticos importantes en los vinos, tales como frescura, aromas secundarios, menor grado alcohólico como tendencia mundial y complejidad en boca.

Dicho trabajo se basó en realizar vinificaciones comparativas con y sin el uso de esta levadura para poder evaluar resultados y verificar el descenso de pH y aumento de acidez.

Palabras clave: *Lachancea thermotolerans*, bioacidificación, pH, acidez.

Abstract

With an increasingly accelerated global warming, winemakers are seeking to counteract the speed of plant respiration and, consequently, the products obtained from this phenomenon, characterized by a progressively poorer acidity. The objective of this project is to demonstrate and verify bioacidification as an alternative to acidify and modify the pH of musts and/or wines; likewise, to compare different vinification methods and conduct a practical-economic evaluation, which is essential to appreciate in current times.

The yeast *Lachancea thermotolerans* is marketed as an effective acidification method, providing not only this benefit but also other important organoleptic parameters in wines, such as freshness, secondary aromas, lower alcohol content as a global trend, and complexity on the palate.

This work was based on carrying out comparative vinifications with and without the use of this yeast to evaluate the results and verify the decrease in pH and increase in acidity.

Keywords: *Lachancea thermotolerans*, bioacidification, pH, acidity.

Introducción

Se conoce en la actualidad el aumento de la temperatura media en la tierra, el incremento del nivel de los mares y la pérdida no menor de los glaciares, en consecuencia, del calentamiento global en todo el planeta.

La ONU (Organización de las Naciones Unidas) mediante un grupo de científicos afirmó que para el año 2066, el agujero de la capa de ozono será reconstituido en gran parte, esto es muy favorable para frenar a este calentamiento del que hablamos, debemos seguir trabajando para que esto realmente ocurra. Mientras tanto, en la enología muchos profesionales se enfrentan a varios problemas enológicos por la falta de acidez en las uvas. Este calentamiento de la tierra exagerado provoca una disminución importante en el tenor ácido de la uva, y en consecuencia la predisposición de los futuros vinos a sufrir inestabilidad microbiológica. Los enólogos deben tener diversas herramientas para solucionar este inconveniente, entre ellas, la aplicación de ácidos orgánicos, el uso de resinas intercambiadoras de iones, cortes con variedades agraces y adición de importantes cantidades de anhídrido sulfuroso (SO_2), entre otras operaciones que son bastante costosas de por sí.

En este estudio se tratará de contrarrestar estos problemas enológicos, analizando la influencia de una levadura específica, de tipo no *Saccharomyces*, conocida en la actualidad como *Lachancea thermotolerans*. Se trata de una levadura muy productora de ácido láctico durante la fermentación alcohólica y de aquí nace la importancia de aplicarla en nuestros medios, sobre todo, en las zonas más cálidas del hemisferio sur, donde los suelos y el clima especialmente, ejercen una importantísima influencia sobre la falta de acidez en las uvas.

El propósito es observar cómo se comporta la levadura *L. thermotolerans* aplicada en uvas características de zonas cálidas y suelos pobres, que otorgan vinos de escasa acidez y altos pH. Evaluar dicha vinificación de forma comparativa con vinificaciones tradicionales

con levaduras indígenas (aplicando un pie de cuba) y con inoculación de levaduras del género *Saccharomyces*.

Se presentarán los resultados de los parámetros analíticos como los organolépticos en el avance de la investigación. Para ello se realizarán los análisis organolépticos y analíticos durante todo el proceso de elaboración del vino y se hará una comparación entre los ensayos que contengan a *L. thermotolerans* y los que no contienen.

Las levaduras

Se conoce desde hace mucho tiempo que las levaduras han transformado el mosto en vino, pero hasta el día de hoy, estos seres microscópicos nos siguen aportando cualidades y características distintas de las cuales debemos prestarles la atención que se merecen.

A partir del año 1837, Charles Cagnard demostró que la levadura es un organismo vivo, capaz de multiplicarse y cuya actividad vital se encontraba en las sustancias azucaradas (Pascal Ribéreau-Gayon 2003, Tratado de Enología, Tomo I: Microbiología del vino. Vinificaciones, Editorial hemisferio sur S.A). Así se nombró a la levadura como “hongo del azúcar”.

La “vida” del vino surge de diversos procesos metabólicos que ocurren dentro de estos seres microscópicos. Varios científicos discutieron este asunto por muchos años a través de dos teorías bien diferenciadas (teoría química y teoría vitalista) hasta que entre los años 1866 y 1876, Luis Pasteur con sus dos obras (“Estudios sobre le vino” y “Estudios sobre la cerveza”) respectivamente, pudo darle una unión o sentido a estas dos teorías afirmando que no existe vino sin levadura, pero que sin embargo dentro de las levaduras ocurren una gran cantidad de transformaciones químicas necesarias para dicho proceso.

Este excelente microbiólogo no solamente se quedó en eso sino que también pudo demostrar que la “fermentación” es la consecuencia de la vida sin aire, y que la levadura es un componente indispensable en las características del vino a obtener. Pudo comprobar que las levaduras responsables de dicha transformación provenían del ambiente y que se depositaban sobre las pieles de las uvas. De allí se deduce que estos seres son tan complejos que influyen en la matriz del vino de manera considerable.

Biológicamente las levaduras son células eucariotas y hongos unicelulares y dentro de estos son los seres más simples. Las levaduras normalmente pertenecen a los Ascomicetos,

también pueden pertenecer a los Basidiomicetos u Hongos imperfectos, pero las del vino solo son Ascomicetos en general. Los Ascomicetos son un tipo de hongo que esporulan en forma de “ascosporas”, quiere decir que las esporas se encuentran dentro de sacos formados a partir de una célula vegetativa.

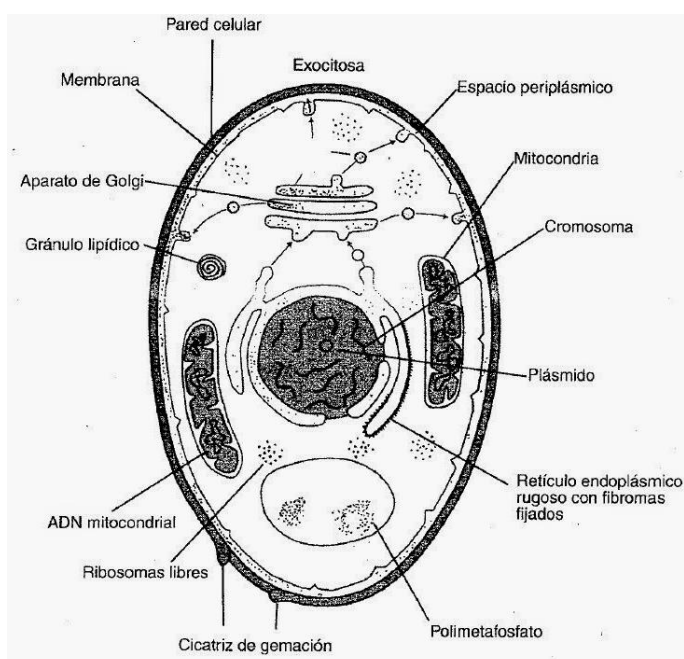
Las levaduras son de forma oval, esféricas o semiesféricas, y bajo ciertas condiciones pueden formar filamentos como las del género *Candida*. Se reproducen principalmente por gemación o reproducción asexual y algunas se pueden reproducir también por conjugación o reproducción sexual.

La gemación consiste en que la célula madre forma un pequeño “bulbo” que crece hasta separarse de ella. En la conjugación, se fusionan dos células y de ellas resulta un cigoto verdadero y de él surgen esporas sexuales por reducción meiótica.

A continuación, se representa un esquema general del interior de una levadura:

Figura 1

Célula de una levadura



Nota. Imagen esquematizada según Pascal Ribéreau-Gayon y Gaillardin-Heslot (2003), Tratado de Enología, Tomo I: Microbiología del vino. Vinificaciones, Editorial hemisferio sur S.A

Como se observa en la figura 1, la levadura tiene dos envolturas celulares, una es la pared celular y la otra la membrana plasmática, entre medio de las dos se encuentra el espacio periplasmático o periplasma. El conjunto o relación entre el citoplasma y membrana plasmática se lo denomina protoplasma.

Es muy importante que se conozcan todas las organelas de la levadura para conocer el funcionamiento de la misma como una verdadera “máquina” como lo es toda célula.

En este capítulo se desarrollarán todas las consideraciones de importancia enológica para el estudio de este gran grupo de seres que son las levaduras para tener una referencia o guía en el desarrollo de la investigación.

Morfología, organización celular y caracteres del genoma

A continuación se dará lugar a explicar a cada una de las organelas de importancia enológica.

Pared celular

La pared celular es una envoltura resistente y externa a la célula que representa entre el 15 y 25% del peso seco de la misma, es rígida, pero tiene una cierta elasticidad.

Función de la pared celular. La principal función de la misma es la de protección a la célula, sin pared la misma estaría sometida a impulsos de la presión osmótica interna dada por la composición del medio y por lo tanto la levadura colocada en agua pura sería inmediatamente disuelta por la misma.

No está muerta, todo lo contrario, está viva y es dinámica y multifuncional para la célula. Además de su rol de protección, también le da la forma a la célula, es el asiento o lugar donde se dan diversas interacciones como la floculación, el factor killer y la unión celular. En ella se encuentran una diversa cantidad de componentes químicos con funciones muy específicas como por ejemplo enzimas celulares y proteínas transportadoras.

Estructura química y composición. Está formada por dos polímeros en mayor cantidad, los betaglucanos y las manoproteínas, y en menor proporción la quitina.

Los glucanos representan el 60% del peso seco de la pared celular. Se distinguen en la pared tres tipos distintos de glucanos con enlaces β 1,3 o β 1,6 cada uno con funciones específicas: Un β 1,3 glucano ejerce la función de forma y resistencia a la pared (rigidez), otro β 1,3 glucano ejerce la función elástica y el anclaje a las manoproteínas y por último el β 1,6 glucano sirve de unión entre los diferentes constituyentes de la pared y sitio receptor del factor killer.

Las manoproteínas constituyen del 25 al 50% del peso seco de la pared, tienen masas moleculares muy altas comprendidas entre 20.000 y 450.000 Da. Químicamente presentan una parte proteica y otra glucídica. Tiene grados de glicosilación variados pero algunas presentan un 90% de manosa (monosacárido) y 10% de péptidos (parte proteica). Lo más importante de estas cabe en la capacidad que tengan de separarse de la pared y disolverse en el medio, son importantes las cualidades que le dan al vino, sobre todo de cuerpo y función de coloide protector.

La pared no contiene sustancias lipídicas, pero en la presencia de estas puede absorberlas, y según sean los ácidos grasos saturados o no, pueden ejercer efecto positivo o negativo en la fermentación alcohólica. Los ácidos grasos insaturados siempre serán preferibles.

Las enzimas están presentes en la pared o bien en el espacio periplasmático, las más abundantes son las siguientes: fructofuranosidasa (cataliza la hidrólisis de la sacarosa), β glucosidasa o alfa galactosidasa, melibiasa, trihalasa, aminopeptidasa, estearasa y también endo y exo β glucanasas de tipo 1,3 y 1,6. Estas últimas están asociadas a las modificaciones de la pared durante el crecimiento y brotación y además en la autodisolución de la pared de las levaduras durante la conservación de los vinos en borras.

Factores que afectan su composición. El factor que más influye en la composición química de la pared celular es la nutrición, aunque también la edad de las células. La cantidad de glucano aumenta con la proporción de azúcares en el medio.

Carencia de mesoinositol provoca la disminución de manoproteínas y el aumento de glucanos. Las células viejas son menos ricas en manoproteínas que las jóvenes y por finalizar, la conjugación y esporulación influye también en la composición.

Membrana plasmática

También conocida como membrana celular, es una capa que junto con la pared celular delimitan a la célula con el medio exterior.

Composición y función. Es una barrera selectiva que participa de todos los intercambios de sustancias químicas entre el medio exterior y la célula. Está constituida por lípidos (40%) y proteínas (50%) y el resto son glucanos y mananos.

Los lípidos presentes son complejos (fosfolípidos) y esteroides. Con respecto a los fosfolípidos, los de la levadura son glicerofosfolípidos (los ácidos grasos que esterifican al glicerol pueden ser saturados e insaturados). Son tensioactivos, esto quiere decir que presentan una parte polar (cabeza polar) y otra no polar (cola no polar). Esta propiedad anfifílica hace que se forme una doble capa lipídica en la membrana y de allí todas sus propiedades.

El principal esteroles más común en la membrana celular es el ergosterol, aunque también se encuentra el dehidroergosterol y el zosterol en pequeñas concentraciones. Son sintetizados en las mitocondrias en aerobiosis durante la fase de crecimiento de las levaduras.

También, en la membrana plasmática se encuentra todo el complejo proteínico que desarrolla varias funciones dentro de la misma. Estas proteínas pueden ser intrínsecas (atravesan la membrana e interactúan con la parte no polar de la doble capa lipídica) o extrínsecas (están ligadas a las precedentes por puentes de hidrógeno). Las más importantes y más estudiadas son: ATPasa (trifosfato de adenosina) encargada de la hidrólisis del ATP y la producción de energía necesaria para el transporte activo, otras proteínas transportadoras de soluciones (azúcares y aminoácidos) y proteínas encargadas de sintetizar glucanos y quitina para las paredes.

Otra característica importante de la membrana es la fluidez de la misma y la no compactación. Esto se produce gracias a la presencia de ciertos ácidos grasos y los esteroides, es importante que la membrana sea fluida para los procesos difusionales entre el exterior y la célula.

La principal función de la membrana es la de constituir una capa hidrófoba estable entre el citoplasma y el medio, brindando impermeabilidad a diversas sustancias. También controla todo el intercambio y con respecto a esto es importante la presencia de ácidos grasos insaturados en los fosfolípidos de la membrana para favorecer la penetración y acumulación de aminoácidos en la célula. La síntesis de ácidos grasos insaturados es en presencia de oxígeno y de ahí radica la importancia del mismo en los primeros estadios de la curva de crecimiento y en los últimos también, ya que la presencia de estos en fase estacionaria y de declinación fomentan el ingreso de glucosa a la célula. Por lo tanto, la aireación es

sumamente importante, ya que se necesitan como mínimo un millón de células vivas por mililitro para tener una fermentación completa y segura.

Como ya se mencionó, otra función es la síntesis de glucanos y quitina.

Citoplasma celular

Es el soporte o “suelo” de todas las organelas de la célula, está limitado por la membrana nuclear y la membrana plasmática. La sustancia citoplasmática de base es el citosol, se trata de una solución tamponada en un pH de 5 a 6 que contiene enzimas solubles, glucógeno (sustancia de reserva principal de la levadura) y ribosomas. Las enzimas son las de la glicólisis y fermentación alcohólica.

Mitocondria y demás organelas de importancia. Se conoce que las organelas contenidas en el citoplasma celular de la célula eucariota son: retículo endoplasmático liso, retículo endoplasmático rugoso, aparato de Golgi, vacuolas, etc.

Es necesario profundizar sobre la mitocondria ya que en esta misma se dan todos los procesos de intercambio de energía que son objeto de nuestro estudio.

Las mitocondrias están repartidas en la periferia del citoplasma, poseen forma de bastón y están rodeadas por dos membranas. En presencia de oxígeno las levaduras contienen varias mitocondrias y en ausencia del mismo se van degenerando (recordar que la levadura es un microorganismo anaerobio facultativo y que adapta su organismo de acuerdo a las circunstancias). En medios azucarados (exceso de azúcares), incluso con aireación, la gran cantidad de azúcar provoca la represión de la síntesis de enzimas respiratorias y por lo tanto la mitocondria pierde la función, a este fenómeno se lo conoce como “represión catabólica de la glucosa”.

El núcleo

Por ser célula eucariota el núcleo no se encuentra disperso en el citoplasma sino que está en una posición específica rodeado de una membrana nuclear, el ADN (ácido desoxirribonucleico) se encuentra establecido en los cromosomas verdaderos, cada uno de estos presenta una sola molécula de ADN con su doble cadena. Los cromosomas de la levadura no son visibles al microscopio.

Fenómeno killer

Se define como fenómeno killer a la capacidad que tienen ciertas levaduras de excretar al medio sustancias tóxicas de naturaleza glicoproteica (10% proteínas y 90% polisacáridos) que destruyen a otras levaduras que son sensibles a la misma. Este efecto fue descubierto en *Saccharomyces cerevisiae* pero también lo poseen otros géneros dentro de los ascomicetos como pueden ser *Kloeckera*, *Hanseniospora*, *Pichia*, *Torulopsis*, entre otras. Este efecto fue descubierto por Markower y Bevan en el año 1963.

Esta actividad killer es importante durante el proceso productivo para que el mismo no se desvíe con respecto a la fermentación alcohólica, por lo tanto la inoculación con cepas que tengan este potencial es un paso importante a destacar en la elaboración de vinos.

Según las características genéticas de las levaduras las podemos clasificar en cuatro grupos:

. Killer (K): Son aquellas que secretan la toxina al medio, y son resistentes a la misma. Pueden morir por otras toxinas generadas.

. Neutras (N): Son aquellas que no secretan la toxina al medio y que resisten diferentes tipos de toxinas.

. Sensibles (S): Son las que mueren por la presencia de toxinas, y nunca las secretan al medio.

. Suicida (s): Mueren bajo la acción de su propia toxina excretada.

Existen diferentes espectros de actividad y resistencia dentro de cada fenotipo, según Young y Yagia, en donde se diferencian 11 niveles de actividad killer (K1 - K11), siendo el K1 el más fuerte y decreciendo la actividad hasta el K11. Con respecto a los grados de resistencia de las cepas sensibles también son once niveles desde el "Ra" hasta el "Rk".

Se han encontrado en las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* tres actividades killer conocidas como K1, K2, K3. La segunda es la más expandida en las cepas halladas en el vino (Pascal Ribéreau-Gayon 2003, Tratado de Enología, Tomo I: Microbiología del vino. Vinificaciones, Editorial hemisferio sur S.A).

Esto se debe a que la toxina K1 es una proteína de poca masa molecular y es estable en el rango de pH (4,2 – 4,6) y por tanto no activa en las condiciones del vino. En cambio, la toxina K2 es una glicoproteína que es estable en un rango de pH comprendido entre 2,8 y 4,8, y por ende si es activa en el pH normal de los mostos y vinos.

Las toxinas son liberadas del citoplasma celular y una vez excretada al medio actúan uniéndose a receptores conocidos como β 1,6 glucanos y por lo tanto desorganizando a la membrana plasmática de las levaduras sensibles y provocando poros en la misma. Esto conlleva a un sin número de desórdenes fisiológicos en la levadura provocando la muerte en un tiempo de dos horas. La toxina killer es un problema para las levaduras sensibles que se encuentran en estado de crecimiento (según la curva de crecimiento normal de estos microorganismos) y no en las células que tienen ya un estado estacionario, esto se debe a que la célula debe gastar energía para movilizar a la toxina.

Los efectos adversos que provoca a la célula sensible son los siguientes: altera los receptores de hidrogeniones de la membrana celular, inhibe la síntesis de ATP variando el pH intracelular de 6,5 a 5,1, provoca la pérdida de iones de potasio en el interior celular por generar un aumento del tamaño de los poros de la célula y esto a su vez conlleva al cambio de permeabilidad de la membrana celular afectando al traspaso de nutrientes que se seleccionan normalmente.

Los factores que pueden inactivar a la toxina son los mencionados a continuación:

pH: Cuando el mismo es inferior a 2,90 no se detecta la actividad.

Temperatura: Cuando son superiores a 30°C se inactiva la misma por su parte proteica. Las temperaturas por debajo de los 5°C también la inactivan. La temperatura óptima de actividad es a 20°C.

SO₂: Por encima de las 100 ppm es capaz de inactivarla.

Bentonita: Es lógico que debido a su naturaleza proteica va a coagular con el agregado de la misma.

Etanol: A medida que aumenta el nivel del mismo disminuye la sensibilidad de las células receptoras.

Enzimas proteolíticas: Destruyen la parte proteica y por lo tanto inactivan a las mismas.

Radiaciones UV: Afectan la estructura conformacional alterando su acción por lo tanto.

El SO₂ y el etanol no afectan a la actividad killer en gran medida, pero si el calor, polifenoles y bentonita (debido a su parte proteica).

Clasificación de especies más importantes en enología

Se conoce desde hace mucho tiempo la cantidad de géneros de levaduras presentes en la naturaleza. Como se mencionó anteriormente, estas pueden pertenecer tanto a los Ascomicetos, Basidiomicetos u Hongos Imperfectos o Deuteromicetos, y se han encontrado más de 80 géneros y 600 especies. En la uva y el vino, sólo se han encontrado alrededor de 15 géneros. A continuación se presentan gráficamente:

Tabla 1

Géneros y especies de levaduras relacionadas con la uva y el vino, y hábitat donde se han encontrado

Género	Especies y/o Denominaciones antiguas	Denominación actual según: Kreger van Rij, 1984; Barnett, 1992; Martini, 1993 & Fell, 1998	Hábitat o adaptaciones
<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	<i>cerevisiae</i>	Mayor resistencia a anaerobiosis y alcohol
	<i>beticus</i>	<i>cerevisiae</i>	
	<i>capensis</i>	<i>cerevisiae</i>	
	<i>chevalieri</i>	<i>cerevisiae</i>	Capacidad para terminar la vinificación
	<i>ellipsoidens</i>	<i>cerevisiae</i>	
	<i>oviformis</i>	<i>cerevisiae</i>	
	<i>bayanus</i>	<i>bayanus</i>	
	<i>uvarum</i>	<i>bayanus</i>	
	<i>fermentati</i>	<i>torulaspora delbrueckii</i>	
<i>rosei</i>	<i>torulaspora delbrueckii</i>		
<i>Hanseniaspora</i>	<i>uvarum</i>		Apiculada típica de las cáscaras de uva en la viña
<i>Kloeckera</i>	<i>apiculata</i>		Apiculada, forma anamorfa de <i>Hanseniaspora</i>
<i>Hansenula</i>	<i>anomala kluyveri</i>	<i>pichia anomala</i>	En cáscaras de uvas y con aireación. Aumenta población en mostos aireados
		<i>pichia kluyveri</i>	
<i>Pichia</i>	<i>kluyveri</i>		En cáscaras de uvas. Pueden formar flor en vino
	<i>membranofaciens</i>		
<i>Candida guilliermondii</i>	<i>guilliermondii</i>		En mostos aireados, inicio de fermentación
	<i>krusei</i>		
	<i>stellata</i>		
<i>Cryptococcus</i>	<i>albidus</i>		En uvas
<i>Debaromyces</i>	<i>hansenii</i>		En uvas
<i>Brettanomyces</i>	<i>anomalous</i>		Típicos contaminantes de vinos en barricas y en bodega
	<i>bruxellensis</i>		
	<i>intermedius</i>	<i>brettanomyces bruxellensis</i>	
<i>Dekkera</i>	<i>anomala</i>		Anamorfa de <i>Brettanomyces</i> . También contaminante
	<i>bruxellensis</i>		
<i>Kluyveromyces</i>	<i>marxianus</i>		Buena fermentadora
	<i>thermotolerans</i>		
<i>Metschnikowia</i>	<i>pulcherrima</i>		En uvas
<i>Rhodotorula</i>	<i>glutinis</i>		En uvas
<i>Saccharomycodes</i>	<i>ludwigii</i>		En uvas
<i>Schizosaccharomyces</i>	<i>pombe</i>		Fermentan el ácido málico a alcohol. Desacidificación
	<i>japonicus</i>		
<i>Torulaspora</i>	<i>delbrueckii</i>		Osmotolerantes. Ideales para vinos muy dulces
<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>bailii</i>		Contaminantes de jugos y vinos. Resisten a varios conservantes
	<i>florentinus</i>		
	<i>bisporus</i>		
	<i>rouxii</i>		

Nota. Viramontes Álvarez, R. Levaduras vínicas. Recuperado de (https://www.acenologia.com/levaduras_vinicas/)

En referencia a la tabla 1 se puede observar que encontramos a los géneros *Zygosaccharomyces*, *Kluyveromyces* y *Saccharomyces*, a los cuales pertenecía anteriormente la levadura *Lachancea thermotolerans* la cual es objeto de nuestro estudio.

En lo que respecta al origen del vino, las levaduras fermentativas han ido siendo clasificadas a lo largo de la historia de diversas maneras. Como conclusión a todo este trabajo realizado por diversos científicos, las dos levaduras de mayor interés enológico son: *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces bayanus* (antes era considerada como *oviformis*). Difieren por la capacidad de resistencia al etanol (es mayor en *S. bayanus*) y por la capacidad de asimilar los nutrientes (factores de crecimiento), así también se observa que *S. cerevisiae* si es capaz de fermentar la galactosa a diferencia de *S. bayanus* que no es capaz. Aunque dividamos a estas dos especies son muy similares genotípicamente pero a lo largo de los años se han podido obtener diferencias que permitan poder diferenciarlas.

Ecología de las levaduras de la uva y del vino

Las levaduras están distribuidas en la naturaleza en formas muy diversas, están en el suelo, en los vegetales, en el aparato digestivo de los animales, etc. Se difunden de un lugar a otro a través de los insectos y del movimiento del aire.

En la vid se encuentran poco distribuidas en las hojas y en las bayas verdes, van colonizando poco a poco las bayas en maduración y sobre todo en las zonas donde hay grietas o exudaciones (al igual que lo hacen las bacterias y los hongos).

Según Pascal Ribéreau-Gayon en su Tratado de Enología, en una baya antes de su cosecha se encuentran una cantidad de levaduras correspondida entre 1000 y 100000 células. La cantidad de levaduras en la uva va a depender de factores climáticos, variedad de uva, época de cosecha, etc.

Una vez la uva descobajada, molida y prensada se pueden formar más de un millón de células vivas por mililitro de mosto. Este último número es muy importante ya que en estas condiciones comienza a haber fermentación alcohólica regular y por ello es importante el agregado oportuno del anhídrido sulfuroso que ejerce su función de selección entre

levaduras y entre levaduras y bacterias evitando de esta forma que se altere la flora microbiana del medio y se reproduzcan microorganismos indeseables.

De todas las especies encontradas en la uva es muy poca la cantidad encontrada de *S. cerevisiae* y *S. bayanus* y muy alta la cantidad de levaduras apiculadas, pero se conoce que a partir de un cierto porcentaje de alcohol ya en fermentación (a partir de un grado de etanol v/v generalmente) el dominio total es generado por *S. cerevisiae*. Estas levaduras se encuentran en cantidad en los utensilios, vasijas y zonas de la bodega, por ello es que pasan de una temporada a la otra.

Gracias al dominio natural ejercido por *S. cerevisiae* no es probable encontrar a otros géneros de levaduras a partir de las últimas fases de fermentación, si llega a ver crecimiento levaduriano se deberá principalmente a levaduras que producen enfermedades en los vinos o defectos (como por ejemplo *Brettanomyces*, levaduras responsables de las flores del vino o también la presencia de *Saccharomyces ludwigii*). Este dominio dependerá principalmente de ciertos factores como la concentración de azúcar, las cantidades crecientes de etanol, la aplicación de SO_2 , el pH del medio y la anaerobiosis.

S. cerevisiae tiene la capacidad de colonizar a la bodega y por lo tanto los comienzos de fermentaciones incipientes pueden ser peligrosos y explosivos vendimia tras vendimia, de aquí surge la importancia de la desinfección y limpieza de la bodega como un primer paso para el inicio de temporada antes de recibir la vendimia.

“En la mayoría de las situaciones estudiadas las fermentaciones espontáneas de la vendimia de uvas tintas o en los vinos blancos secos, es realizada por un pequeño número de cepas mayoritarias que representan el 70 u 80% de colonias aisladas” (Pascal Ribéreau-Gayon 2003, Tratado de Enología, Tomo I: Microbiología del vino. Vinificaciones, Editorial hemisferio sur S.A). Esta afirmación es claramente muy variable según las condiciones

climáticas de cada lugar de vinificación, sin embargo las experiencias demuestran que en la gran mayoría de las fermentaciones espontáneas, *S. cerevisiae* predomina fuertemente el medio, aunque de esta coexisten varias cepas. De las características de las cepas que estén fermentando dependerá las cualidades del vino obtenido, que año tras año estas mismas cepas van cambiando en el terruño y por lo tanto en las bodegas también. Si bien existen cepas más resistentes a las condiciones que otras, como profesionales no es recomendable realizar fermentaciones espontáneas (por más que predomine *S. cerevisiae*) ya que cada vendimia viene con cepas distintas las cuales no conocemos sus características y se corren riesgos de desvíos de fermentación, altas producciones de ácidos volátiles y no agotamiento de los azúcares comprometiendo la calidad del vino.

Es por todo esto, que el uso de LSA (levaduras secas activas) es indispensable para la estandarización de la producción, lo cual este trabajo tratará con delicadeza la implicancia de *Lachancea thermotolerans* en los próximos capítulos.

Metabolismo de los azúcares

Las levaduras son organismos quimiorganotrofos, esto quiere decir que obtienen la energía para todos sus procesos vitales a partir de la materia orgánica.

Así como los demás organismos vivos, estos seres microscópicos desarrollan en su interior reacciones catabólicas y anabólicas.

La levadura contiene la capacidad de producir ATP (“combustible de los seres vivos”) mediante dos maneras: fosforilación a nivel sustrato o fosforilación oxidativa.

La fosforilación a nivel sustrato puede ser aerobia o anaerobia. Consiste en una oxidación por pérdida de electrones formándose un enlace fosfoéster entre un sustrato

carbonado y fosfato mineral y luego se genera una rotura del enlace formándose ATP a partir de ADP (esto ocurre en la glicólisis).

La fosforilación oxidativa se desarrolla mediante un transporte de electrones en una cadena respiratoria en condiciones aeróbicas en la mitocondria celular (respiración celular). El oxígeno es totalmente necesario ya que es el aceptor final de los electrones. Este mecanismo es mayor productor de energía (ATP) que la fosforilación a nivel sustrato.

Tanto en aerobiosis como en anaerobiosis la levadura comenzará la degradación con la glicólisis. En aerobiosis precede a la misma la respiración celular y en anaerobiosis la fermentación alcohólica.

Glicólisis

La glicólisis es un conjunto de reacciones químicas que consiste en degradar a los azúcares (especialmente glucosa) en ácido pirúvico con formación de energía (ATP).

Estas reacciones químicas son llevadas a cabo por una serie de enzimas que están presentes en la levadura y se conoce a este pool enzimático como “zimasa alcohólica”. Una enzima es un catalizador biológico, es decir un acelerador de reacciones químicas bajando la energía de activación en la formación del complejo activado, están presentes en los organismos vivos para que las reacciones normales al metabolismo se lleven a cabo a temperaturas moderadas en el planeta.

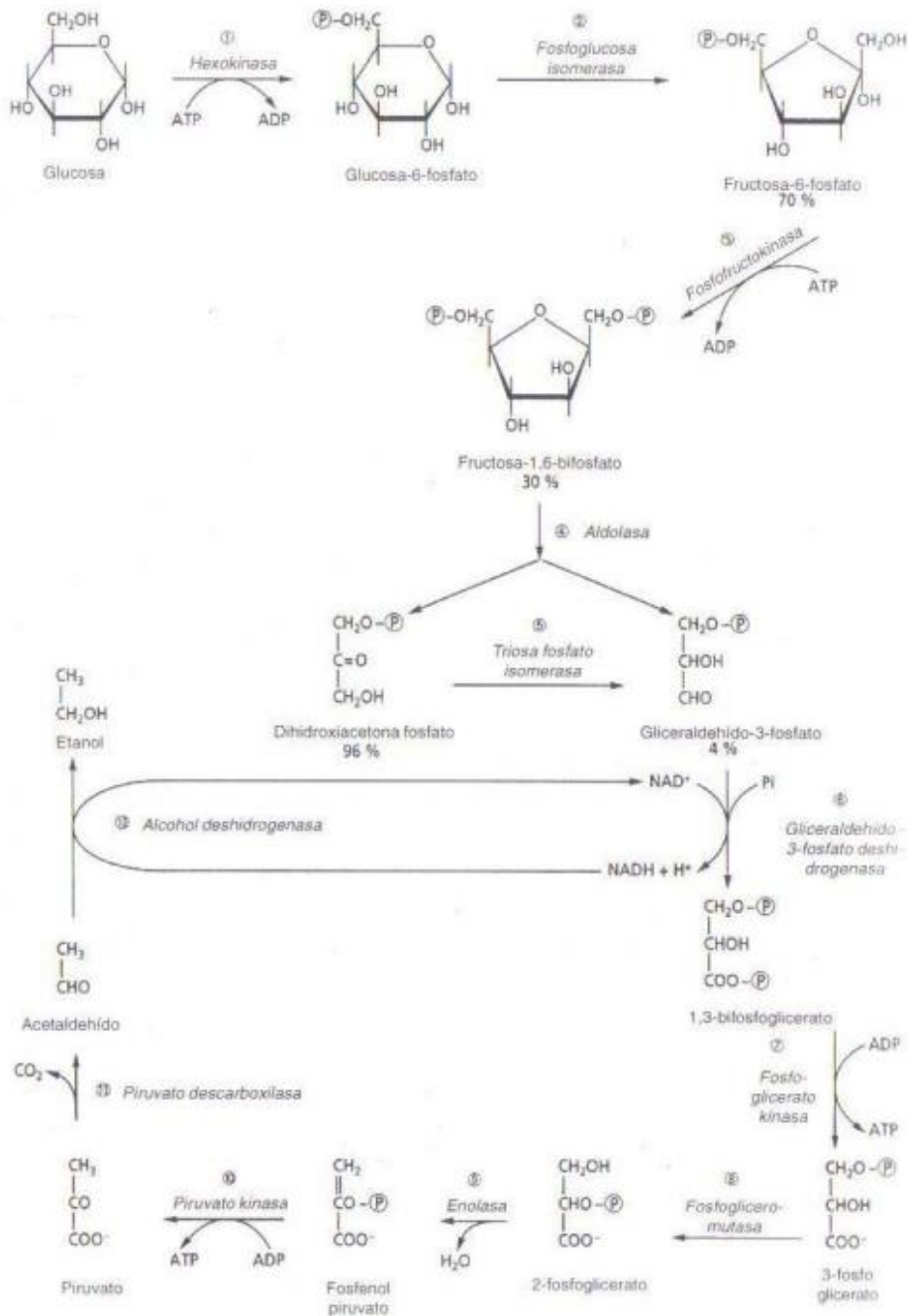
Para que la glucosa y fructosa, que son los principales azúcares simples del mosto, ingresen a la célula por la membrana plasmática, se pone en práctica un conjunto de proteínas transportadoras. El movimiento de las mismas se da por diferencia de concentración entre el medio exterior a la célula y el interior, no es por transporte activo. Estos azúcares ingresan al

citoplasma donde son metabolizados rápidamente y la glicólisis se efectúa luego enteramente en el citosol de la célula.

A continuación se expresa el quimismo de la glicólisis:

Figura 2

Quimismo de la glicólisis y fermentación alcohólica (últimos dos pasos) extraído de Pascal Riberau – Gayon en su Tratado de Enología

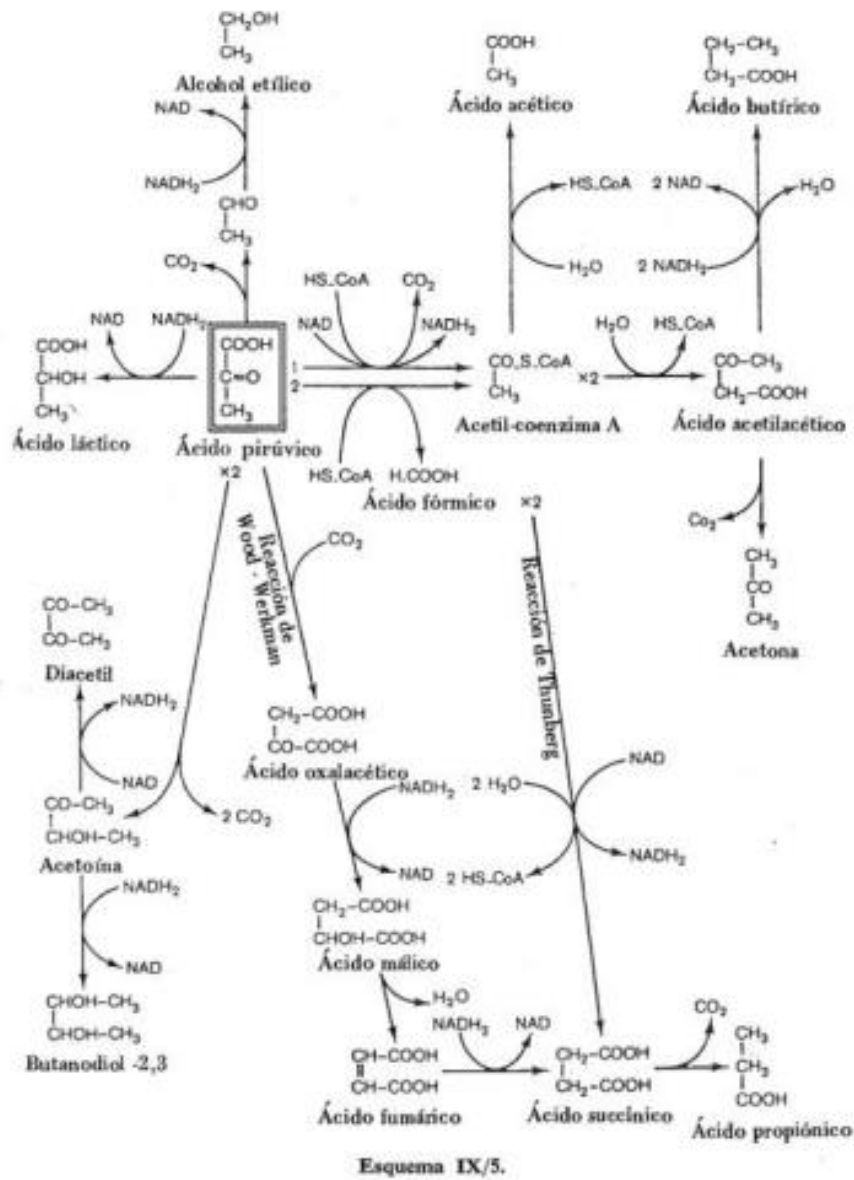


Si se sigue el camino del quimismo de la glicolisis, se puede observar la formación de cuatro moléculas de ATP, pero dos de ella son gastadas para activar una nueva molécula de hexosa, por lo tanto la ganancia neta de energía son solo dos moléculas de ATP por cada molécula de hexosa degradada.

Una vez formado el intermediario de importancia de muchos de los procesos metabólicos (ácido pirúvico), la ruta metabólica se puede diferenciar en: respiración, fermentación alcohólica y la fermentación láctica (muy importante para nuestro trabajo de investigación). También se pueden desarrollar una serie de compuestos no deseables en el plano organoléptico a los cuales nosotros llamamos “compuestos secundarios”. A continuación en la figura 3 se muestran todos los compuestos que se pueden llegar a formar a partir del ácido pirúvico. Entre estos se encuentra también incluido al ácido láctico que es uno de los pocos que sí contiene buenas propiedades tanto fisicoquímicas como organolépticas y es el cual *L. thermotolerans* sintetiza en grandes cantidades a partir de la ruta descrita.

Figura 3

Compuestos secundarios formados por la levadura durante la fermentación alcohólica



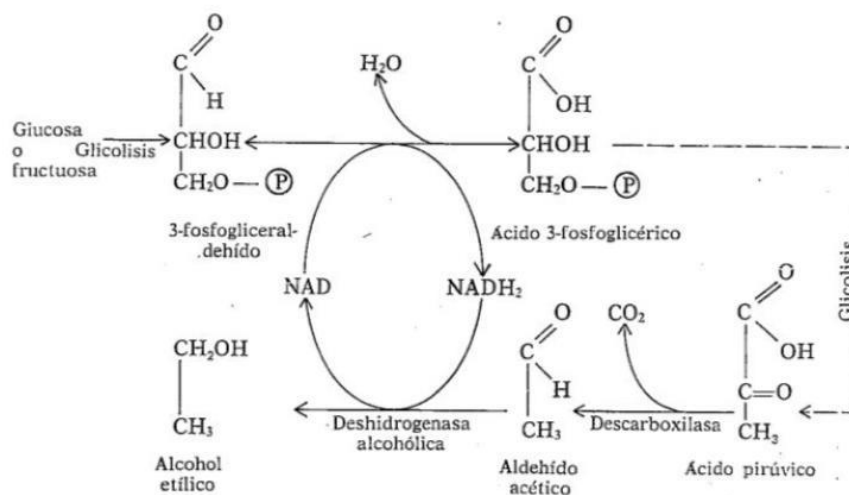
Fermentación alcohólica (FA)

El NADH (NAD reducido) formado en la glicólisis necesita volver a oxidarse en NAD^+ (NAD oxidado) y por lo tanto debe haber algún compuesto químico que reciba estos electrones. Este compuesto se trata del etanal o acetaldehído.

La fermentación alcohólica se desarrolla solo en dos pasos enzimáticos: siguiendo el quimismo de la glicólisis, el primer paso consiste en la descarboxilación del ácido pirúvico catalizado por la enzima piruvato descarboxilasa cuyo cofactor es la tiamina (vitamina B₁) y el segundo paso consiste en la reducción del acetaldehído a etanol o alcohol etílico catalizado por la enzima alcohol deshidrogenasa (su sitio activo presenta un ion Zn⁺²) en presencia de NADH.

Figura 4

Quimismo de la fermentación alcohólica



Como ya se mencionó, la glicólisis más la fermentación alcohólica (FA) proveen a la levadura de dos moléculas de ATP, lo que se traduce en 14,6 kcal utilizables por mol de glucosa fermentada. Desde la termodinámica, la variación de energía libre en esta transformación es de -40 kcal (los dos productos principales de la FA son el etanol y el CO₂), por lo tanto hay 25,6 kcal que se disipan bajo forma de calor.

Fermentación gliceropirúvica

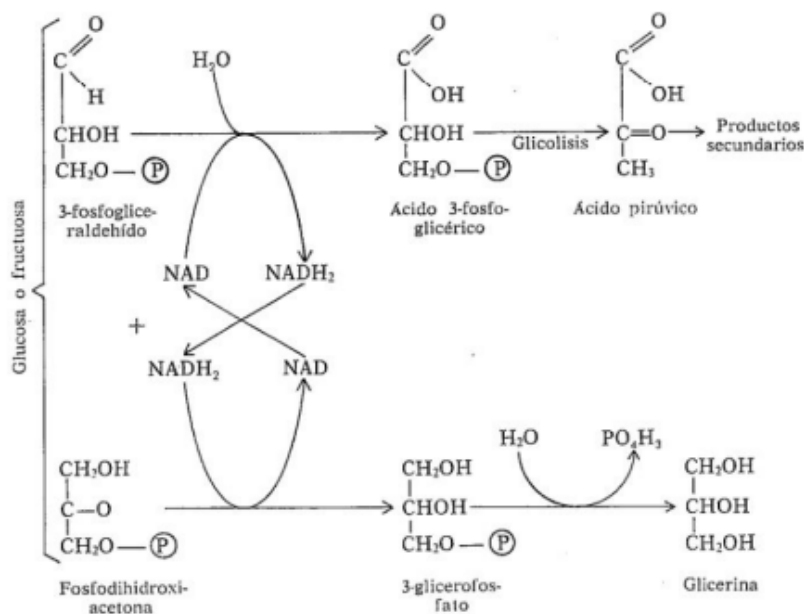
La reoxidación del NADH no es posible bajo la acción del etanal ya que si se sigue el quimismo, al principio de la fermentación, el etanal aún no se ha formado y por lo tanto el NADH se oxida en presencia de la fosfohidroxiacetona formada anteriormente en los primeros pasos de la fermentación. Esto se traduce en la formación de glicerina o glicerol, que lejos de empeorar al vino le da características especiales de cuerpo y untuosidad.

La glicerina, por tanto, se forma al comienzo de la fermentación en casi su totalidad, mientras que al final solo se forma una pequeña cantidad. Mientras no se encuentre disponible el etanal en el medio se desarrollarán una cantidad importante de productos secundarios a expensas del piruvato y también la glicerina.

Su quimismo es el siguiente:

Figura 5

Quimismo de la fermentación gliceropirúvica



El ácido etanal sulfónico es el producto de combinación entre el etanal y el anión bisulfito, es un producto altamente estable, siendo casi irreversible su ionización por su bajísima constante de disociación. Por lo tanto, si existen cantidades de sulfito en el medio combinará al acetaldehído y por lo tanto habrá mayor formación de glicerina. No es el único factor que influye en la mayor formación de glicerina, también lo son las bajas temperaturas y el cultivo de levaduras inicialmente desarrolladas en presencia de oxígeno ya que las enzimas piruvato descarboxilasas y alcohol deshidrogenasa están en muy pequeñas cantidades (Pascal Ribéreau-Gayon 2003, Tratado de Enología, Tomo I: Microbiología del vino. Vinificaciones, Editorial hemisferio sur S.A).

Respiración celular

Cuando existe una cantidad importante de oxígeno en el medio donde se encuentra la levadura, el ácido pirúvico proveniente de la glicólisis sufre una descarboxilación oxidativa en presencia de la coenzima A (CoA) y del NAD⁺ oxidado generando dióxido de carbono, NADH y acetil-CoA. Esta reacción es catalizada por la enzima llamada piruvato deshidrogenasa y se produce en la mitocondria celular.

El acetil-CoA luego es oxidado a CO₂ (oxidación completa) bajo el ciclo del ácido cítrico llamado también “Ciclo de Krebs” que ocurre en las mitocondrias.

Esta transformación química aeróbica produce un total de moléculas de ATP igual a 36 – 38; 2 ATP provienen de la glicólisis, 28 de la fosforilación oxidativa a partir del NADH y de la FADH (flavina adenina dinucleótido reducido) en el ciclo de Krebs, 2 de la fosforilación a nivel sustrato, 4 a 6 ATP provienen de la fosforilación oxidativa a partir del NADH surgido de la glicolisis .

A continuación se expresa el balance energético de la degradación oxidativa:

Tabla 2

Balance energético oxidación de la glucosa extraído de Pascal Riberau – Gayon en su Tratado de Enología

Etapa	Coenzima reducida	ATP formado
Glicolisis		4 o 6
Ganancia neta de ATP de la glicolisis	2 NADH	2
Piruvato → acetil-CoA	NADH	6
Isocitrato → alfa cetoglutarato	NADH	6
Alfa cetoglutarato → succinil-CoA	NADH	6
succinil-CoA → succinato	FADH ₂	2
Succinato → fumarato		4
Malato → oxalacetato	NADH	6
Rendimiento neto por glucosa		36-38

Como se observa, la ganancia de ATP en la respiración es muy grande y útil para la levadura, que a diferencia de la fermentación alcohólica produce una cantidad de energía enormemente mayor.

Si clasificamos a la levadura con respecto a la necesidad de oxígeno para desarrollar los procesos vitales, estas son anaerobias facultativas, esto quiere decir que el microorganismo es capaz de adaptarse a las condiciones del medio para generar la energía necesaria, adapta sus sistemas enzimáticos para los distintos procesos químicos a llevar a cabo.

La respiración celular es sumamente importante ya que de esta manera las levaduras llegan fácilmente a la masa crítica (aquella masa necesaria de microorganismos para poder llevar a cabo una fermentación alcohólica regular y completa en el mosto), aunque suponga una pequeña cantidad de glucosa que no se transformara en etanol. Esta masa crítica equivale a un millón de células vivas por centímetro cúbico de mosto (como mínimo). Si no se llega a esta masa la fermentación alcohólica puede quedar incompleta exponiéndose a peligros irreversibles.

Por lo tanto, es indispensable la buena aireación al comienzo de la elaboración de los vinos, para que las levaduras puedan realizar la síntesis de ácidos grasos y de esteroides.

Regulación de las vías metabólicas de utilización de los azúcares

Como ya se mencionó anteriormente, la levadura es capaz de adaptar su complejo enzimático de acuerdo a las condiciones del medio.

Regulación respiración – fermentación. Pasteur pudo demostrar que la respiración inhibe a la fermentación alcohólica sobre todo en aquellos medios en donde la levadura puede utilizar a los azúcares indiferentemente por respiración o fermentación lo que se da en medios

de bajas concentraciones de glucosa o azúcares fermentables. Esto se conoce como efecto Pasteur.

A este fenómeno se opone el efecto Crabtree que se conoce como represión catabólica por la glucosa. Este científico descubrió que a partir de los 9 g/L de glucosa en una solución hay un degeneramiento de las mitocondrias, una disminución de los esteroides y de ácidos grasos celulares y una fuerte represión de las enzimas que llevan a cabo el ciclo de Krebs. Esto obliga a la levadura a fermentar y no respirar, haya o no oxígeno en el mosto.

S. cerevisiae también puede metabolizar el etanol en presencia de pequeñas cantidades de glucosa, esto se observa en los vinos de Jerez que luego de la fermentación alcohólica se forma un velo superficial durante la crianza del vino.

Acumulación de glicerina. Se conoce que el vino contiene aproximadamente 8 g de glicerol cada 100 g de etanol, esto resulta que el 8% de las moléculas de azúcar siguen el camino de la fermentación gliceropirúvica y el 92% el camino de la fermentación alcohólica.

La fermentación gliceropirúvica se desarrolla con mayor facilidad al comienzo del proceso metabólico de la levadura, luego merma pero nunca se hace nula su producción. La fermentación gliceropirúvica induce a la fermentación alcohólica y esto es ya que provee el NAD⁺ cuando todavía no existe el acetaldehído en el medio. Por cada piruvato que no participa de la fermentación alcohólica sino que forma otros compuestos secundarios, una molécula de glicerol se genera a partir de la fosfohidroxiacetona.

La producción de glicerina regula el potencial redox interno de la célula equilibrando al sistema NADH/NAD⁺

El glicerol tiene muy buenas propiedades organolépticas pero de todas maneras debemos limitar a la fermentación gliceropirúvica ya que la producción del mismo implica la

formación de otros compuestos secundarios que no son de interés enológico. Siempre se prefiere la fermentación alcohólica más pura y completa posible.

Productos secundarios a partir del piruvato. Cuando aparece una molécula de glicerol también lo hace una de piruvato que luego de la descarboxilación en etanal no puede ser transformada en etanol. En las condiciones de la fermentación (anaeróbicas) el piruvato se transforma en oxalacetato que es parte del ciclo del ácido cítrico pero por las condiciones del medio se realiza de manera incompleta. Este conjunto de reacciones químicas da origen a un sin número de compuestos secundarios los cuales la mayoría no son interesantes y fueron desarrollados anteriormente.

Formación de ácido acético. *S. cerevisiae* produce una cantidad considerable de este ácido volátil durante la fermentación alcohólica, es dependiente de la cepa pero debemos prestar mucha atención a este aspecto.

Las vías de formación de este ácido son diversas pudiendo ser elaborado por hidrólisis del acetyl-CoA, por la descarboxilación oxidativa del ácido pirúvico por el complejo de la piruvato deshidrogenasa (reacción limitada en anaerobiosis) y por la oxidación del etanal a través de la enzima aldehído deshidrogenasa.

Mientras mayor cantidad de azúcar contenga un mosto mayor cantidad de ácido acético y glicerol va a producir la levadura, es decir mayor cantidad de productos secundarios.

En las uvas botritizadas existe un conjunto de glicoproteínas de pesos moleculares muy altos denominadas como botriticinas. Estas inhiben el crecimiento de las levaduras provocando mayores cantidades de este ácido también.

Los demás factores que influyen en la mayor producción de ácido acético son: pH alto (4) o muy bajo (menor a 3,2), carencias del mosto en aminoácidos y en vitaminas, las

temperaturas de fermentación elevadas durante la fase de multiplicación de la levadura.

También es importante que la levadura esté fortalecida con lípidos que ayudan a ingresar a los aminoácidos dentro de la célula, esta es una manera de controlar la producción de ácido acético.

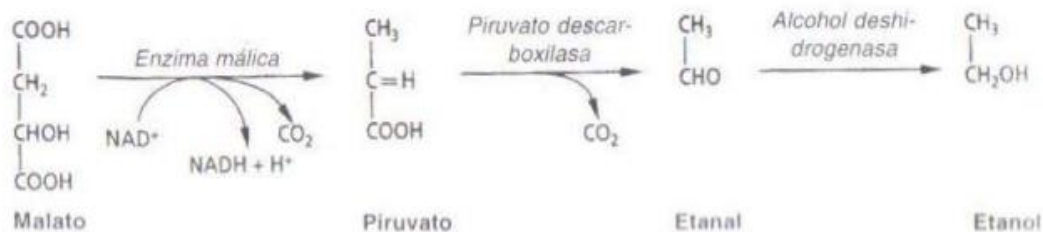
Las levaduras también son capaces de metabolizar el ácido acético y lo hacen en mayor cantidad cuando abunda el mismo en el medio. Es por esto que el proceso llamado refermentación produce un descenso de la acidez volátil.

Degradación del ácido málico por la levadura. El ácido málico es degradado en un 10 a 25% durante la fermentación alcohólica por *S. cerevisiae* (Pascal Ribéreau-Gayon 2003, Tratado de Enología, Tomo I: Microbiología del vino. Vinificaciones, Editorial hemisferio sur S.A).

Es mayor la degradación del mismo cuando el pH es menor. Se degrada principalmente por su fermentación alcohólica a través de lo que se conoce como fermentación maloalcohólica y su quimismo es el siguiente:

Figura 6

Quimismo de la fermentación maloalcohólica



Esta es una fermentación que baja mucho más la acidez que la misma fermentación maloláctica. Sin embargo *S. cerevisiae* no realiza una fermentación maloalcohólica completa

ya que no presenta los componentes para realizar transporte activo del malato al interior de la célula, solo ingresa por diferencia de concentraciones. En cambio, las levaduras del género *Schizosaccharomyces* si poseen estos componentes facilitando el ingreso del malato y completando esta transformación. Estas levaduras no tienen interés enológico para nosotros por todos los problemas que respecta su actividad.

Metabolismo de los compuestos nitrogenados

La importancia de este apartado radica en cómo se asimilan estos compuestos (sobre todo los aminoácidos) y las consecuencias de esta asimilación en la producción de alcoholes superiores y sus ésteres acompañando a la fermentación alcohólica.

Síntesis de aminoácidos

El material de alimentación más importante para la levadura es el ion amonio (NH_4^+) que puede ser tomado tanto de una fuente inorgánica (sales) como de otras orgánicas (aminoácidos). Este catión es de suma importancia para la elaboración de las proteínas que necesita la levadura para poder reproducirse, a este lo fijan sobre compuestos carbonados que provienen del metabolismo de los azúcares.

Mecanismo de asimilación del catión amonio y los aminoácidos

Para que ingrese tanto el catión amonio como los aminoácidos se necesita de transportadores proteicos que son específicos para cada especie química, ambos ingresan por un mecanismo de “transporte activo”.

Para el amonio, *S. cerevisiae* posee dos transportadores que son inhibidos por varios aminoácidos presentes de manera no competitiva.

En el caso de los aminoácidos, también se posee dos transportadores distintos:

a) Permeasa general de los aminoácidos: Es inhibida por la presencia del catión amonio por lo tanto no es activa durante la fermentación alcohólica, se activa cuando ya no hay amonio en el medio (segunda mitad de fermentación) para proveerse la levadura de nitrógeno.

b) *S. cerevisiae* tiene 11 permeasas específicas para varios aminoácidos (Pascal Ribéreau-Gayon 2003, Tratado de Enología, Tomo I: Microbiología del vino. Vinificaciones, Editorial hemisferio sur S.A). Su actividad no está inhibida por la presencia de amonio en el medio. Estas proteínas aseguran el transporte rápido de aminoácidos desde los inicios de la fase de crecimiento de las levaduras.

Se pueden clasificar a los aminoácidos y distintos constituyentes nitrogenados en base a la facilidad que tiene la levadura para poder adquirirlos en:

Tabla 3

Facilidad de absorción según naturaleza química de los compuestos nitrogenados basado en "Tratado de enología" Hidalgo Togoeres

Grupo	Características	Compuestos
A	Rápidamente absorbidos	Ion amonio, arginina, ácido aspártico, asparagina, isoleucina, leucina, lisina, serina y treonina
B	Lentamente absorbidos	Ácido glutámico, alanina, histidina,

		metionina, fenilalanina y valina
C	Absorbidos después de agotar los grupos A y B	Glicina, triptófano y tirosina
D	Absorción parcial o nula	Prolina

Al terminar la fermentación alcohólica la levadura libera cantidades significativas de aminoácidos al medio y durante el transcurso de la misma se afirma que la levadura consume entre 1 a 2 g/L de aminoácidos presentes en el mosto de origen. Según Hidalgo Togores en su “Tratado de enología”, los mostos normalmente contienen de 60 a 2400 ppm de fracción nitrogenada, en la cual la parte amoniacal inorgánica se encuentra en una cantidad aproximada de 19 a 240 ppm. Con estos datos podemos afirmar que los mostos salen agotados prácticamente de sustancias nitrogenadas y que estas son suficientes para desarrollar una fermentación alcohólica normal, este contenido de las mismas siempre dependerá de las condiciones climáticas, de riego y fertilización del viñedo.

Las hexosas del mosto son incorporadas por la levadura en el mecanismo denominado difusión facilitada (sin gasto de energía), en cambio para el caso de los constituyentes nitrogenados es por transporte activo ya que la concentración dentro de la célula es superior al medio externo y no podría ingresar el nitrógeno exterior por simple difusión cumpliendo la ley de Fick. Para ingresar el ion amonio la permeasa se une al mismo acompañado de un protón de hidrógeno (H^+) en el sentido del gradiente de concentración (en el medio exterior hay mayor concentración de hidrogeniones), así ingresan los dos cationes unidos a la proteína. Cabe destacar que este protón ingresado debe ser luego eliminado para evitar la

acidificación del citoplasma y esto se hace contra el gradiente por lo tanto se necesita gasto de energía (ATP) llevándolo a cabo la ATPasa (bomba de protones).

El etanol modifica la permeabilidad de la membrana plasmática debido a una transformación de los fosfolípidos de la misma haciéndola más permeable a los hidrogeniones del medio penetrando los mismos por simple difusión. Esto provoca que la célula gaste demasiada energía en mantener el pH estable del citoplasma deteniendo por lo tanto el transporte de los aminoácidos. Esto conlleva a que en el comienzo de la fermentación alcohólica la levadura asimile rápidamente a los aminoácidos del medio y concentrarlos en sus vacuolas para luego utilizarlos según la conveniencia.

Catabolismo de los aminoácidos

En el momento en el que ya no existe amonio en el medio, la levadura debe proveerse del mismo a partir de los aminoácidos. La ruta general a esto es la transferencia del grupo alfa aminado de numerosos aminoácidos en el ácido alfa-cetoglutarico para formar el glutamato. Para esto existen enzimas denominadas transaminasas cuyo grupo prostético es el piridoxal fosfato. El glutamato se desamina luego por vía oxidativa para formar el catión amonio.

Esta es la manera en la que se forma nuevamente el catión amonio cuando ya su concentración es escasa en el medio.

Fermentación alcohólica de los aminoácidos

Luego de la desaminación de los aminoácidos se forman compuestos orgánicos denominados ácidos cetónicos, estos pueden descarboxilar y formar los correspondientes aldehídos y a su vez estos reducirse en alcoholes denominados superiores (reacción de Ehrlich).

De esta manera se generan alcoholes superiores con un carbono menos con respecto al aminoácido de partida. Estos alcoholes pueden esterificarse por la acción de las levaduras y formar compuestos con buenos aromas, a estos los llamamos “aromas secundarios de fermentación” y son exclusivamente desarrollados por las levaduras. Estos aromas son importantes sobre todo para variedades pobres en aromas primarios.

Algo muy importante es que para que se produzca toda esta ruta metabólica se debe cumplir una condición: se necesitan 1 ppm (mg/L) de NPA (nitrógeno prontamente asimilable) por cada gramo por litro de azúcar fermentable. Esto parte del hecho en que si existe más cantidad de la relación dada, la levadura tendrá cantidad suficiente del ion amonio y no tendrá necesidad de autoabastecerse de los aminoácidos mediante esta ruta, por tanto nunca se sintetizarían estos aromas. En cambio, si hay poca cantidad de NPA, la levadura se estresará y comenzará a sintetizar ácido sulfhídrico (H_2S) y otros compuestos azufrados con muy malos olores (reducción), pudiéndose solucionar esto con agregado de nutrientes y remontaje abierto.

Si bien este mecanismo no es el único por el cual se forman estos alcoholes superiores ya que no se explica la formación de propanol y butanol a partir de los aminoácidos. Estos dos se forman a partir de los ácidos cetónicos originados en el metabolismo de los azúcares.

Las variables que hacen que se produzcan mayores cantidades de estos aromas durante la vinificación se relacionan con pH alto, temperatura muy elevada y aireación. En los vinos blancos si se mantiene la temperatura en $20^{\circ}C$ aproximadamente se limita la producción de estos aromas (Pascal Ribéreau-Gayon 2003, Tratado de Enología, Tomo I: Microbiología del vino. Vinificaciones, Editorial hemisferio sur S.A).

La levadura de fermentación también es importante a la hora de cuantificar estos compuestos, *S. cerevisiae* – bayanus produce grandes cantidades de feniletanol.

Cada cepa de *S. cerevisiae* y demás levaduras de fermentación tienen distintas capacidades de esterificar a estos alcoholes superiores y formar ésteres, que estos sí tienen buenos aromas. Los más importantes son el acetato de isoamilo con olor a banana y el acetato de fenil etilo con olor a rosa, también otros menos importantes son el hexanoato (olor a manzana verde) y el decanoato de etilo con olor jabonoso. En los vinos blancos estos ésteres se forman en mayor medida cuanto más clarificado esté el mosto (desborre previo) y menor sea la temperatura de fermentación. Es importante destacar que estos aromas se hidrolizan durante el primer año de crianza, por lo tanto se pierden estos aromas con el tiempo.

Figura 7

Química de la fermentación alcohólica de los aminoácidos

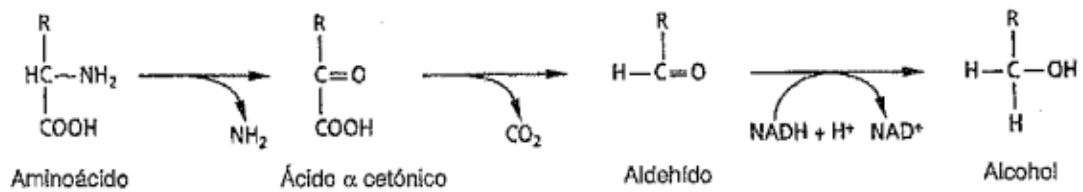
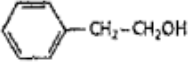
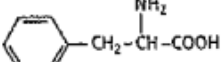
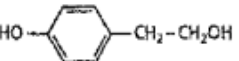
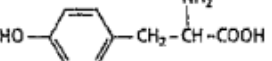
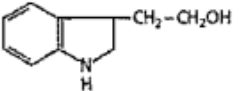
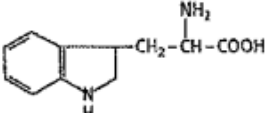


Figura 8

Alcoholes superiores desarrollados a partir de los aminoácidos correspondientes

Alcohol superior	Contenido en vinos (mg/l)	Aminoácido precursor
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH} \\ \text{3-metil-butan-1-ol} \\ \text{(alcohol isoamílico)} \end{array}$	80-300	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \\ \quad \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \text{Leucina} \end{array}$
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2\text{OH} \\ \text{2 metil-butan-2-ol} \\ \text{(alcohol amílico)} \end{array}$	30-100	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \\ \quad \\ \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \text{Isoleucina} \end{array}$
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2\text{OH} \\ \text{2 metil-butan-2-ol} \\ \text{(alcohol amílico)} \end{array}$	50-150	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \\ \quad \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \text{Valina} \end{array}$
 <p>Fenil etanol</p>	10-100	 <p>Fenil alanina</p>
 <p>Tirosol</p>	20-50	 <p>Tirosina</p>
$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$ <p>Propan-1-ol</p>	10-50	?
$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$ <p>Butan-1-ol</p>	1-10	?
 <p>Triptofol</p>	0-1	 <p>Triptófano</p>
$\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ <p>γ butirolactona</p>	0-5	$\text{COOH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$ <p>Ácido glutámico</p>
$\text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$ <p>Metionol</p>	0-5	$\text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$ <p>Metionina</p>

Lachancea thermotolerans

Hace algunos años las levaduras del género *Saccharomyces* spp. eran la única opción para la elaboración de vino debido a sus características especiales que las hacen aptas para desarrollar cualquier clase de vino, como por ejemplo la baja producción de acidez volátil, el alto poder fermentativo, la producción de aromas secundarios de fermentación, la regular cinética fermentativa, etc. Estos son los criterios que utilizan los profesionales y microbiólogos para seleccionar cepas aptas para la vinificación.

Sin embargo, durante la década anterior, varios productos comerciales de levaduras no *Saccharomyces* aparecieron en el mercado de la biotecnología.

Tabla 4

Las principales características que aportan especies no Saccharomyces en la elaboración de vino

Especies de levaduras	Características
Torulospora delbrueckii	Ácido acético ↓, complejidad en el aroma ↑, tioles ↑
Metschnikowia pulcherrima	Ésteres ↑, terpenos ↑, tioles ↑, complejidad en el aroma ↑
Kloeckera apiculata	Complejidad en el aroma ↑
Hanseniaspora vineae	Complejidad en el aroma ↑, 1_etil_2_fenilacetato ↑, aminas biógenas ↓
Hansenula anomala	Alcoholes de C ₆ ↓
Pichia kluyveri	Complejidad en el aroma ↑, tioles ↑, ésteres ↑

Pichia guilliermondii	Estabilidad en el color ↑
Candida stellata	Glicerol ↑
Zygosaccharomyces bailii	Polisacáridos ↑
Schizosaccharomyces pombe	Ácido málico ↓, desacidificación ↑
Lachancea thermotolerans	Ácido láctico ↑, acidificación ↑

Lachancea thermotolerans es una levadura de tipo no Saccharomyces que cada día está siendo más estudiada por el hecho de ser diferente a las demás. Toma su valor en el sentido de producir, durante la fermentación alcohólica, cantidades importantes de ácido láctico. Si bien al ser una levadura fermentará a los azúcares elaborando como productos principales al alcohol etílico y al dióxido de carbono (CO₂) pero una cierta cantidad de moléculas de glucosa se transformarán en ácido láctico desviando la ruta fermentativa normal.

Este simple hecho es de suma importancia ya que nos da la capacidad de acidificar el medio (mosto) de manera natural, sin el agregado de ácidos orgánicos o la utilización de otros métodos como suele hacerse generalmente.

El cambio climático está generando varios problemas en la elaboración normal del vino. Uno de los principales es la falta de acidez en las zonas cálidas (lugares de interés de producción vitícola) y las dificultades para llevar a cabo la fermentación maloláctica (cuando se desea hacer) para estabilizar los vinos antes del embotellado. En nuestros medios es muy difícil manejar este tema de forma natural y muchos productores eligen agregar ácido láctico de manera artificial a sus vinos con el fin de lograr una complejidad mayor (redondez) en sus vinos. Con esta alternativa podemos tener una cantidad de ácido láctico suficiente en la matriz del vino para que se pueda percibir al mismo y obtener los beneficios buscados por el

enólogo. Es por esto que a lo largo de este capítulo iremos mencionando todas las características bioquímicas de esta levadura y los beneficios comerciales que nos puede traer.

Historia de la clasificación de especies de Lachancea

El género *Lachancea* fue propuesto por primera vez por Kurtzman en 2003 como resultado de una reclasificación de varios géneros de levaduras basada en la relación genética en lugar de las similitudes fenotípicas. Ahora, el género comprende especies que antes estaban clasificadas en los géneros *Zygosaccharomyces*, *Kluyveromyces* y *Saccharomyces*. Históricamente, estas especies se agrupaban en sus respectivos géneros según la morfología de las células vegetativas y los estados sexuales, así como pruebas de fermentación y crecimiento comunes para la identificación de levaduras (Fell, Statzell-Tallman y Kurtzman, 2004; Kurtzman y Robnett, 2003).

Actualmente, el género *Lachancea* cuenta con 11 especies válidas. La más importante de este género es *L. thermotolerans* por el hecho de adaptarse más fácilmente a los medios de fermentación.

Taxonomía, morfología y fisiología

Lachance y Kurtzman (2011) renombraron varios géneros asignados a la familia *Saccharomycetaceae*. En el pasado, los estudios fenotípicos se habían utilizado principalmente para definir estos grupos, pero las clasificaciones posteriores los agruparon mediante análisis filogenéticos de sus secuencias genéticas. La última organización taxonómica de la familia *Saccharomycetaceae* se evaluó de acuerdo con este análisis de secuencias de múltiples genes, lo que resultó en la reasignación de algunas especies entre los géneros actualmente aceptados y la propuesta de cinco nuevos géneros: *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* y *Zygotorulaspora*. Desde entonces, antiguas

especies de *Kluyveromyces*, como *K. thermotolerans*, ahora se conocen como *L. thermotolerans* (Lachance y Kurtzman 2011). Por lo tanto, a través del tiempo se van modificando los criterios de clasificación de los microorganismos en general y hace un buen tiempo ya que el género llamado *Lachancea* pertenece a la familia *Saccharomycetaceae*. Como se mencionó anteriormente, este género contiene a 11 especies, de las cuales la más importante es *L. thermotolerans*, es la especie más común de este género que se utiliza actualmente en la elaboración de vinos. Esta especie ha sido previamente designada como *Zygosaccharomyces thermotolerans*, *S. thermotolerans*, *K. thermotolerans*, *Zygofabospora thermotolerans*, *Torula dattila* Kluyver, *Mycotorula dattila*, *Torulopsis dattila*, *Cryptococcus dattilus*, *Candida dattila*, *S. veronae*, *K. veronae* y *Zygosaccharomyces drosophilae* (Lachance and Kurtzman 2011).

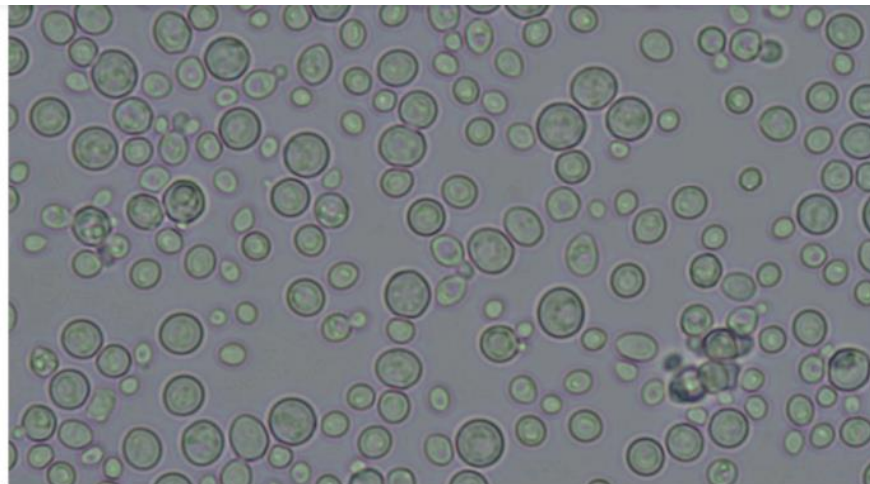
El género se reproduce asexualmente mediante gemación al igual que el resto de las demás levaduras. La reproducción sexual tiene lugar a través de la formación de ascos, que contienen de una a cuatro ascosporas esféricas.

En cuanto a la fisiología y bioquímica, *Lachancea* fermenta intensamente la glucosa y no asimila nitrato. La etilamina puede ser utilizada como única fuente de nitrógeno. Los factores selectivos primarios para el aislamiento selectivo del género *Lachancea* podrían incluir antibióticos, como la cicloheximida, incubaciones a alta temperatura de cultivo, aproximadamente a 37 °C, fuentes de carbono selectivas, como la melecitosa, y factores diferenciales, como la tinción con azul de diazonio B.

Morfológicamente las especies de *L. thermotolerans* tienen células esféricas a elipsoidales ligeramente más pequeñas que las de *S. cerevisiae*, con dimensiones aproximadas de $3-6 \times 6-8 \mu\text{m}$.

Figura 9

Observación microscópica de células de L.thermotolerans



Recientemente, los estudios han informado que existe una variabilidad significativa entre importantes parámetros enológicos a nivel clonal cuando se comparan las fermentaciones de diferentes cepas de *L. thermotolerans*. Escribano et al. (2018) reportaron diferencias estadísticamente significativas en la producción de ácido láctico de aproximadamente 3.3 g/L. El ácido láctico producido llevó a variaciones en el pH y la acidez total de aproximadamente 0.2 y 2.3 g/L, respectivamente, dependiendo de las diferentes cepas estudiadas.

Tabla 5

Resumen de la variabilidad reportada para Lachancea thermotolerans en varios parámetros de calidad en la fermentación del vino

Parámetros	Benito, 2018	Hranilovic, 2018	Binati, 2019	Binati, 2020	Vaquero, 2020	Hranilovic, 2021	Zhang, 2021	Snyder, 2021
Modalidad de fermentación	Pura	Pura	Pura	Secuencial	Pura	Secuencial	Secuencial	Secuencial
Etanol (v/v)	3.98–10.35	7.3–10.6	4.24–6.1	11.76–11.97	4.75–8	9.6–11.6	13.36–13.53	12.16–12.55
Glicerol (g/L)		3.9–8	3.97–4.99	4.67–5.30		0.29–0.54	6.95–8.1	6.4–7.2
Ácido acético (g/L)	0.1–0.58	0.06–0.32	0.03–0.23	0.19–0.26			0.24–0.37	<0.1–0.13
Polisacáridos (mg/L)	163–260					27–57		
Degradación ácido málico (%)	10–25	(–7)–25						
Producción ácido láctico (g/L)	0.9–4.2	1.8–12	0.69–6.67	0.53–4.42	0.2–3	1–8.1	1.18–1.49	0.2–6.1
Ácido pirúvico (mg/L)	20–28.5	13–78	403–597			60–170		
Ácido succínico (mg/L)	287–438					2700–3900		
Acetaldehído (mg/L)						11.7–18.7		
1_propanol (mg/L)	20.5–55.4					29,002–35,699		
Isobutanol (mg/L)	20.6–31.1					29,207–45,601		
Acetato de etilo (mg/L)	31–51					40,224–79,191	81,197–12,4867	
Lactato de etilo (mg/L)	5.5–23.2					10,617–185,507		
Acetoína (mg/L)	4.6–108							
Ácido isovalérico (mg/L)	0.9–2							
Alcoholes superiores					180–275	430,882–595,281	342,891–400,396	

Estos datos indican que las cepas de *L. thermotolerans* se comportan distinto con respecto a la producción de ácido láctico que podamos medir en el vino terminado, según sea la cepa que se reproduce en el medio. Por este motivo un objetivo de este trabajo es poder diferenciar dos marcas comerciales distintas que ofrezcan a esta levadura.

Aislamiento y bioquímica de especies de levadura *Lachancea*

Hábitats naturales

Las especies de *Lachancea* se han aislado de una amplia variedad de nichos ecológicos que incluyen plantas, insectos, suelos, alimentos y bebidas. Entre las especies, *L. thermotolerans* y *L. fermentati* se han aislado con mayor frecuencia y de la mayor diversidad de nichos ecológicos, especialmente de mosto de uva. Sin embargo, existe una falta de literatura que profundice en por qué estas especies de *Lachancea* son capaces de sobrevivir en una amplia variedad de nichos ecológicos.

Esta levadura también es encontrada por lo tanto en la piel de la uva, así como muchas otras más.

Características bioquímicas

Hasta ahora la investigación ha demostrado que las especies de *Lachancea* generalmente pueden fermentar glucosa y al menos otro azúcar, así como asimilar rafinosa, etanol (con la excepción de *L. dasiensis*, *L. nothofagi* y *L. mirantina*) y manitol. También suelen ser incapaces de asimilar nitrato, lactosa, almidón soluble, L-arabinosa, D-ribosa (excepto *L. quebecensis*), L-ramnosa, D-glucosamina, N-acetil-D-glucosamina (excepto *L. mirantina*), metanol, eritritol, galactitol, citrato, inositol y hexadecano.

A lo largo del capítulo iremos nombrando los impactos que tiene *L. thermotolerans* sobre los parámetros analíticos del vino.

Potencial enológico

Los rasgos enológicos evaluados en esta especie incluyeron tolerancia al etanol, resistencia al SO₂, producción de H₂S, fenotipo de floculación, velocidad de fermentación, acidez titulable y acidez volátil.

Comportamiento durante la fermentación

Si bien se han realizado numerosas investigaciones para evaluar el impacto enológico de *L. thermotolerans*, estos informes se han llevado a cabo en matrices de uva diferentes, condiciones de fermentación y utilizando diversas cepas de levaduras. Sin embargo, se pueden observar ciertas tendencias, independientemente de las condiciones cambiantes.

La inoculación única de *L. thermotolerans* en mosto de uva blanca y tinta ha demostrado resultar, en la presencia de azúcares residuales, concentraciones más bajas de etanol debido a su menor velocidad de fermentación, por lo tanto existe la necesidad de hacer una co-inoculación o una inoculación secuencial (tema del trabajo) para que la fermentación alcohólica termine en su totalidad a rastros de azúcares y no comprometa la estabilidad biológica del vino. Alternativamente, *L. thermotolerans* se puede utilizar en co-fermentación con otras levaduras no *Saccharomyces* fermentativas como *Schizosaccharomyces pombe* y *Torulaspóra delbrueckii* (Benito, Calderón, Palomero, & Benito, 2015; Escribano-Viana et al., 2018).

Se ha observado que *L. thermotolerans* persiste hasta las etapas intermedias y finales de la fermentación durante fermentaciones mixtas con *S. cerevisiae*. Tanto en estrategias de inoculación simultánea como secuencial, la consecuencia de la inoculación de *L. thermotolerans* es una velocidad de fermentación más baja. Las fermentaciones secuenciales, en general, han demostrado que resultan en una mayor persistencia de *L. thermotolerans* en las fermentaciones mixtas, donde la adición posterior de *S. cerevisiae* ha permitido que las

células de levadura de *L. thermotolerans* alcancen concentraciones más altas y, posteriormente, demuestren una mayor competitividad. Sin embargo, la duración en la que *L. thermotolerans* puede persistir y dominar en las fermentaciones ha variado, lo cual fue explicado por Kapsopoulou et al. (2007) como dependiente de la capacidad de *L. thermotolerans* para alcanzar una población celular crítica (en el caso de *S.cerevisiae* es de 1 a 3 millones de células vivas por mililitro); esta masa celular crítica varía de una cepa a la otra, pero en general se establece que en *L.thermotolerans* también debe existir una cantidad similar o aún mayor que en *S.cerevisiae*.

La disminución de células vivas de *L. thermotolerans* durante las fermentaciones también se ha atribuido al impacto de parámetros como temperaturas más altas (Balikci et al., 2016; Ciani et al., 2006; Gobbi et al., 2013), falta de oxigenación (Holm Hansen, Nissen, Sommer, Nielsen, & Arnerborg, 2001; Shekhawat, Bauer, & Setati, 2017), contacto célula a célula con *S. cerevisiae* (Nissen & Arneborg, 2003; Nissen, Nielsen, & Arneborg, 2003) y la producción de compuestos tóxicos por parte de *S. cerevisiae* (Albergaria, Francisco, Gori, Arneborg, & Gírio, 2010).

Aunque *L. thermotolerans* no persista de manera consistente hasta el final de la fermentación, se ha determinado que influye de manera positiva en el perfil analítico y sensorial del vino. Por ejemplo, las fermentaciones en co-cultivo con *L. thermotolerans* generalmente resultan en una mayor acidez titulable y total. Esto se atribuye generalmente a la reducción del ácido acético y al aumento de los niveles de ácido láctico. Si bien estos rasgos podrían considerarse un fenotipo de la especie, está claro que los niveles de producción de ácido láctico pueden variar entre cepas y pueden oscilar entre 1 y 9 g/L (Vilela, 2018). En la inoculación de *L. thermotolerans* también se ha observado que aumenta el contenido de glicerol, que es capaz de proporcionar un sabor dulce e impactar en la

sensación de plenitud en boca. Sin embargo, no se observó un aumento significativo en el contenido de glicerol y una reducción en el ácido acético en todos los informes, lo que sugiere una dependencia de la cepa, las condiciones de fermentación o la biomasa y persistencia de *L. thermotolerans*.

La producción de diversos compuestos volátiles puede tener un impacto significativo en la percepción general del vino. El análisis crítico encontró que el 2-feniletanol aumentó independientemente de las diferentes condiciones de fermentación (Beckner Whitener et al., 2015; Benito, Calderon y Benito, 2016; Comitini et al., 2011; Gobbi et al., 2013; Porter et al., 2019). En cuanto a la producción de ésteres, la única tendencia común en los diferentes informes fue el aumento de lactato de etilo (aroma a mantequilla y crema) y hexanoato de etilo (aroma a manzana verde y anís), así como la reducción de acetato de feniletilo (aroma frutal) (Gobbi et al., 2013; Benito, Hofmann, et al., 2015, 2016, 2018; Porter et al., 2019).

El uso combinado de *L. thermotolerans* y *S. cerevisiae* en fermentación secuencial también ha demostrado producir vinos tintos con una intensidad de color y tono aumentados (Benito, Calderón, et al., 2016; Benito, Calderón, & Benito, 2017; Escott et al., 2018). Esta capacidad de influir en el color del vino se atribuyó a la baja capacidad de adsorción de antocianinas de *L. thermotolerans* (Benito et al., 2017), complementada por el aumento en la producción de ácido pirúvico, que se condensa con malvidina para formar pigmentos poliméricos estables y vitisinas (Benito, Calderón, et al., 2016; Escott et al., 2018). Alternativamente, el aumento en el color puede ser mejorado debido a una mayor acidez en el vino, que influiría principalmente en el equilibrio químico de los antocianos desplazándolo hacia la forma coloreada (catión flavilium).

Se demostró que estas cepas producen cantidades considerablemente mayores de polisacáridos totales durante el crecimiento y la fermentación en comparación con *S.*

cerevisiae. La caracterización química de los polisacáridos mostró que en su mayoría están compuestos por manoproteínas (Domizio et al., 2014). Las manoproteínas son uno de los principales componentes de la pared celular de la levadura y se ha informado que contribuyen a la reducción de la precipitación de ácido tartárico, la turbidez proteica y la astringencia del vino (Juega, Nunez, Carrascosa y Martinez-Rodriguez, 2012; Domizio et al., 2014).

Producción de enzimas extracelulares

Además de la producción de diversos metabolitos primarios y secundarios, las levaduras también pueden influir en el aroma del vino y en el proceso tecnológico de su producción mediante la expresión de diversas enzimas extracelulares. Varias de estas enzimas son producidas, transportadas al espacio periplasmático y secretadas al medio extracelular donde son capaces de interactuar con los compuestos aromáticos derivados de la uva (Strauss, Jolly, Lambrechts y van Rensburg, 2001). Las enzimas de relevancia enológica, comúnmente investigadas en las levaduras del vino, incluyen proteasas, pectinasas y glucosidasas.

Las proteasas son capaces de hidrolizar las proteínas en compuestos más pequeños y solubles, lo cual puede ayudar en la clarificación y estabilización del vino (Fernández, Ubeda y Briones, 2000). Otra ventaja de la hidrólisis de proteínas es el aumento resultante de aminoácidos y péptidos, lo cual ayuda a prevenir fermentaciones detenidas o lentas debido al aumento resultante de nitrógeno asimilable (Fernández et al., 2000; Lagace y Bisson, 1990).

Otra enzima con relevancia enológica es la pectinasa. Las enzimas pectolíticas, mediante la degradación de la pectina, pueden ayudar a mejorar la eficiencia del prensado de la uva, la clarificación del mosto, así como aumentar la extracción de sustancias, lo que contribuye al color y aroma del vino (Fernández et al., 2000).

Según se resume en las investigaciones de las diversas cepas de *L. thermotolerans* analizadas, se informaron resultados negativos para el 100% y el 98,20% de estas cepas en cuanto a las actividades de proteasa y poligalacturonasa, respectivamente. Esto sugiere que la mayoría de las cepas de *L. thermotolerans* carecen de esta actividad enzimática. Sin embargo, se utilizaron metodologías variables (por ejemplo, sustratos y pH) para medir esta actividad.

La contribución de las especies de levadura a la calidad del vino se ha destacado previamente, específicamente debido a la producción de compuestos volátiles derivados del metabolismo de la levadura que son sensorialmente significativos, como ésteres, alcoholes y acetatos. Sin embargo, una gran proporción de los compuestos aromáticos varietales aparece conjugada glicosídicamente en los vinos jóvenes, lo que impide que contribuyan al aroma del vino y, por lo tanto, forman un gran grupo de potencial aromático y de sabor no aprovechado. Estos compuestos volátiles pueden ser liberados de sus precursores mediante hidrólisis enzimática. En los análisis de varias cepas de *L. thermotolerans*, solo el 12% de las cepas mostraron actividad de β -glucosidasa, mientras que el 88% carecía de esta actividad. La gran mayoría de estos resultados corresponden a las 88 cepas de *L. thermotolerans* analizadas por Belda et al. (2016), de las cuales una gran parte mostró actividad negativa. Los informes que investigaron la actividad de β -glucosidasa se realizaron en placas, utilizando arbutina como sustrato para la actividad enzimática, y aunque el pH fue diferente en algunos casos, la metodología fue similar.

Como se mencionó anteriormente, las pruebas en placas no representan con precisión lo que puede ocurrir en una fermentación de vino debido a las diferentes condiciones en las que se evalúa la actividad y al uso constante de sustratos artificiales que no representan los sustratos naturales en una fermentación de vino. Si bien se ha analizado la actividad de β -glucosidasa durante las fermentaciones de vino en otras especies de levadura (Fia, Giovani y

Rosi, 2005), recientemente se ha investigado esta actividad en *Lachancea* spp. (Porter et al., 2019). Se descubrió que algunas cepas de *Lachancea* spp. mostraron actividad positiva de β -glucosidasa en condiciones de elaboración de vino; la enzima se encontró principalmente asociada a la pared celular y alcanzó su máximo de actividad junto con un pico correspondiente en la concentración celular (Porter et al., 2019). Esta investigación de una variedad más amplia de especies y cepas de *Lachancea* podría proporcionar una mejor comprensión de si otras especies de *Lachancea* son capaces de expresar esta enzima y si esto es una característica de todo el género *Lachancea* o depende de la cepa.

Impacto sobre los parámetros analíticos

Ácido láctico, acidez titulable y pH

Aunque la producción de ácido láctico es la aplicación más destacada de *L. thermotolerans* en la vinificación, diferentes investigadores reportan grandes diferencias en su producción, que varía de 0.3 a 9.6 g/L, dependiendo de la cepa estudiada o de las condiciones experimentales.

Kapsopoulou et al. (2005) informaron que una cepa de *L. thermotolerans* en una fermentación pura produjo 9.6 g/L de ácido láctico, mientras que el control de *S. cerevisiae* no mostró ningún aumento en su concentración final de ácido láctico. Esa concentración de ácido láctico aumentó la acidez titulable final en 9.4 g/L más que la de *S. cerevisiae*, reduciendo el pH final de 3.15 a 2.9. Sin embargo, *L. thermotolerans* no completó adecuadamente la fermentación alcohólica, dejando 38 g/L de azúcar residual, mientras que el control de *S. cerevisiae* completó el proceso de fermentación alcohólica con sólo 1.6 g/L de azúcar residual restante. De aquí surge la necesidad de realizar fermentación secuencial con *S. cerevisiae* o también una co-inoculación, en nuestro caso el trabajo está orientado específicamente en una fermentación secuencial teniendo en cuenta la zona de origen de la

uva y el tipo de producto final a obtener (importante tenor azucarino). En la mayoría de los casos, estudios posteriores han informado de diferencias menores en la producción de ácido láctico cuando *L. thermotolerans* se utiliza en fermentaciones combinadas con fermentadores más fuertes, como *S. cerevisiae*, en lugar de fermentaciones en cultivo puro para garantizar una fermentación alcohólica completa adecuada. El mismo autor (Kapsopoulou et al. 2007) informó posteriormente de aumentos menores en la acidez total que variaba de 0.6 a 5 g/L, dependiendo de la modalidad de cultivo mixto utilizada en combinación con *S. cerevisiae*. La producción de ácido láctico varió de 0.18 a 5.13 g/L. Aunque otros estudios no investigaron específicamente las concentraciones finales de ácido láctico (Comitini et al. 2011), informaron aumentos significativos en la acidez total que variaron de 0.3 a 2.2 g/L, dependiendo de la proporción de *S. cerevisiae* a *L. thermotolerans* en las inoculaciones iniciales. Esto condujo a disminuciones en el pH de hasta 0.3 unidades.

Gobbi et al. (2013) observaron aumentos más moderados en las concentraciones finales de ácido láctico, con 3.43 g/L para una fermentación pura de *L. thermotolerans*, 1.55 g/L para una fermentación secuencial con *S. cerevisiae*.

Ácido málico

Aunque todos los estudios reportan que *L. thermotolerans* es un productor de ácido láctico durante la fermentación alcohólica, la mayoría de los estudios también indican que *L. thermotolerans* puede degradar pequeñas cantidades de ácido L-málico. Estas degradaciones varían desde el 8% (Gobbi et al., 2013) hasta aproximadamente el 26% (Kapsopoulou et al., 2005), mientras que algunos estudios no observaron este fenómeno en absoluto (Benito et al., 2015b; Escribano et al., 2018). Esta variabilidad puede explicarse por las observaciones del mismo fenómeno en otras especies, como *S. cerevisiae*, que puede degradar ácido málico hasta aproximadamente el 40%, dependiendo de la cepa estudiada (Bonciani et al., 2016). Sin

embargo, en todos los casos, se produjo un aumento en la acidez total y una disminución en el pH final debido a que la formación de ácido láctico tuvo una influencia mucho más fuerte que las pequeñas cantidades de degradación de ácido málico.

Ácido acético

Varios estudios han reportado bajas concentraciones de ácido acético en el vino cuando está involucrada *L. thermotolerans*. Kapsopoulou et al. (2005) observaron diferencias de hasta 0.23 g/L en acidez volátil cuando se compararon cultivos puros de *L. thermotolerans* y *S. cerevisiae*. La producción de ácido acético entre las diferentes cepas de *L. thermotolerans* varió de 0.32 a 0.58 g/L. Estudios posteriores reportaron un efecto similar en fermentaciones secuenciales con diferencias estadísticamente significativas de aproximadamente 0.25 g/L (Gobbi et al., 2013). Los últimos estudios que comparan varias cepas de *L. thermotolerans* reportaron un grado significativo de variabilidad, aproximadamente del 50%, en la acidez volátil (0.14-0.28 g/L) de las cepas (Escribano et al., 2018). Aunque todos los clones seleccionados produjeron vinos por debajo del umbral de defecto de 0.8 g/L, estos resultados muestran claramente que la producción de acidez volátil debe ser considerada en el proceso de selección de cepas, ya que se realiza para *S. cerevisiae*, donde típicamente el ácido acético es el segundo parámetro más importante después del consumo de azúcar residual.

Como se puede observar según los estudios informados, existe una gran variabilidad genética en cuanto a las cepas que se puedan desarrollar en el medio fermentativo y de allí varía en gran medida la producción de ácido acético, siendo un parámetro de extrema importancia en la elección de la cepa. Con el paso del tiempo esto se va controlando un poco más eligiendo a las cepas que menor acidez volátil produzcan, a lo largo de este trabajo se desarrollarán dos marcas comerciales distintas con resultados también diferentes en cuanto a cada uno de los parámetros analíticos mencionados.

Etanol

El primer estudio que examinó el uso potencial de *L. thermotolerans* en la fermentación alcohólica describió a esta especie como poseedora de un poder de fermentación inferior al de *S. cerevisiae* (Kapsopoulou et al., 2005). La cepa utilizada en este estudio produjo un 7.58% (v/v) de etanol a partir de una concentración inicial de azúcar de 163 g/L, dejando sin fermentar 38.8 g/L de azúcares residuales, mientras que el control de *S. cerevisiae* produjo un 9.6% (v/v) de etanol. Fue debido a estos resultados que estudios posteriores combinaron *L. thermotolerans* con una especie de levadura fermentadora más potente, como *S. cerevisiae*. El propósito de esta combinación era completar la fermentación alcohólica mientras se aumentaba la acidez de manera similar a lo que ocurre en la industria real. Los primeros estudios sobre fermentaciones secuenciales utilizando *L. thermotolerans* y *S. cerevisiae* reportaron niveles más bajos de concentraciones finales de etanol (0.3% v/v), dependiendo del intervalo de tiempo entre la inoculación inicial de *L. thermotolerans* y la segunda inoculación de *S. cerevisiae*. Algunos autores han descrito a *L. thermotolerans* como capaz de fermentar concentraciones superiores al 10% (v/v) de etanol, hasta 10.35% (v/v) (Du Plessis et al., 2017) o 10.46% (v/v) (Gobbi et al., 2013)..

Compuestos aromáticos

En cuanto a los compuestos aromáticos, estudios han informado que *L. thermotolerans* produce menos alcoholes superiores que *S. cerevisiae* (Gobbi et al., 2013; Benito et al., 2015a; Balikci et al., 2016; Escribano et al., 2018). Benito et al. (2015a) observaron que las fermentaciones secuenciales que involucraban a *L. thermotolerans* produjeron aproximadamente un 13% menos de concentraciones finales de alcoholes superiores que el control de *S. cerevisiae*. La diferencia más notable se observó para el 3-metilbutanol, con aproximadamente 20 mg/L. Otro estudio informó que los mayores efectos

se observaron en fermentaciones secuenciales para los alcoholes superiores principales, 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol y 2-metil-1-butanol, con diferencias de hasta 75, 40 y 20 mg/L, respectivamente; sin embargo, el estudio no observó los mismos efectos para alcoholes superiores menores, como 1-propanol o hexanol (Gobbi et al., 2013).

Benito et al. (2015a) informaron un aumento de aproximadamente un 30% en los ésteres etílicos totales; las diferencias principales se observaron en el lactato de etilo (33%), butanoato de etilo (20%), hexanoato de etilo (10%) y decanoato de etilo (10%). Hranilovic et al. (2017b) informaron aumentos en los ésteres del ácido acético totales que variaron entre el 29% y el 33%. En contraste, los estudios que compararon fermentaciones en cultivo puro de *L. thermotolerans* y *S. cerevisiae* informaron niveles más bajos de ésteres de acetato y ésteres etílicos, por lo que no podemos concluir que la mayor cantidad de formación de ésteres se deba enteramente a *L. thermotolerans* (Escribano et al., 2018). Comitini et al. (2011) informaron aumentos para fermentaciones de cultivo mixto de aproximadamente 3 mg/L de lactato de etilo (como resultado de una mayor producción de ácido láctico en fermentaciones que involucran a *L. thermotolerans*), en comparación con el control de *S. cerevisiae*, mientras que no se observaron diferencias en la producción de acetato de etilo e isoamílico.

Estudios han demostrado una menor producción de ácido hexanoico y ácido octanoico por la mayoría de las cepas de *L. thermotolerans* en fermentaciones combinadas, mientras que no se han observado efectos en el ácido decanoico (Comitini et al., 2011). Sin embargo, se ha encontrado que algunas cepas de *L. thermotolerans* producen altos niveles de ácido isovalérico (Escribano et al., 2018), el cual se considera un compuesto altamente indeseable en los vinos debido a su característica sensorial negativa de "queso" o "calcetines sudados". Las concentraciones finales de este compuesto variaron de 0,95 a 2 mg/L, dependiendo de la cepa estudiada.

En cuanto a la acetoina, *L. thermotolerans* produjo concentraciones finales más bajas que el control de *S. cerevisiae* (11,9 mg/L) tanto en inoculaciones puras (3,4 mg/L) como secuenciales (2,2 mg/L) en un estudio de Ciani et al. (2006), mientras que otros autores no observaron diferencias estadísticamente significativas (Chen et al., 2018). Sin embargo, hay una variabilidad excepcionalmente grande (casi del 100%) en la producción de acetoina, dependiendo de la cepa investigada (Escribano et al., 2018).

Antocianos y polifenoles en general

En cuanto a los antocianos, el primer estudio sobre levaduras *L. thermotolerans* y vino tinto informó un aumento significativo (~10%) en la intensidad del color en fermentaciones secuenciales con *S. cerevisiae* en comparación con el control de *S. cerevisiae* solo (Benito et al., 2015b). Este fenómeno se atribuyó a una mayor coloración de las moléculas de antocianina a un pH más bajo y, en este caso específico, fue una consecuencia del aumento de la formación de ácido láctico durante la fermentación de *L. thermotolerans*. Estudios posteriores observaron otro fenómeno relacionado con la disminución de la adsorción de antocianinas de uva por parte de *L. thermotolerans* (Benito et al., 2017), con niveles finales más altos de antocianos de la misma uva. Hranilovic et al. (2017b) informaron un aumento de aproximadamente el 8% en las concentraciones finales de antocianinas después de la fermentación alcohólica que involucra a *L. thermotolerans* en comparación con el control de *S. cerevisiae*.

Metabolismo del nitrógeno

Las fermentaciones puras de *L. thermotolerans* no producen concentraciones finales más altas de compuestos de nitrógeno asimilable en comparación con el control puro de *S. cerevisiae*. Sin embargo, las inoculaciones mixtas y secuenciales con *L. thermotolerans* y *S. cerevisiae* han mostrado aumentos de aproximadamente 25 mg/L (Ciani et al., 2006).

Las fermentaciones alcohólicas secuenciales que involucran a *L. thermotolerans* y *S. cerevisiae* también han demostrado producir mayores concentraciones finales de lisina, un precursor de la amina biogénica cadaverina, en comparación con el control de *S. cerevisiae* (Benito et al., 2015a, b). Otros precursores de aminas biogénicas como ornitina y tirosina también han aumentado ligeramente después de las fermentaciones que involucran a *L. thermotolerans* (Benito et al., 2015a; Benito et al., 2016b). El envejecimiento "sobre lías" durante más de 4 meses en vinos de *L. thermotolerans* resultó en concentraciones más altas de histidina, tirosina, ornitina y lisina en comparación con los controles de *S. cerevisiae*, aunque no hubo diferencias en las concentraciones finales de aminas biogénicas (Belda et al., 2016). Si bien no hay una relación directa entre los aminoácidos precursores y la formación de aminas biogénicas a través de la descarboxilación microbiana, la selección de cepas con baja producción/liberación de estos aminoácidos específicos puede ayudar a reducir las preocupaciones relacionadas con la seguridad alimentaria del vino.

Los niveles más altos de ciertos aminoácidos como leucina e isoleucina en fermentaciones secuenciales con *L. thermotolerans* a menudo están asociados con una disminución en la producción de alcoholes superiores como 3-metilbutanol y 2-metilbutanol en comparación con los controles de *S. cerevisiae* (Benito et al., 2015a; Benito et al., 2016b). Escribano et al. (2018) observaron niveles finales más altos de nitrógeno asimilable (~41 mg/L) en fermentaciones de cultivo puro de *L. thermotolerans*, lo cual podría estar relacionado con una menor necesidad de nitrógeno, una mayor liberación de nitrógeno o fermentaciones incompletas de azúcares.

Polisacáridos y manoproteínas

Especies específicas de no-*Saccharomyces* desempeñan un papel clave en la elaboración actual de vinos al aumentar las concentraciones de polisacáridos y manoproteínas en los mismos (Domizio et al., 2014, 2017). La presencia de estos compuestos influye

directamente en la calidad del vino, especialmente en los parámetros relacionados con la sensación en boca. Sin embargo, un estudio de cinco cepas de *L. thermotolerans* informó de una variabilidad de aproximadamente el 38% en las concentraciones de polisacáridos después del proceso de fermentación (Comitini et al., 2011). En el mismo estudio, la concentración más alta de polisacáridos entre las cepas de *L. thermotolerans* fue de 260 mg/L, mientras que las concentraciones más altas entre los controles de *S. cerevisiae* fueron de 152 mg/L.

Gobbi et al. (2013) informaron de aumentos en las concentraciones de polisacáridos que variaban entre el 30% y el 60% en fermentaciones puras que involucraban a *L. thermotolerans*, en co-cultivos, en inoculaciones secuenciales de 24 horas y en inoculaciones secuenciales de 48 horas, en comparación con el control de *S. cerevisiae*. Los efectos fueron influenciados por la modalidad de inoculación, pero no por la temperatura.

El uso de *L. thermotolerans* en el envejecimiento sobre lías no ha demostrado producir concentraciones finales más altas de manoproteínas en comparación con el control de *S. cerevisiae* después de 4 meses; como era de esperar, el control de *S. cerevisiae* produjo aproximadamente un 50% más de manoproteínas expresadas en concentración de manosa (Belda et al., 2016).

Influencia sensorial en el vino

Benito et al. (2015b) informaron que las fermentaciones secuenciales de *L. thermotolerans* mejoraron la percepción de la acidez. Esta percepción estuvo relacionada con los niveles incrementados de ácido láctico (en aproximadamente 3 g/L) que redujeron el pH en aproximadamente 0.21. En consecuencia, la impresión general de un mosto de uva inicial con baja acidez mejoró significativamente para el vino final cuando se utilizó *L. thermotolerans* para las fermentaciones. El mismo estudio informó de una mayor percepción de dulzor en los controles realizados por *S. cerevisiae*, aunque todos los vinos contenían

niveles similares de azúcares residuales. Este efecto parecía estar relacionado con las diferentes percepciones que dependían del equilibrio entre la acidez y el dulzor.

En varios estudios, la percepción de una mayor intensidad de color en el vino tinto fermentado por *L. thermotolerans* (Benito et al., 2015b; Benito et al., 2016b; Benito et al., 2018a) se puede explicar por la baja capacidad de adsorción de antocianinas de *L. thermotolerans* (Hranilovic et al., 2017a, b; Benito et al., 2018a) y el aumento de los colores rojos y morados a valores de pH bajos (Benito et al., 2016b). La disminución del tono también parecía estar relacionada con efectos similares.

Glutación

El glutación posee propiedades antioxidantes que son interesantes en la elaboración de vinos para evitar cambios perjudiciales en el color y los aromas. También permite reducir la adición de dióxido de azufre, que es un compuesto peligroso, especialmente para grupos específicos en riesgo, como las personas que padecen asma, y sus límites legales han disminuido en los últimos años. Algunas cepas no-*Saccharomyces* se han reportado recientemente como productoras potentes de glutación. Tres cepas de *L. thermotolerans* contienen glutación en concentraciones que varían de 0.205 a 0.537 nmol/mg de células, mientras que el control de *S. cerevisiae* muestra 0.095 nmol/mg de células. *L. thermotolerans* produce de 2 a 5 veces más glutación que *S. cerevisiae*. Sin embargo, la variabilidad de las cepas en la producción de glutación es del 60%. Por esta razón, la producción de glutación puede ser un parámetro de selección interesante para futuros procesos de selección de cepas de *L. thermotolerans*.

Combinación con otros microorganismos en la tecnología del vino

Saccharomyces cerevisiae

Esta levadura conocida desde hace mucho tiempo es el pilar básico de las fermentaciones de prácticamente todos los vinos en el mundo. Y por esta condición también lo es para esta vinificación secuencial, que sin ella no podría desarrollarse por completo dejando en el vino azúcares residuales que predisponen al mismo a una posible desviación microbiológica.

La modalidad secuencial es la que permite que *L. thermotolerans* influya más en la composición química final del vino. Esto se debe a que *Saccharomyces* suele inhibir el crecimiento de *L. thermotolerans* tan pronto como se inocula. La tabla siguiente resume los diferentes resultados en cuanto a ácido láctico, pH y acidez total de los trabajos originales que utilizaron fermentaciones secuenciales entre *L. thermotolerans* y *Saccharomyces*.

Tabla 6

Diferentes estudios realizados en base a la producción de ácido láctico y el consecuente incremento de la acidez total y descenso del pH

Estudio	Producción ácido láctico (g/L)	Incremento en la acidez total (g/L)	Descenso del pH
Kapsopoulou, 2007	1,8 – 5,13	2,04 – 5,2	0,13 – 0,3
Comitini, 2011	No hay datos disponibles	1,8	0,23
Gobbi, 2013	6,38	5,1	0,26
Benito, 2015	1,22	No hay datos disponibles	0,12

Benito, 2015	2,75	No hay datos disponibles	0,22
Benito, 2016	3,18	No hay datos disponibles	0,18
Balicki, 2016	No hay datos disponibles	1,76 - 2	0,12
Benito, 2016	2,96	No hay datos disponibles	0,21
Benito, 2017	2,44	No hay datos disponibles	0,15
Chen, 2018	1,7	1,2	0,11
Dutraive, 2019	1,51	No hay datos disponibles	0,2
Benito, 2019	1,63	No hay datos disponibles	0,17
Morata, 2019	6,6	3,5	0,27
Blanco, 2020	7,1	5,7	0,3
Romani, 2020	0,78	1,58	0,26
Sgouros, 2020	10,4	12,08	0,29
Hranilovic, 2021	1 – 8,1	0,1 – 6,1	0,02 – 0,54
Snyder, 2021	0,2 – 6,1	0 – 6,2	0 – 0,33

Oenococcus oeni

Algunos estudios han introducido *Oenococcus oeni* en las combinaciones entre *L. thermotolerans* y el género *Saccharomyces* con el fin de obtener vinos estables desde un punto de vista microbiológico con un ligero aumento del ácido láctico final durante la fermentación alcohólica. Esta combinación puede aumentar el contenido final de ácido láctico en aproximadamente un 10% en comparación con el control secuencial de *L. thermotolerans* sin bacterias lácticas.

El uso regular de esta estrategia generalmente comprende una co-inoculación inicial entre *L. thermotolerans* y *O. oeni* después de 24 horas, mientras que *S. cerevisiae* se inocula después de 48-72 horas. Estudios recientes han demostrado que algunas cepas de *L. thermotolerans* promueven la fermentación maloláctica, mientras que otras la inhiben. La presencia de ácido láctico en sí mismo inhibe la fermentación maloláctica. Niveles superiores a 6 g/L pueden inhibir completamente la fermentación maloláctica. Estos hechos justifican el interés reciente en las co-inoculaciones entre *L. thermotolerans* y *O. oeni* al comienzo de la fermentación alcohólica. Sin embargo, esta nueva modalidad de fermentación puede llevar al riesgo de un aumento del ácido acético cuando *O. oeni* metaboliza los azúcares; este riesgo disminuye si la fermentación alcohólica se lleva a cabo correctamente, sin detenerse ni volverse lenta. Estudios recientes han informado aumentos en el ácido acético en comparación con la co-inoculación y la inoculación secuencial clásica de *O. oeni*, que varían de 0.03 a 0.2 g/L. Un estudio informó aumentos en el ácido acético de aproximadamente un 50% para fermentaciones malolácticas secuenciales clásicas después de una fermentación secuencial entre *S. cerevisiae* y *L. thermotolerans*.

Ya con la gran presencia de ácido láctico en el medio llevada a cabo por *L. thermotolerans*, no es fácil que se produzca la fermentación maloláctica debido a la inhibición que ejerce el mismo como producto de reacción.

Acidez y pH

Estos dos conceptos son de vital importancia para el desarrollo de esta investigación. Son dos parámetros que varían durante el transcurso de transformación del mosto en vino y también durante la conservación del mismo.

Nos interesa conocer esta variación y evolución ya que es el objeto principal de estudio del trabajo. A lo largo del capítulo iremos desglosando conceptos que nos van a permitir interpretar de mejor manera los resultados obtenidos en la experiencia.

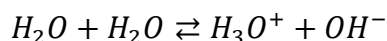
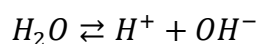
Conceptos preliminares

pH

El término “pH” se define como el menos logaritmo de base 10 de la concentración molar de los protones o hidrogeniones (H^+).

El físico holandés Sørensen fue el que propuso operar este concepto con logaritmos para evitar los cálculos con cantidades muy grandes en decimales, al igual que expresar los resultados en positivo para mayor comodidad.

En el agua, la concentración molar de hidrogeniones es igual a la concentración molar de los aniones oxhidrilos (OH^-). Se puede explicar con el concepto de autoionización del agua:



$$K_c = \frac{[H_3O^+]. [OH^-]}{[H_2O]^2}$$

$$[H_2O]^2 \cdot K_c = [H_3O^+]. [OH^-]$$

$$K_w = [H_3O^+]. [OH^-]$$

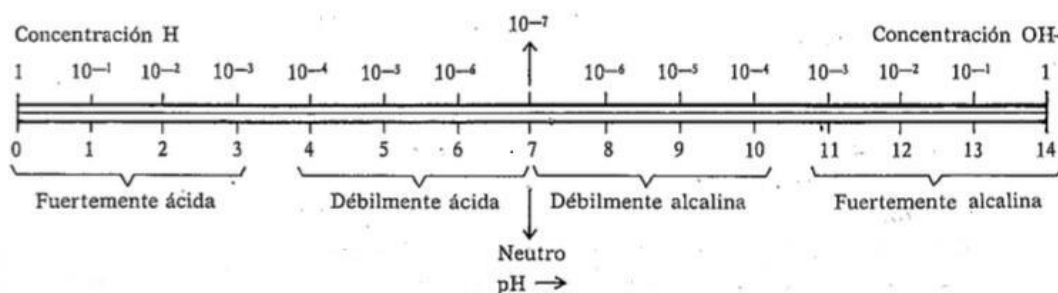
$$K_w = 10^{-7} \cdot 10^{-7}$$

$$K_w = 10^{-14}$$

El producto iónico del agua (K_w) genera una escala de pH que matemáticamente está definida entre 0 y 14 de la siguiente manera:

Figura 10

Escala de pH extraída de Enología: teórico practica / Francisco Oreglia / Tomo 1



De manera que las soluciones con pH 7 se definen como neutras, las que contienen pH mayor a 7 son básicas y se llaman ácidas a las que contienen pH menor a 7. El mosto y vino son soluciones ácidas con pH comprendido aproximado entre 3 y 4 dependiendo de múltiples factores.

El pH es determinado por vía potenciométrica a través de un peachímetro. Es importante aclarar que este instrumento de medición determina la concentración hidrogeniónica activa del ion hidrógeno y no la concentración molar real del mismo. Esto es importante aclararlo ya que el vino es una solución compleja implicando la presencia de una gran cantidad y variabilidad de iones que generan una atmósfera iónica que entorpece la acción y movimiento normal de los iones por el medio.

Acidez

La acidez como tal no es un solo concepto aislado, sino que dentro de esa palabra existen varias definiciones distintas que nos interesa estudiar.

Se llama “acidez real, iónica, energía ácida o acidez actual” a la suma de los hidrogeniones libres presentes (disociados y ionizados) en una solución.

Se denomina “acidez potencial” a la suma de todas las funciones ácidas no salificadas ni disociadas de una solución.

Se denomina “acidez total” a los mililitros de álcali necesarios para neutralizar las funciones ácidas libres contenidas en un litro de vino. Esta acidez se llama también de titulación y es la que determinamos en laboratorio mediante la volumetría ácido base. Se determina de esta forma al hidrogenión de las funciones ácidas libres, es decir no salificadas de los ácidos presentes en el vino o mosto. La neutralización abarca todo el hidrogenión presente en forma iónica (acidez actual) y todo el hidrogenión indisociado (acidez potencial). Se expresa en gramos de ácido tartárico por litro.

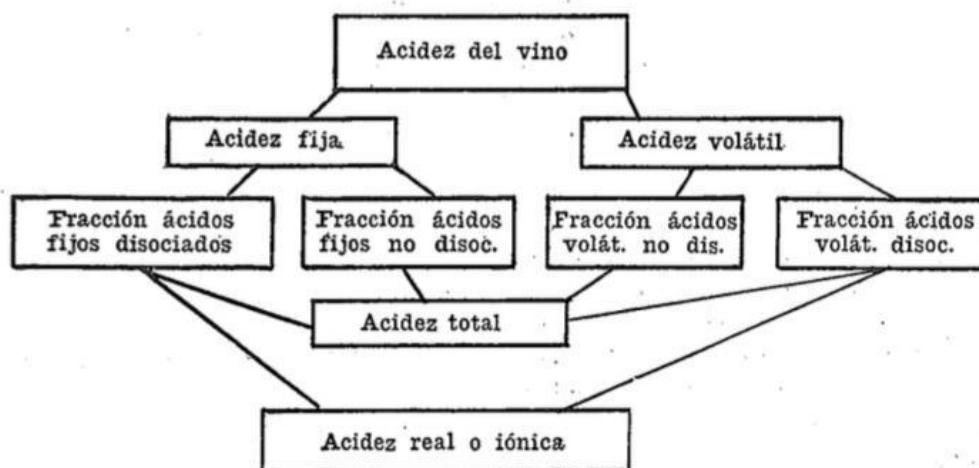
Se llama “acidez volátil” al conjunto de ácidos separables del vino por destilación con corriente de vapor operando en determinadas condiciones. Está constituida por un grupo de ácidos grasos de la serie acética, en los vinos sanos se reduce al ácido acético y se expresa en gramos de ácido acético por litro.

Se llama “acidez fija” al conjunto de todos los ácidos que no son separables del vino, no destilan en las condiciones que si lo hacen los ácidos volátiles. Constituida por los ácidos tartárico, málico, cítrico, láctico, etc. Se obtiene restando de la acidez total la acidez acética.

A continuación se muestra una expresión gráfica de los conceptos mencionados anteriormente:

Figura 11

Clasificación de los ácidos del vino



Poder tampón

Por acción tampón se entiende a la resistencia ofrecida por una solución determinada a la variación de su pH por el agregado de un ácido o álcali, o por efecto de dilución.

Las soluciones amortiguadoras pueden ser de dos tipos: solución de ácido débil más la sal del ácido débil o solución de base débil más la sal de la base débil.

El vino es una solución tampón ya que contiene grandes cantidades de estos sistemas amortiguadores. A medida que el mosto contiene mayor cantidad de minerales (Na^{+1} , K^{+1} , Ca^{+2} , etc.) mayor es el efecto tampón que ejerce el mismo y por lo tanto más difícil es modificar el pH del mismo siendo una situación adversa para el enólogo, teniendo que recurrir a diversas maneras para poder modificar el pH del mosto de partida.

Ácidos del mosto y del vino

Los ácidos del vino y del mosto son orgánicos. Tienen un doble origen, algunos preexisten en el mosto y otros se originan durante la fermentación del mismo y la conservación del vino.

Ácidos preexistentes en el mosto

Ácido tartárico: Es el ácido más abundante en los mostos y en los vinos. La cantidad en el mosto es siempre superior a la que hay en el vino ya que con la conservación del mismo se va perdiendo en forma de tartratos (bitartrato de potasio o tartrato de calcio), estas son sales que son muy poco solubles y más aún con el aumento del grado alcohólico y el descenso de la temperatura. Si bien el bitartrato de potasio es soluble en agua, pero en una solución hidroalcohólica como lo es el vino baja su producto de solubilidad y por lo tanto precipita. Recordemos que el vino es una solución tartárica potásica conteniendo siempre en exceso al potasio y al ácido tartárico.

La presencia de otros ácidos como lo son el málico y el láctico evita parcialmente la formación de grandes cantidades de bitartrato de potasio y tartrato de calcio formando sales de esos ácidos mucho más solubles y por lo tanto evitando la pérdida excesiva de ácido tartárico durante la conservación.

Su fórmula general es $\text{COOH-CHOH-CHOH-COOH}$ con una masa molar igual a 150 g/mol.

Ácido málico: Es el segundo ácido más presente en el mosto; en el vino se puede mantener estable o no si sufre transformaciones. Recordemos que las levaduras son capaces de producir al mismo o también atacarlo y producir otros metabolitos. La alteración que más provoca su pérdida es la fermentación maloláctica producida por las bacterias lácticas.

Las sales que forma son muy solubles, aunque inestables biológicamente ya que el mismo ácido también lo es. Es uno de los 3 componentes que puede comprometer la estabilidad biológica de los vinos junto al azúcar y al NPA.

Mientras más cálida es la zona de origen de la uva menor cantidad se encuentra de este ácido en los mostos y por lo tanto en los vinos, esto se genera cuando las temperaturas nocturnas superan los 20°C respirándose el mismo en grandes cantidades en la baya de uva.

Organolépticamente no nos ofrece buenos resultados siendo un ácido de sabor duro (está en mayor cantidad en las manzanas derivando de allí su nombre), pero en ciertas concentraciones y dependiendo del estilo de vino a elaborar genera sensación de frescura en boca.

Su fórmula general es $\text{COOH-CHOH-CH}_2\text{-COOH}$ con una masa molar de 134 g/mol.

Ácido cítrico: Es el tercer ácido fijo en mayor cantidad en los mostos.

El ácido cítrico puede considerarse como un componente natural de los vinos, ya que esto fue confirmado por los trabajos realizados por numerosos autores, como ser, Denigés en 1908 y 1913, de J.Ribereau-Gayon y E.Peynaud, en 1938. Existe en todo tipo de uvas, tanto verdes como maduras y en mayor cantidad en las afectadas de podredumbre.

La concentración natural de ácido cítrico en los vinos es muy variable, y va de 0 a 500 mg.. Esta cantidad es mucho menor en aquellos vinos en que han sufrido la fermentación maloláctica, ya que las bacterias responsables, si no se las controló a tiempo, luego de consumir el ácido málico, consumen el ácido cítrico y a veces este fenómeno, se produce paralelamente, con la producción de ácido acético y un consecuente aumento de la acidez volátil. En fermentaciones malolácticas inducidas con fermentos malolácticos específicos y liofilizados, que producen algunos laboratorios especializados a nivel mundial, en forma

industrial, este fenómeno (de fermentación paralela) no ocurre, si la misma se detiene a tiempo.

Su fórmula general es $\text{CH}_2\text{-COOH-C(OH)COOH-CH}_2\text{-COOH}$ con una masa molar de 210 g/mol.

Ácidos de neoformación

Desarrollaremos a continuación los ácidos más importantes que se generan durante la fermentación alcohólica, aunque se producen una mayor cantidad de tipos de ácidos a partir de los compuestos secundarios de la fermentación alcohólica como ya se explicó en los capítulos anteriores.

Ácido succínico: Es un producto normal y constante de la actividad de las levaduras, aunque también preexiste en muy baja cantidad en los mostos.

Se presenta en cristales incoloros o blancos, inodoros y de sabor levemente ácido y desagradable. Es soluble en agua, éter etílico y glicerina, pero poco en alcohol. Es un ácido estable biológicamente.

Ácido acético: Es un líquido incoloro que cristaliza en laminillas blancas, se mezcla en todas proporciones con el agua. Es un producto normal de la fermentación alcohólica desarrollado por las levaduras. Su cantidad depende de la materia prima, del sistema y cuidado de la vinificación y también de la levadura que haya fermentado el mosto (importante en nuestro estudio).

El tenor en ácido acético aumenta en la conservación del vino, pero si se descuida y no se lo protege de oxidaciones, puede desarrollarse la flor del vino y luego la picadura acética, oxidándose el etanol a ácido acético, conllevando una enfermedad en el vino.

Su fórmula general es COOH-CH_3 con una masa molar de 60 g/mol.

Ácido láctico: Es objeto de estudio este compuesto químico debido a que es uno de los principales compuestos que es elaborado por *L. thermotolerans* durante la fermentación alcohólica. Si bien al ser una levadura (“hongo del azúcar”) que produce etanol y dióxido de carbono, este grupo se encarga de también elaborar una gran cantidad de metabolitos secundarios y entre tantos posibles como desviaciones de la ruta fermentativa normal, *L. thermotolerans* dirige su metabolismo hacia la producción de ácido láctico en muy grandes cantidades (algo que *S. cerevisiae* no puede hacer normalmente).

Es por todo lo nombrado que nos enfocaremos sobre este compuesto para irlo conociendo cada vez más y sacar el mejor provecho tanto en el plano fisicoquímico como organoléptico que tanta injerencia tiene.

Origen y fuentes de obtención del ácido láctico

El lactato o ácido láctico fue descubierto a partir de leche agria por un ayudante de farmacia sueco, Carl Wilhelm Scheele (1742-1786), en 1780. Benninga aportó una traducción moderna de la técnica de aislamiento de Scheele que citamos parcialmente aquí: El suero agrio se evapora a un octavo de su volumen, posteriormente la cuajada (proteínas de leche precipitadas) se remueve por filtración. El filtrado se satura con leche de cal (hidróxido de calcio), se filtra nuevamente y se diluye con tres veces su volumen de agua. Después de una serie de pasos adicionales, Scheele concluyó que (traducción moderna): El ácido láctico producido es tan puro como el que puede obtenerse mediante reacciones químicas. En el siglo XIX Berzelius (1807) demostró su presencia en el tejido muscular animal y humano, fue reconocido como producto de fermentación por Blonodeaur en 1847 y tan solo en 1881, Littleton inicia la fermentación a escala industrial.

El ácido láctico puede ser obtenido por vía química o biotecnológica. La producción química está basada en la reacción de acetaldehído con ácido cianhídrico para dar lactonitrilo, el cual puede ser hidrolizado a ácido láctico; otro tipo de reacción se basa en la que se somete a alta presión al acetaldehído con monóxido de carbono y agua en presencia de ácido sulfúrico como catalizador. La síntesis química tiene la desventaja que el ácido láctico producido es una mezcla de los isómeros D y L ácido láctico ópticamente inactivo (mezcla racémica), por lo cual el 90 % del ácido láctico producido en el mundo es elaborado por vía biotecnológica. La vía biotecnológica se refiere al metabolismo inducido por los microorganismos y también por organismos superiores, en definitiva, por organismos vivos. Pero si nos centramos en el mundo microbiano, los microorganismos por excelencia son las bacterias lácticas que tienen como principal producto de fermentación a este ácido proveniente de los azúcares mediante el proceso llamado fermentación láctica (hetero u homofermentativa). Estos no son los únicos microorganismos que pueden producir este compuesto, también lo hacen otras bacterias de géneros totalmente distintos pero además las levaduras también lo pueden elaborar en menores cantidades y justamente de esto se trata el presente trabajo.

Las fuentes más importantes del ácido láctico se encuentran en los derivados de la leche (lácteos) mediante la fermentación de la misma (lactosa) con la producción de ácido láctico, de esta reacción química se obtienen distintos alimentos como queso, yogur, manteca, etc. Otras fuentes de alimentos son los vegetales fermentados en salmuera (pickles, aceitunas y chucrut), y por qué no destacar a los vinos como fuente de ácido láctico (todos los vinos tienen a este ácido en su composición química normal, aunque en muy distintas concentraciones).

Con respecto a sus usos el lactato se encuentra como ingrediente ácido de productos lácteos agrios, frutas y verduras fermentadas y salchichas y como un modificador o resaltador de sabor en las bebidas carbonatadas. También se ha utilizado en la curtiembre de cueros, en la tinción ácida de lanas y como producto farmacéutico en forma de lactato de calcio; sus ésteres han sido utilizados como solventes de laca y una pequeña cantidad ha sido utilizada en plásticos. El ácido láctico y sus derivados como sales y ésteres son ampliamente utilizados en la industria alimenticia, química, farmacéuticas, del plástico, textil, la agricultura, alimentación animal entre otros. En la industria alimenticia se usa como acidulante y conservante. Las industrias químicas lo utilizan como solubilizador y como agente controlador de pH. En la producción de pinturas y resinas puede ser utilizado como solvente biodegradable. En la industria de plásticos es utilizado como precursor del ácido poliláctico (PLA), un polímero biodegradable con interesantes usos en la industria y la medicina; se considera ésta la principal aplicación del ácido y la causa por la cual ha aumentado considerablemente su demanda.

Propiedades fisicoquímicas del ácido láctico

El ácido láctico, ácido 2-hidroxiopropanoico (IUPAC), presenta a grandes rasgos las siguientes características fisicoquímicas:

El ácido láctico tiene un carbono asimétrico (quiral) lo cual lo dota de actividad óptica. Existen dos isómeros ópticos, el D(-) láctico y L(+) láctico y una forma racémica constituida por fracciones equimolares de las formas L(+) y D(-). A diferencia del isómero D(-), la configuración L(+) es metabolizada por el organismo humano. Tanto las dos formas ópticamente activas como la forma racémica se encuentran en estado líquido, siendo incoloros y solubles en agua.

Su fórmula estructural y desarrollada se presenta en la siguiente figura:

Figura 12

Estructura química de los esteroisómeros correspondientes al ácido láctico



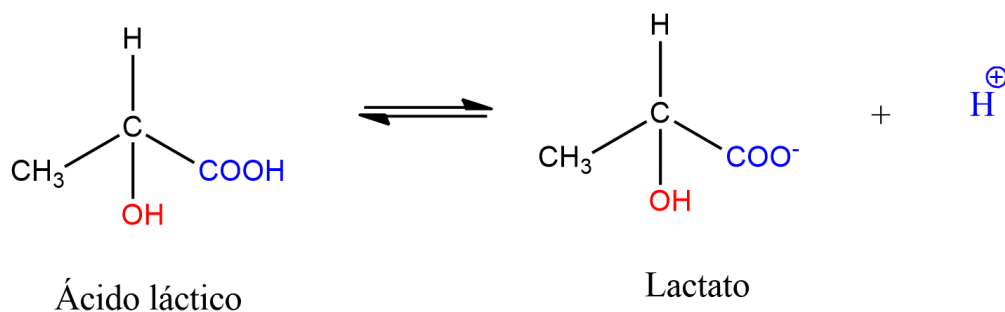
Nota: Su masa molar es igual a 90 g/mol.

Este ácido es sintetizado en la fermentación maloláctica, pero únicamente al isómero óptico L (+), en cambio durante la fermentación alcohólica son producidos los dos isómeros en cantidades iguales debido a que el intermediario es el ácido pirúvico y siempre que aparezca este compuesto se van a elaborar los dos esteroisómeros.

Es un compuesto químico que tiene solo una función ácida (ácido monoprótico) y por lo tanto una constante de ionización:

Figura 13

Ionización del ácido láctico



La constante de equilibrio químico en función de las concentraciones molares para esta ionización vale $1,38 \cdot 10^{-4}$. Esto corresponde a 25°C ya que esta constante (K_a) es dependiente

de la temperatura. Matemáticamente el pKa es igual al menos logaritmo del Ka y por lo tanto para el ácido láctico le corresponde un valor de 3,86.

Este valor nos dice que el ácido láctico es débil al igual que la mayoría de los ácidos orgánicos (mientras más bajo el valor de pKa para un compuesto, más ácido resulta) y si lo comparamos con los ácidos más importantes de la uva y el vino notamos que es aún más débil que estos (tartárico y málico); esto no es solo por el valor de pKa de los ácidos mencionados sino además porque son ácidos polipróticos teniendo en su estructura química a dos protones de hidrógeno capaces de ser liberados. El pKa₁ del ácido tartárico es de 3,04 y el pKa₂ es de 4,36; mientras que para el ácido málico el pKa₁ es de 3,45 y el pKa₂ es de 5,09.

A modo de ilustración de lo mencionado anteriormente analizaremos un ejemplo comparando a 3 soluciones de la misma concentración molar de distintos ácidos (tartárico, málico y láctico):

Se tiene en cuenta a una solución acuosa de 40 milimoles/l de los ácidos indicados, es decir 6 g/L de ácido tartárico, 5,36 g/l de ácido málico y 3,60 g/l de ácido láctico. Es importante aclarar que al pH normal de los vinos, la segunda constante de acidez de los ácidos tartárico y málico prácticamente son insignificantes, por lo tanto los trataremos a estos dos como monoácidos.

$$\frac{(H^+)[A^-]}{[HA]} = K_1$$

Siendo (H⁺) la concentración molar activa del protón hidrógeno, [A⁻] la concentración molar real del anión proveniente del ácido y [HA] la concentración molar real del ácido orgánico.

Se puede sustituir $[A^-]$ por (H^+) y también $[HA]$ por $C - (H^+)$ quedando la expresión de esta manera:

$$\frac{(H^+)^2}{C - (H^+)} = K_1$$

Mediante pasos matemáticos sucesivos se llega a la siguiente expresión de cálculo de pH:

$$pH = -\log \frac{-10^{-pK_1} + \sqrt{10^{-2pK_1} + 4 \cdot 10^{-pK_1} \cdot C}}{2}$$

Reemplazamos los datos en la ecuación obtenida, primeramente, para la solución de ácido tartárico:

$$pH = -\log \frac{-10^{-3,04} + \sqrt{10^{-6,08} + 4 \cdot 10^{-3,04} \cdot C}}{2} = 1,95$$

La solución acuosa de 40 milimoles/l de ácido tartárico tiene un pH de 1,95.

Aplicando la misma fórmula para las otras dos soluciones se obtienen los siguientes valores:

Para la solución de ácido málico un pH de 2,45 y para la solución de ácido láctico un pH de 2,64.

Estado de combinación de los ácidos orgánicos

Sabiendo el pH y la concentración de los ácidos en el vino es posible establecer el balance fisicoquímico de los ácidos; es decir calcular para cada ácido presente en el vino la cantidad que se encuentra libre (ácido molecular), semicombinada (para los ácidos polipróticos) y combinada.

Demostración matemática

Se presenta a un ácido monoácido mediante la simbología HA, en el vino estos ácidos corresponden a los siguientes: acético, láctico, succínico, glucurónico y glucónico. Midiendo al pH se conoce la actividad del ion hidrógeno (no su concentración real), siendo por definición el pH el logaritmo con signo cambiado de esta actividad.

De la disociación de un monoácido se obtiene lo siguiente:



$$(H^+) = K \frac{[HA]}{[A^-]}$$

$$\log (H^+) = \log K + \log \frac{[HA]}{[A^-]}$$

$$-\log (H^+) = -\log K + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

$$pH = pK + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

$$pH - pK = \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

$$10^{(pH-pK)} = \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

Si hacemos que “a” es $10^{(pH-pK)}$ y llamamos “C” a la concentración molar del ácido tendremos lo siguiente:

$$C = [HA] + [A^-]$$

Se puede entonces escribir como:

$$\frac{[A^-]}{[HA]} = a$$

$$[HA] + [A^-] = C$$

En este caso tenemos un sistema de ecuaciones lineales con dos incógnitas en donde:

$[A^-] = a [HA]$ y sustituyendo en la otra ecuación tenemos que:

$$[HA] + a[HA] = C$$

$$[HA](1 + a) = C$$

$$[HA] = \frac{1}{1+a} C$$

$$[A^-] = \frac{a}{1+a} C$$

Entonces, en función del pH y del pK de un ácido monoácido es posible calcular la cantidad de ácido no disociado (libre) y la del ácido disociado (salificado).

Si tomamos a esta ecuación para el ácido láctico obtenemos el siguiente resultado:

Ácido láctico a pH 3,0

$$a = 10^{(3-3,86)} = 0,13803$$

$$[HL] = \frac{1}{1+a} C = \frac{1}{1,138003} C = 0,8787 C \quad [L^-] = 0,1213 C$$

La conclusión es que de 100 moléculas de ácido láctico 87,87 están libres y 12,13 salificadas.

Ácido láctico a pH 3,5

$$a = 10^{(3,5-3,86)} = 0,43652$$

$$[HL] = \frac{1}{1+a} C = \frac{1}{1,43652} C = 0,6961 C \quad [L^-] = 0,3039 C$$

La conclusión es que de 100 moléculas de ácido láctico 69,61 están libres y 30,39 salificadas.

Ácido láctico a pH 4,0

$$a = 10^{(4-3,86)} = 1,38038$$

$$[HL] = \frac{1}{1+a} C = \frac{1}{2,138038} C = 0,46772 C \quad [L^-] = 0,5323 C$$

La conclusión es que de 100 moléculas de ácido láctico 46,77 están libres y 53,23 salificadas.

Es importante comprender que a medida que el pH es más alto, mayor va a ser la cantidad de ácido salificado, lo mismo ocurre con los biácidos como el tartárico y málico. Pero la diferencia más importante que radica acá es que las sales del ácido láctico son más solubles y estables no comprometiendo al vino a una posible quebradura y lo más relevante es que al existir ácido láctico en el medio no todos los minerales se combinan con el ácido tartárico generando sales muy inestables que precipitan naturalmente con la consiguiente pérdida de la acidez en el tiempo al igual que un aumento del pH.

Si realizamos el mismo planteamiento matemático para el caso de un biácido y teniendo en cuenta a sus dos ionizaciones y por lo tanto los dos valores de pK, obtendremos que:

Ácido tartárico a pH 3,5

$$a = 10^{(3,5-3,04)} = 2,884$$

$$b = 10^{(3,5-4,37)} = 0,1349$$

$$[H_2T] = \frac{1}{1+a+ab} C = \frac{1}{1+2,884+2,884 \times 0,1349} C = 0,234 C$$

$$[HT^-] = \frac{a}{1+a+ab} C = \frac{2,884}{1+2,884+2,884 \times 0,1349} C = 0,6749 C$$

$$[T^{-2}] = \frac{ab}{1+a+ab} C = \frac{2,884 \times 0,1349}{1+2,884+2,884 \times 0,1349} C = 0,091 C$$

La conclusión es que de 100 moléculas de ácido tartárico 23,4 están libres y 67,49 semicombinadas (correspondiente al anión bitartrato HT^-) y 9,1 combinadas completamente (correspondiente al anión tartrato T^{-2}).

Ácido tartárico a pH 4,0

$$a = 10^{(4-3,04)} = 9,120$$

$$b = 10^{(4-4,37)} = 0,427$$

$$[H_2T] = \frac{1}{1+a+ab} C = \frac{1}{1+9,120+9,120 \times 0,427} C = 0,071 C$$

$$[HT^-] = \frac{a}{1+a+ab} C = \frac{9,120}{1+9,120+9,120 \times 0,427} C = 0,651 C$$

$$[T^{-2}] = \frac{ab}{1+a+ab} C = \frac{9,120 \times 0,427}{1+9,120+9,120 \times 0,427} C = 0,278 C$$

La conclusión es que de 100 moléculas de ácido tartárico 7,1 están libres y 65,1 semicombinadas (correspondiente al anión bitartrato HT^-) y 27,8 combinadas completamente (correspondiente al anión tartrato T^{-2}).

Estudio comparativo y evaluativo de *Lachancea thermotolerans*

La vinificación con inoculación secuencial consiste en realizar dos inoculaciones de distintos microorganismos, una seguida de la otra para lograr ciertos resultados. En este caso, en algunos ensayos se realizará primeramente la siembra de cultivos seleccionados de *L. thermotolerans* y luego en un tiempo determinado se inoculará con *S. cerevisiae* con el objetivo principal de llevar a rastros de azúcares fermentables los mostos.

Estudios anteriores nos indican que la levadura de importancia para nuestro trabajo (*Lachancea thermotolerans*) ha sido implementada en variedades como Syrah, Malbec, Cabernet Sauvignon y Merlot, en nuestro caso haremos cuatro ensayos distintos contemplando a la misma variedad (Bonarda). La mayoría de los fabricantes de *L. thermotolerans* indican que es para vinos tintos, también hoy en día se usa para vinificaciones en blanco, pero en nuestro caso se realizaran cuatro ensayos como vinificaciones en tinto.

La idea central del proyecto se basa en fermentar caldos provenientes del este mendocino en donde los medios resultan altamente tamponados, debido a sus suelos y clima y es justamente aquí donde se pondrá en evidencia el trabajo que pueda llegar a realizar *L. thermotolerans*.

Los 4 ensayos correspondientes que se realizaron se detallan a continuación:

- 1) El primero consiste en una fermentación llevada a cabo por las levaduras autóctonas (“indígenas”) del lugar por medio de un pie de cuba.
- 2) Este ensayo corresponde a una fermentación por medio de la inoculación de L.S.A (Levaduras secas activas) del género *S. cerevisiae*.

- 3) El tercer ensayo corresponde a la vinificación secuencial entre *L. thermotolerans* y *S. cerevisiae*. La marca comercial de *L. thermotolerans* corresponde a Zymaflore OMEGA LT de Laffort.
- 4) El último es similar al anterior pero con la diferencia de que el fabricante de *L. thermotolerans* corresponde a Lallemand bajo el nombre comercial LAKTIA LEVEL 2.

A lo largo del capítulo se irá desarrollando todas las características de la muestra elegida y también de la propia vinificación realizada.

Origen de la uva

La uva será originaria de zonas cálidas con el objeto de poder evidenciar cómo se manifiesta el trabajo de la levadura en la producción de acidez para bajar el pH del mosto de partida (recordando que en las zonas cálidas el pH siempre es muy superior a las condiciones ideales de fermentación debido a la fuerte respiración de los ácidos orgánicos durante la maduración). Para ello, la muestra será escogida de la zona este mendocina (Montecaseros, San Martín).

Características generales del viñedo

El viñedo cuenta con una superficie de 16 hectáreas de uva bonarda.

La edad del mismo es de aproximadamente 22 años ya que fue implantado en el año 2002.

La poda realizada en el mismo es de tipo mixta tradicional (Guyot) dejando pitón a dos yemas y cargador de unas 5 yemas.

La labranza realizada sobre el mismo es de tipo mínima tradicional con riego superficial tecnificado para el mejor aprovechamiento del agua.

Las labores en verde son realizadas como en la mayor parte de las fincas, contemplando al desbrote, cruzado y despampanado.

La productividad del viñedo es de aproximadamente 180 quintales por hectárea.

Figura 14

Imagen ilustrativa del viñedo



Cosecha

La cosecha fue realizada manualmente con cajas plásticas de 18 kg. En total se cosecharon unas 17 cajas que en total pesaron aproximadamente unos 300 kg. Esta cantidad fue repartida en 4 recipientes fermentadores (correspondientes cada uno a los 4 ensayos distintos) teniendo en cuenta que se repartió por igual la misma cantidad de vendimia en cada uno.

Cabe destacar que para realizar el ensayo número uno (el del pie de cuba) se recolectaron anticipadamente (48 horas) una porción del recipiente fermentador para

comenzar la fermentación alcohólica natural; y así aprovechar los principios fermentativos del pie de cuba.

Estado de madurez al momento de cosecha

Como “índice de madurez” se entiende a ciertos estados de la uva o fórmulas propuestas para determinar la madurez de la misma y fijar el momento óptimo de la cosecha. No todos los índices son importantes para este proyecto, por lo tanto, se eligió a los índices más corrientes para determinar el momento óptimo de cosecha (Grados brix, acidez total y pH). Además, es de súper importancia la cuantificación de los ácidos orgánicos más importantes de la uva y también del ácido láctico antes de ser cosechada, ya que este último es el que más debería variar con el transcurso de la vinificación por el uso de l. thermotolerans.

La temporada de vendimia 2024 nos ofrece un escenario irregular para encontrar el momento más adecuado de cosecha; debido a que en el mes de febrero se detectaron temperaturas máximas superiores a la media registrada en el verano de este año; ocasionando así que la planta sufra un estrés tal que influya en su mecanismo fisiológico de madurez de la baya, deteniéndola o haciéndola evolucionar de manera muy lenta a lo largo del tiempo. En conclusión, la uva comenzó con una producción de azúcares elevada, sufrió estrés y luego la producción de azúcares se detuvo y se hizo muy lenta llegando incluso a nunca completar su estado de madurez fisiológico.

Para seguir el transcurso de la madurez se realizaron muestreos semanales a partir del envero tomando una muestra de 250 bayas recorriendo todo el espaldero y tomando de ambas caras de las hileras y de las partes altas, medias y bajas del racimo. Se tuvo en cuenta evitar tomar muestra antes de las diez de la mañana para evitar el rocío sobre las mismas. Una vez

recolectada la muestra correspondiente se llevó al laboratorio lo más rápido posible para realizar los análisis mencionados.

Figura 15

Imagen de toma de muestra para determinar punto de cosecha



Es importante tener estos parámetros o índices bien identificados y diferenciados en los 4 ensayos realizados ya que de una vasija a la otra cambian los parámetros por más que sea la misma uva encubada. Sin embargo, la cosecha fue realizada a principios de marzo y en ese momento el estado de madurez aproximado de la uva era el siguiente:

.Tenor azucarino (grados brix): 21°

.Acidez total: 5,25g/L

.pH: 3,90

Figura 16

Estado de la uva al momento de cosecha



Los datos descritos anteriormente fueron definidos según el muestreo que se realizó hasta el momento de cosecha. Cabe recalcar que se decidió cosechar aún con ese grado azucarino bajo debido a que durante aproximadamente un mes la madurez se vio totalmente paralizada en esos valores comenzando algunos racimos a deshidratarse rápidamente (estos no fueron cosechados), con el fin de tener una vendimia sana y no arriesgar a tener un mal estado de materia prima fue que se tomó la decisión de cosechar. También es importante tener en cuenta que Bonarda es una variedad a la que le cuesta llegar a un alto tenor azucarino.

El estado sanitario de la uva era muy bueno al momento de la cosecha, esto es importante para no tener variables en el proceso fermentativo ni alteraciones.

Si bien los datos mostrados anteriormente representan a la partida en general, más adelante representaremos los datos en relación a cada ensayo ya que es importante esta diferenciación para luego poder comparar varios aspectos.

Apenas terminada la cosecha la uva fue enviada a la zona de elaboración (Kilómetro 8, Guaymallén) durando el traslado aproximadamente una hora.

Recepción de la materia prima

Una vez ingresada la uva al sitio de elaboración se procede a realizar la operación de despalillado, esta se realizó de forma manual teniendo en cuenta no incorporar raspón sobre el recipiente de fermentación.

Las vasijas de fermentación consisten en unos recipientes plásticos ya usados en otras vinificaciones, perfectamente destartarizados y desinfectados. Los envases no tenían olores ni cedieron sabores de tipo plástico al mosto/vino. Los recipientes contienen un volumen de 83 litros aproximado. Cada uno de ellos fue dotado de tela mosquitera plástica en la parte superior para evitar el contacto de la mosquita del vino con la vendimia estrujada y despalillada. La mosquitera fue sujeta con una tanza para evitar que se saliera del recipiente. Estos recipientes fueron montados sobre una caja plástica para evitar su contacto con el suelo y ser un ambiente más higiénico. La zona de elaboración consiste en un depósito cubierto con buena iluminación y ventilación, piso fácilmente higienizable y techado, libre de contaminaciones y suciedad.

Figura 17

Recipiente de fermentación plástico empleado



Nota: Vasija contenedora del mosto en fermentación alcohólica.

Terminada la operación de despallado, se procedió al encubado de la vendimia y corrección de SO₂ (metabisulfito de potasio).

Fermentación

Previo al comienzo de la fermentación alcohólica, no se realizó el agregado de ningún aditivo más, ni de ácidos orgánicos, clarificantes como tampoco de enzimas pectolíticas que son los insumos agregados más corrientes en las vinificaciones tradicionales a efecto de no desviar los resultados del trabajo.

Para el caso del ensayo número 1, como se comentó anteriormente, se realizó un pie de cuba de aproximadamente el 10 % del volumen total de la vasija. Para realizar esto fue necesario cosechar esa cantidad dos días antes de realizar la cosecha propiamente dicha, a ese volumen de uva se le agregaron 4 g/hl (dosis máxima que se tuvo que utilizar debido a que en

los ensayos posteriores con *L. thermotolerans* no se podía exceder de ese valor de metabisulfito de potasio). Para la corrección de SO_2 se tuvo en cuenta el volumen total de vinificación en el ensayo 1, para evitar futuras combinaciones del SO_2 con el etanal si se corrigiera posteriormente.

Tanto para el ensayo siguiente como en los restantes, se usó la misma cantidad de metabisulfito; respetando así la misma dosis en cada ensayo, sin perjudicar la comparación, dando las mismas condiciones.

Con la idea del pie de cuba logramos que las levaduras *S. cerevisiae* se comiencen a multiplicar en su mayoría llegando a una población suficiente como para comenzar a fermentar un nuevo volumen importante de mosto. Durante esta fermentación alcohólica se llega a producir una cierta cantidad de alcohol eliminando así levaduras indígenas apiculadas. Transcurridas las 48 horas de realizado el pie de cuba se procede a completar el volumen del recipiente fermentador con vendimia.

El control de la fermentación se llevó a cabo midiendo tres veces por día los siguientes parámetros: examen organoléptico, control de temperatura y grados Baumé.

Para realizar la inoculación de LSA en los ensayos número 2, 3 y 4 se tuvo en cuenta lo siguiente. Una vez la vendimia despalillada y sulfitada, se esperaron 12 horas y luego se realizó la inoculación propiamente dicha.

El ensayo N°2 fue inoculado con LSA (*S. cerevisiae*) del laboratorio Lallemand, nombre comercial: LALVIN ICV D254. Es una levadura utilizada para vinos jóvenes que mantienen su frescura teniendo un carácter neutro sobre el perfil del vino. Se buscó esta levadura, de tipo neutro, para que sea más notable en la comparación los trabajos con las diferentes levaduras, por lo tanto, es también la que se utilizó en los ensayos 3 y 4 para completar la vinificación con *L. thermotolerans*.

El mosto inicialmente contenía 300 ppm (partes por millón) de nitrógeno orgánico y 200 ppm de nitrógeno inorgánico, esta cantidad es suficiente para la multiplicación efectiva de levaduras ya que para que ocurra esto se necesita tener en fase mosto 1ppm de NPA por cada gramo por litro de azúcar a fermentar, por lo tanto, se estaba cubierto con cantidad suficiente, por ello en ningún ensayo se agregó al comienzo nutriente. Todo esto fue complementado con un remontaje abierto para la oxigenación que se necesita para la fase logarítmica de multiplicación levaduriana (en todos los ensayos).

Para los ensayos 3 y 4 se tuvo en cuenta lo siguiente: a las 12 horas de que se despalilló la vendimia, se inoculó a *L. thermotolerans* con una dosis de 25 g/hl (recomendada por el fabricante ya sea de Laffort o Lallemmand). Algo sumamente importante de aclarar es que según el tiempo que se deje actuar a esta levadura es la cantidad de ácido láctico que producirá en el medio, debido a que es un trabajo que recurre a la comparación se dejó actuar en ambos ensayos unas 48 horas a *L. thermotolerans* sola. Luego de las 48 horas se inoculó a *S. cerevisiae* (LALVIN ICV D254) teniendo en cuenta el agregado de 10 g/hl de DAP para evitar que la levadura se estrese por falta de NPA (nitrógeno fácilmente asimilable).

Los remontajes realizados durante la fermentación fueron los mismos para los 4 ensayos correspondientes. A las 12 horas de la corrección del SO₂, luego de la inoculación se realizó un remontaje abierto. Una vez que comenzó la fermentación alcohólica y hasta que transcurrieron las $\frac{3}{4}$ partes de la misma se realizaron 3 remontajes por día (uno abierto y dos cerrados). Hacia el final de la fermentación se hicieron 2 remontajes cerrados por día. Todo esto se realizó teniendo en cuenta la incorporación de oxígeno al mosto/vino en su momento de mayor o menor necesidad. En la tabla 6 se muestran las observaciones organolépticas en cada toma de muestra para analizar el curso y cinética de la fermentación, en un solo ensayo se notó olor a reducción lo cual se corrigió inmediatamente con remontaje abierto.

Las temperaturas de fermentación se mantuvieron entre 24 -27 °C. La refrigeración se realizó con botellas cerradas de hielo. Es importante decir que se trató de simular la apertura del envase a la de un tanque común y corriente; por esa razón se cubrían las bocas con tela mosquitera evitando que la mosca del vino ingrese debido a su fácil canal de ingreso.

La fermentación fue regular sin detenimientos y su finalización fue en tiempo y forma; llegando a rastros en un plazo de 5 a 6 días; por lo cual no fue necesario realizar nuevas nutriciones a la levadura.

Fase postfermentativa

Una vez terminada la fermentación alcohólica en cada uno de los ensayos se procedió a desvinar cada vasija y distribuir el vino “gota” en envases adecuados. Como son volúmenes chicos los que se manejan se utilizaron damajuanas de vidrio y bidones plásticos vacíos de estabilizantes de uso enológico como envases para almacenar el vino, a cada uno de estos se las tapó con “tapones” de algodón para evitar el hinchamiento del envase por la gran cantidad de anhídrido carbónico (CO₂) que se sigue liberando durante los últimos gramos de azúcares que siguen consumiendo las levaduras (fermentación lenta). Es importante controlar esta fermentación lenta y el consumo periódico de azúcares que deben llegar a rastros para evitar problemas posteriores o posibles enfermedades.

Desvinado el vino se procedió a separar el vino contenido en los orujos fermentados. Dicho trabajo se realizó con una prensa tradicional obteniendo así el vino “prensa”. El vino prensa de cada uno de los ensayos se mezcló por diferencias en la reubicación del mismo; por ello el tal, no es un parámetro de referencia y de comparación para los resultados de los ensayos realizados.

Terminada la fermentación lenta de los desvines, se analizó completo y se realizaron las correcciones de SO₂ para mantener estable microbiológicamente el vino y no tener desviaciones en los subproductos posibles de producirse. Luego se deja al vino en reposo

durante 15 días para realizar el primer trasiego. Todos los trasiegos incluido el primero se realizaron de manera cuidadosa para no incorporar demasiado oxígeno durante el mismo y evitar al máximo posible oxidaciones y problemas de aumento de acidez volátil. También se utilizaron damajuanas de la misma capacidad para envasar a estos vinos trasegados, una vez hecho el trasiego se realizaron los análisis correspondientes (completo) de cada ensayo para controlar el estado del vino y para realizar corrección de anhídrido sulfuroso (SO_2) en cada ejemplar y de esa manera evitar la fermentación maloláctica que podría viciar a los resultados. Cabe recalcar que cada vez que se utilizó un nuevo envase con el vino trasegado, previamente se desinfectó perfectamente al mismo.

El segundo trasiego fue realizado a los 30 días del primero. En este trasiego se observó una gran cantidad de partículas cristalinas en el fondo de la vasija producto de la insolubilización y precipitación tartárica por las bajas temperaturas. Para evitar desviaciones de resultados analíticos se realizaron todos los controles en el mismo laboratorio con los mismos analistas.

A los 60 días del desvine se realizó el tercer trasiego de la misma manera teniendo en cuenta todo lo indicado anteriormente. Se analizó al vino y se corrigió. Realizada la corrección se decidió por cuestiones de tiempo, espacio de reubicación, estadio del vino e inocuidad del vino, fraccionarlo para su evaluación comparativa. El fraccionamiento se realizó en botellas de 750 ml de vidrio verde y con tapón sintético. Dichas botellas se mantuvieron en un lugar fresco y al abrigo de la luz.

Resultados

Debido a que el trabajo supone la comparación de 4 ensayos que se realizaron de manera simultánea es importante comparar los datos analizados en todo el transcurso de la vinificación, desde la recepción de la materia prima hasta los resultados recogidos durante los trasiegos correspondientes (conservación).

Los datos recogidos una vez la vendimia ya lista para comenzar la fermentación alcohólica se expresan en la siguiente tabla:

Tabla 7

Estado fisicoquímico de la materia prima

Ensayo	Estado físico (integridad)	pH	Acidez total (g/L)	Ácido málico (g/L)	Ácido láctico (g/L)	Grados Brix	Alcohol a producir
1	Excelente	3,91	5,25	1,20	0	20,8	11,80
2	Excelente	3,90	5,10	1,20	0	20,6	11,70
3	Excelente	3,90	5,17	1,20	0	20,8	11,80
4	Excelente	3,89	5,10	1,20	0	20	11,30

Nota: Los datos de acidez total están expresados en gramos por litro de ácido tartárico.

Si bien durante la etapa de recepción de materia prima se tuvo en cuenta cantidades iguales de vendimia repartida para cada ensayo, es importante tener los datos de cada uno por separado a fin de establecer una mejor comparación.

Seguimiento de la fermentación alcohólica

Los resultados escogidos durante la fermentación alcohólica fueron los que se muestran en las siguientes tablas:

Tabla 8

Transcurso de la fermentación alcohólica ensayo N°1

Día	Hora	Temperatura	Grado Baumé	Examen organoléptico	Observaciones
1	6:00	23	11	Normal	Agregado de SO ₂ (4 g/hl)
	14:00	23	11	Normal	
	22:00	24	11	Normal	
2	6:00	24	11	Normal	
	14:00	24	11	Normal	
	22:00	25	10,6	Normal	
3	6:00	26	10,2	Normal	
	14:00	26	9,6	Normal	
	22:00	26	9	Reducción	Agregado de 10 g/hl de DAP + remontaje abierto
	6:00	27	8	Normal	

4	14:00	26	6,8	Normal
	22:00	26	5,4	Normal
5	6:00	25	4	Normal
	14:00	25	2,6	Normal
	22:00	25	1,2	Normal
6	6:00	25	0	Normal
	14:00	25	0	Normal
	22:00	25	0	Normal
	6:00	25	0	Normal

Figura 18

Evolución de la cinética de fermentación (ensayo N°1)

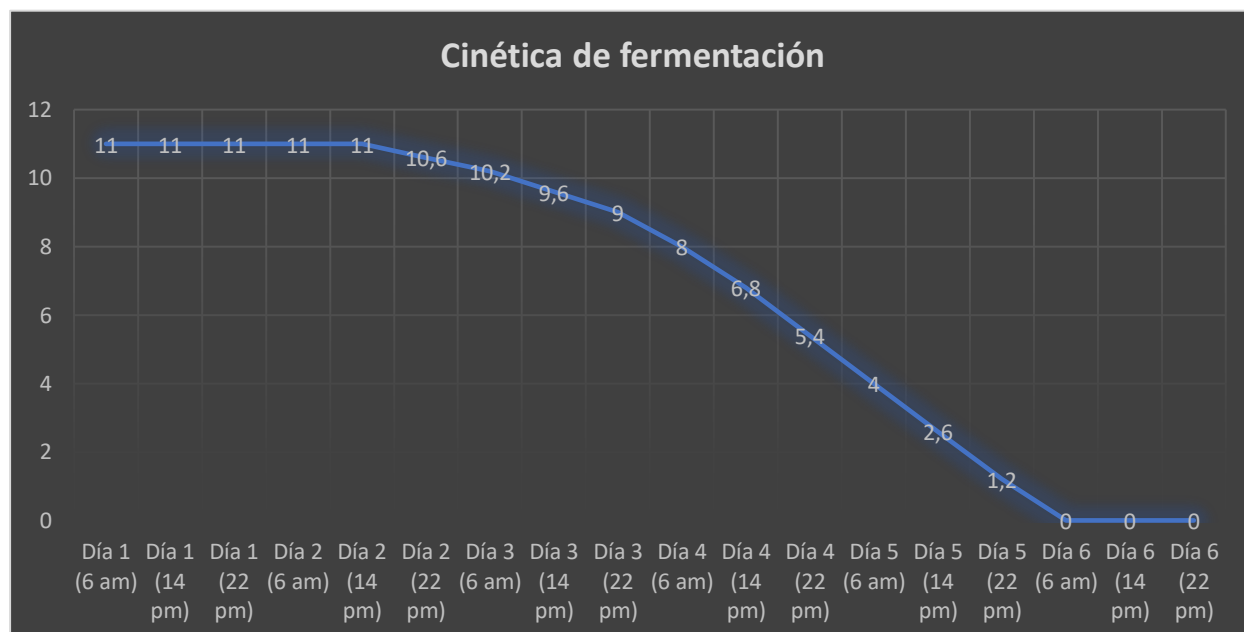
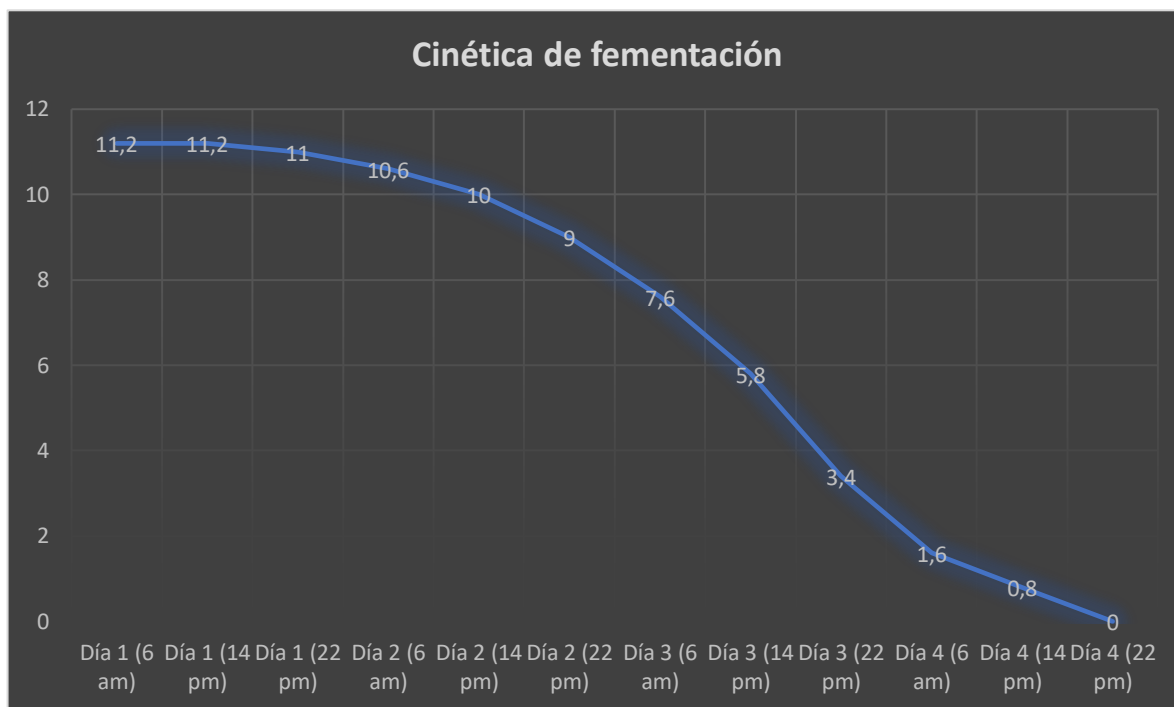


Tabla 9*Transcurso de la fermentación alcohólica ensayo N°2*

Día	Hora	Temperatura	Grado Baumé	Examen organoléptico	Observaciones
1	6:00	24	11,2	Normal	Agregado de SO ₂ (4 g/hl)
	14:00	23	11,2	Normal	Inoculación de LALVIN ICV D254 (25 g/hl)
	22:00	24	11	Normal	
2	6:00	24	10,6	Normal	
	14:00	25	10	Normal	
	22:00	26	9	Normal	
3	6:00	25	7,6	Normal	Agregado de 10 g/hl de DAP
	14:00	26	5,8	Normal	
	22:00	26	3,4	Normal	
4	6:00	26	1,6	Normal	
	14:00	27	0,8	Normal	
	22:00	27	0	Normal	

Figura 19

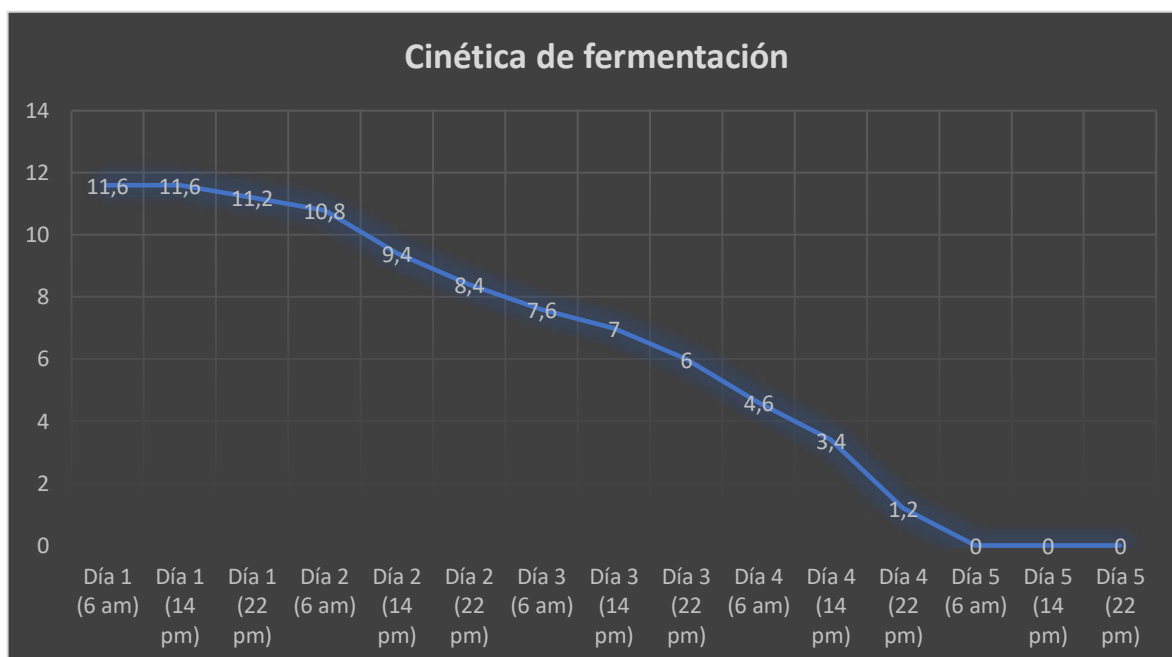
Evolución de la cinética de fermentación (ensayo N°2)

**Tabla 10**

Transcurso de la fermentación alcohólica ensayo N°3

Día	Hora	Temperatura	Grado Baumé	Examen organoléptico	Observaciones
1	6:00	23	11,6	Normal	Agregado de SO ₂ (4 g/hl)
	14:00	23	11,6	Normal	Inoculación de OMEGA LT

					ZYMAFLORE (20 g/hl)
	22:00	24	11,2	Normal	
	6:00	25	10,8	Normal	
2	14:00	25	9,4	Normal	
	22:00	25	8,4	Normal	
	6:00	26	7,6	Normal	
					Inoculación de LALVIN ICV
3	14:00	26	7	Normal	D254 + Agregado de 10 g/hl de DAP
	22:00	25	6	Normal	
	6:00	26	4,6	Normal	
4	14:00	26	3,4	Normal	
	22:00	26	1,2	Normal	
	6:00	27	0	Normal	
5	14:00	27	0	Normal	
	22:00	27	0	Normal	

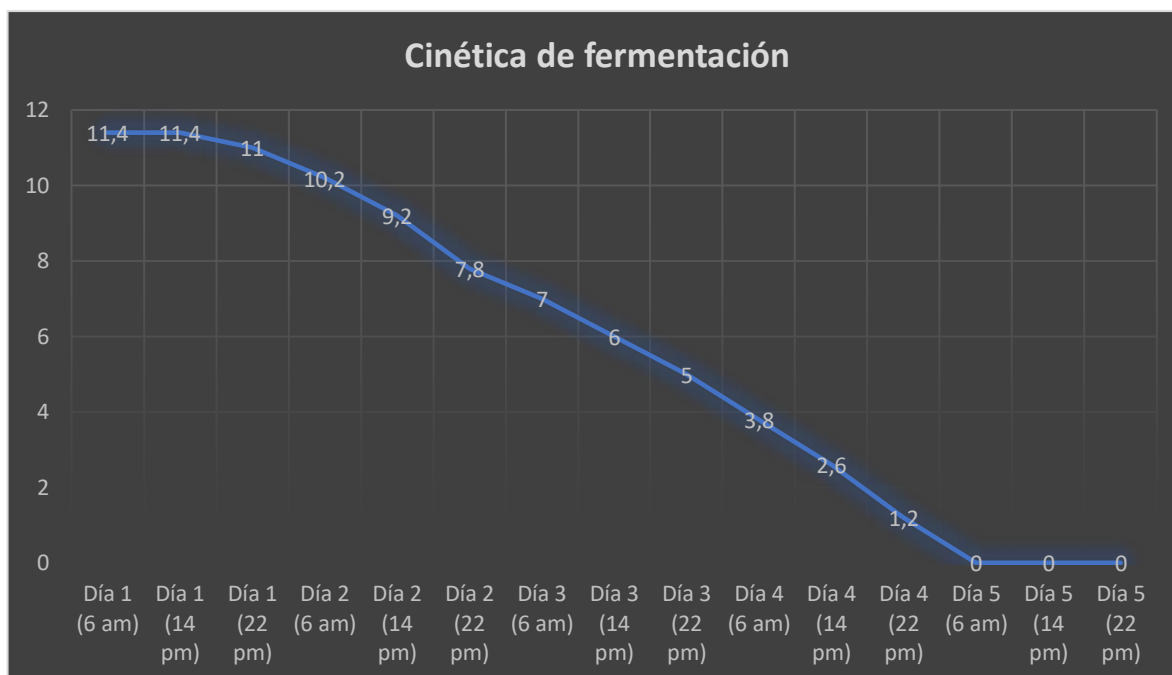
Figura 20*Evolución de la cinética de fermentación (ensayo N°3)***Tabla 11***Transcurso de la fermentación alcohólica ensayo N°4*

Día	Hora	Temperatura	Grado Baumé	Examen organoléptico	Observaciones
1	6:00	25	11,4	Normal	Agregado de SO ₂ (4 g/hl)
	14:00	23	11,4	Normal	Inoculación de LAKTIA LEVEL 2 (25 g/hl)

	22:00	24	11	Normal	
	6:00	24	10,2	Normal	
2	14:00	25	9,2	Normal	
	22:00	26	7,8	Normal	
	6:00	26	7	Normal	
					Inoculación de
					LALVIN ICV
3	14:00	25	6	Normal	D254 +
					Agregado de 10
					g/hl de DAP
	22:00	25	5	Normal	
	6:00	25	3,8	Normal	
4	14:00	25	2,6	Normal	
	22:00	26	1,2	Normal	
	6:00	27	0	Normal	
5	14:00	27	0	Normal	
	22:00	27	0	Normal	

Figura 21

Evolución de la cinética de fermentación (ensayo N°4)



Es importante aclarar que el día “1” hace referencia al momento en que se encuba la vendimia en el recipiente de fermentación.

Como puede observarse la fermentación alcohólica ha transcurrido de manera normal sin interrupciones (en todos los ensayos) que puedan comprometer la estabilidad y desarrollo de la misma.

Conservación

En la segunda etapa de estadio del vino se comienza a trabajar sobre la sedimentación natural del mismo y su conservación microbiológica.

En este periodo el vino comienza a acomplejarse y a sufrir diferentes insolubilizaciones y precipitaciones que van diferenciando su estabilidad tartárica y microbiológica de acuerdo a los ácidos producidos durante la fermentación. Cabe recordar

que solo se ha buscado conservar al vino microbiológicamente con el uso del SO₂ para poder evaluar de forma comparativa las diferencias en cada uno de los ensayos.

Los análisis de los trasiegos realizados se expresan en las siguientes tablas:

Tabla 12

Datos analíticos una vez finalizada la fermentación alcohólica (primer trasiego)

Parámetros analíticos	Ensayo N°1	Ensayo N°2	Ensayo N°3	Ensayo N°4
Azúcar (g/L)	Menor a 1,8	Menor a 1,8	Menor a 1,8	Menor a 1,8
Acidez total (g/L)	4,59	4,72	6,75	6,60
pH	3,93	3,91	3,80	3,81
Acidez volátil (g/L)	0,21	0,23	0,40	0,34
NTU	580	570	575	585
Alcohol (v/v)	11,20	11,30	11,10	11,10
Ácido láctico (g/L)	0,15	0,10	1,86	2,10
Ácido málico (g/L)	1,10	1,12	1,12	1,10
SO₂ Libre (ppm)	8	15	13	10
SO₂ Total (ppm)	44	45	40	38

Tabla 13*Datos analíticos una vez finalizada la fermentación alcohólica (segundo trasiego)*

Parámetros analíticos	Ensayo N°1	Ensayo N°2	Ensayo N°3	Ensayo N°4
Azúcar (g/L)	Menor a 1,8	Menor a 1,8	Menor a 1,8	Menor a 1,8
Acidez total (g/L)	4,42	4,56	6,45	6,40
pH	3,94	3,95	3,82	3,83
Acidez volátil (g/L)	0,30	0,25	0,46	0,40
NTU	120	113	154	130
Alcohol (v/v)	11,20	11,30	11,10	11,10
Ácido láctico (g/L)	0,17	0,11	1,90	2,13
Ácido málico (g/L)	1,08	1,10	1,07	1,10
SO₂ Libre (ppm)	26	23	22	25
SO₂ Total (ppm)	75	77	90	90

Tabla 14*Datos analíticos una vez finalizada la fermentación alcohólica (tercer trasiego)*

Parámetros analíticos	Ensayo N°1	Ensayo N°2	Ensayo N°3	Ensayo N°4
Azúcar (g/L)	Menor a 1,8	Menor a 1,8	Menor a 1,8	Menor a 1,8
Acidez total (g/L)	4,40	4,48	6,52	6,40

pH	3,98	4,00	3,83	3,82
Acidez volátil (g/L)	0,32	0,25	0,46	0,42
NTU	23	34	16	14
Alcohol (v/v)	11,20	11,30	11,10	11,10
Ácido láctico (g/L)	0,18	0,13	1,92	2,15
Ácido málico (g/L)	1,05	1,10	1,06	1,10
SO₂ Libre (ppm)	26	32	32	28
SO₂ Total (ppm)	86	84	105	103

Interpretación del análisis químico

El análisis químico es importante para corroborar la variación de los parámetros más importantes comparando a los diferentes ensayos. No todos los parámetros fisicoquímicos analizados son de igual importancia así que prestaremos atención a la variación con respecto de un ensayo al otro y de un trasiego al otro del pH, acidez total, y el contenido de ácido láctico.

Es normal que una vez los vinos recién elaborados y que luego con el correr del tiempo, con los sucesivos trasiegos abandonen en las borras gran parte de la acidez tartárica en forma de tartratos, trayendo como consecuencia la disminución de la acidez total y el aumento del pH. Este fenómeno es más acentuado en los vinos que provienen de mostos ricos en minerales (K^{+1} , Ca^{+2} , etc.) ya que estos salifican a los ácidos (más comúnmente el ácido tartárico) y los productos resultantes de esas combinaciones (sales orgánicas) tienen bajo producto de solubilidad y por lo tanto precipitan con el paso del tiempo.

Como se ha desarrollado en el capítulo “Acidez y pH”, es importante conocer la composición química del medio para poder saber qué cantidad de ácido orgánico estará en

forma combinada generando sales que luego podrían precipitar. Como norma general, a medida que aumenta el pH del vino, mayor será la cantidad de ácidos salificados y si nos referimos al ácido tartárico, será mayor la formación de bitartrato de potasio y de tartrato de calcio que se insolubilice y precipite.

Lo que se busca investigar a través de este trabajo, es cómo puede hacer variar el pH y la acidez total L. thermotolerans en medios salificados. Si bien la producción de ácido láctico por esta levadura en los ensayos N°3 y N°4 no ha sido abundante como para hacer variar el pH en forma significativa, se ha observado, que el ácido láctico interfirió combinándose con los minerales, formando sales. Las sales del ácido láctico son más solubles que las sales del ácido tartárico y por lo tanto no precipitan.

Si aplicamos lo expuesto en el capítulo "Acidez y pH" sobre el estado de combinación de los ácidos orgánicos:

Para el ensayo N°3 se obtiene:

$$a = 10^{(3,83-3,86)} = 0,9332$$

$$[HL] = \frac{1}{1+a} C = \frac{1}{1,9332} C = 0,5172 C \quad [L]^- = 0,4828 C$$

Este cálculo nos permite ver el índice de combinación porcentual de un ácido según el pH del medio con su contenido salificante. Donde a pH 3,83, el contenido de ácido láctico en la muestra, sin disociar es del 51,72 %; y el resto (48,28 %), se encuentra combinado con los minerales formando sales. Generalmente la sal que con mayor facilidad se forma es lactato de potasio, por la riqueza del catión potasio en los mostos.

Para el ensayo N°4 se obtiene:

$$a = 10^{(3,82-3,86)} = 0,9120$$

$$[HL] = \frac{1}{1+a} C = \frac{1}{1,9120} C = 0,5230 C \quad [L]^- = 0,4770 C$$

De la misma manera que en el ensayo anterior, se mantuvo un porcentaje de combinación de una similar cantidad. El 52,30 % del ácido láctico está en estado libre y el 47,70% combinado con los minerales.

El pH desciende con la producción de ácido láctico desarrollado por *L. thermotolerans*, pero de una manera poco significativa, debido a que es un ácido orgánico débil, que para variar fuertemente el pH debe haber una gran concentración y poca salificación del mismo. Sin embargo, como expone la tabla 4, la variación de pH con respecto a la producción de ácido láctico es variable de un estudio al otro, observando que la producción de ácido comprendida entre 0,2 y 0,3 g/L puede hacer descender el pH entre 0,05 y 0,1; que, si analizamos los datos obtenidos en fase mosto y después en el vino, en nuestros ensayos, esta teoría se cumple. El efecto de “descenso del pH” se ve reflejado al finalizar la fermentación alcohólica, donde cuando comienza el periodo de la conservación se mantiene estable en el tiempo, a diferencia de los ensayos N° 1 y 2 donde el pH aumenta por la salificación natural de los ácidos; que el contenido de ácido láctico formado en los ensayos N° 3 y 4 impide parcialmente dicha salificación. Por lo tanto, se puede decir que el ácido láctico no solo influye como agente acidificante sino también como agente con afinidad a los minerales, formando sales, manteniendo al resto de los ácidos del vino (ácido tartárico) en estado libre.

Con respecto a la acidez total, se observa que la misma varió si comparamos los ensayos N°1 y 2 con los ensayos N°3 y 4, en donde sí participó *L. thermotolerans*. Esta variación fue de aproximadamente 2 g/L; dado el efecto de la producción de ácido láctico en los ensayos N°3 y 4. Si bien, esta cantidad no es significativa, ya que la teoría nos afirma que esta levadura es capaz de producir hasta más de 9 g/L de ácido láctico, este valor depende del

tiempo que se deje actuar a *L. thermotolerans*; que en nuestro caso para poder hacer una buena comparación y no tener desvíos, fue de 48 horas.

Con respecto al azúcar residual en todos los casos llegó a rastros (menos de 1,8 g/L de azúcares reductores), lo cual es muy favorable para evitar una posible degradación de la misma impidiendo la síntesis de compuestos (ácido láctico) que puedan desviar los resultados obtenidos. La vinificación secuencial nos da seguridad con respecto a esto, ya que al utilizarse a *S. cerevisiae* es más viable llegar al consumo total de los azúcares, que con *L. thermotolerans* no se garantiza dicho consumo.

A contraparte de la teoría explicada en el capítulo “*Lachancea thermotolerans*”, la acidez volátil ha sido más alta en los ensayos N° 3 y 4 comparado con los demás donde no ha participado esta levadura. De todos modos, son valores normales para una vinificación en tinto, pero es importante destacar que en este caso *L. thermotolerans* ha producido una mayor cantidad de ácidos volátiles, teniendo en cuenta que en todos los ensayos se han dado las mismas condiciones.

El ácido málico es un ácido orgánico al cual se le debe prestar atención durante la conservación del vino. En los cuatro ensayos se observa que la variación del mismo durante la vinificación no ha sido significativa, manteniéndose en valores normales. En la conservación del vino se mantuvo al SO₂ en valores suficientes como para evitar la fermentación maloláctica y no tener producción de ácido láctico que no provenga específicamente de *L. thermotolerans*, evitando así desviaciones microbiológicas.

El estudio de esta tesina busca hacer el análisis de los vinos de manera rápida a meses de haber terminado la fermentación alcohólica, con el objetivo de tener los parámetros de acidez y pH que obtuvo la levadura *L. thermotolerans* y poderlos comparar con vinificaciones tradicionales; pero se entiende que, si los resultados no son los debidos y se pone en riesgo la

sanidad del vino, hay que realizar correcciones de manera de estabilizarlo microbiológicamente. Dichas correcciones de pH y acidez nos garantizarían una estabilidad y una mejor percepción del vino, pero no apreciaríamos los verdaderos resultados. Por eso el curso de trabajo tomado en base al ácido málico y láctico, fue pensado para que resalte los valores reales en condiciones igualitarias y comparativas.

El SO₂ libre y total ha tratado de mantenerse en valores normales de vinificación durante todo el proceso. En cada trasiego se fue corrigiendo el mismo para evitar todo tipo de proliferación microbiana, oxidaciones, etc. Es importante que durante la fermentación se mantengan valores bajos de SO₂ libre y total para no interferir la acción de *L. thermotolerans* y no generar grandes cantidades de etanal en el medio que luego combinan de manera irreversible al mismo, pero sin descuidar también su función selectiva hacia las bacterias lácticas para no tener dudosos resultados. La producción de ácido láctico por *L. thermotolerans* está influenciada por la cantidad de SO₂ que contenga el medio. Por ello es que se agregó una dosis baja del mismo durante la etapa prefermentativa, y luego ya en la conservación se lo corrige para mantenerlo en valores adecuados.

Con respecto al alcohol etílico, antes de hacer una evaluación analítica, hay que tener en cuenta que el momento de cosecha en uno de los ensayos fue una parte diferente (ensayo N°1: pie de cuba); y en el resto de los ensayos (N°2,3 y 4) se cosechó el mismo día. Teniendo esta apreciación se pudo observar que en los ensayos N°3 y 4 la producción de alcohol fue menor y esto se debe a que la levadura *L. thermotolerans* degradó los primeros gramos de azúcar para la producción del ácido láctico; los azúcares restantes fueron consumidos normalmente por la levadura *S. cerevisiae*. Cabe destacar que hay una pequeña diferencia en el contenido azucarino inicial de cada uno de los tarzas, esto puede haberse debido a variaciones comunes en el encubado.

Análisis organoléptico

Este análisis comenzó cuando fue procesada la uva en donde no se le encontró alteraciones de ningún tipo debido a que la sanidad de la misma era buena. Luego, durante la fermentación alcohólica no se observaron desviaciones, solo en momentos puntuales una pequeña reducción en uno de los ensayos, pero a nivel sensorial la evaluación fue buena. Finalizada la fermentación y desvinado el vino, se pudo examinar de manera más detallista las características sensoriales del mismo y encontramos diferencias en los ensayos.

Con respecto a la vista, el color de los vinos, tanto cuando termina la fermentación alcohólica hasta su posterior conservación, se presentó de manera rojo violeta intenso indicando la importancia que tiene la variedad en el mismo y la tecnología de vinificación. En esto también influye el contenido de SO₂ ya que este se puede combinar con los antocianos en su forma de catión flavilium y por lo tanto transformarse en leucoantocianos (sin color). De todas maneras, esta es una reacción reversible con el tiempo y además los 4 ensayos presentan similares cantidades de anhídrido sulfuroso total. El color de los vinos fue evolucionando con el correr del tiempo como se indicará más adelante.

En la nariz, durante el primer y segundo trasiego los ensayos N°3 y 4 presentaban aromas que recuerdan a vegetales en fermentación (acetoína, lactonas, etc.), en cambio los ensayo N°1 y 2 se percibían con aromas vinosos que recuerdan a la variedad de origen del vino.

En boca se sentían normales los 4 ensayos, con la salvedad de que los ensayos N°3 y 4 contenían gusto que provienen de los aromas mencionados anteriormente y también se sentía una mayor acidez debido al ácido láctico producido. Con el transcurrir del tiempo ya en el tercer trasiego, los ensayos en donde participó *L. thermotolerans* se presentaron reducidos en aroma a acetoína estando más vinosos y mejores en boca en donde la misma acidez láctica, que antes era fuerte, se hizo más redonda y agradable.

Una vez terminada la fermentación alcohólica y realizados los 3 trasiegos en cada ensayo, se dejó pasar un tiempo determinado y se decidió realizar una degustación de los vinos a fin de poder evaluar concretamente ya los resultados. La degustación se realizó en un lugar con buena iluminación y justa ventilación, sobre fondos blancos y libre de cualquier contaminación ambiental. En ella participaron 10 personas, entre ellos había bromatólogos, profesores, enólogos y estudiantes de enología.

Figura 22

Ficha del análisis sensorial de los ensayos

FICHA PARA EL ANÁLISIS SENSORIAL DE VINOS																					
Degustador																					
Denominación del vino		Año		Número de ensayo				Otro/s dato/s													
Fecha		EXAMEN						CONSIDERACIONES GENERALES													
		Excelente	Óptimo	Buena	Suficiente	Mediocre	Insuficiente	Negativo	VISTA				NARIZ				BOCA				
	VISTA	Transparencia	6	5	4	3	2	1	0	R	B	MB	E	R	B	MB	E	R	B	MB	E
		Tonalidad	6	5	4	3	2	1	0	Tonalidad				Intensidad				Estructura			
		Intensidad	6	5	4	3	2	1	0	Velado	Varietal	Aroma a cuero	Varietal	Ligero							
	OLOR	Limpieza	6	5	4	3	2	1	0	Brillante	Aromas 1°	Madera	Buena entrada	Tánico							
		Intensidad	8	7	6	5	4	2	0	Evolución	Aromas 2°	Eucalipto	Limpio	Postgusto							
		Finura	8	7	6	5	4	2	0	Tonos negros	Limpio	Mermelada	Suave	Final largo							
		Armonía	8	7	6	5	4	2	0	Rojo intenso	Frutado	Complejo	Equilibrado	Final corto							
	GUSTO	Limpieza	6	5	4	3	2	1	0	Rojo violáceo	Floral	Pimienta negra	Frutado	Madera							
		Intensidad	8	7	6	5	4	2	0	Rojo rubí	Neutro	Cocido	Amargo								
		Cuerpo	8	7	6	5	4	2	0	Rojo azulado	Reducción	Higos	Sucio								
		Armonía	8	7	6	5	4	2	0		Evolucionado		Redondo								
		Persistencia	8	7	6	5	4	2	0		Elegante		Ácido								
	VALOR GLOBAL	Post gusto	6	5	4	3	2	1	0		Aromas lácticos		Untuoso								
											Pan tostado		Poco cuerpo								
											Frutos rojos		Especiado								
											Especiado		Ataque dulce								
												Café		Desequilibrado							
												Canela		Astringente							
	PUNTUACIÓN TOTAL										Herbáceo		Amargo								
											Pimienta		Salado								
Observaciones:																					

Como se puede observar en la figura 22, en ella se encuentran todos los parámetros sensoriales que se analizan en una degustación (vista, nariz y boca), en cada uno de estos hay variables que pueden cambiar con respecto de un ensayo a otro; y el objetivo principal del análisis sensorial es poder identificar a estas variables y compararlas entre los ensayos.

Para llevar a cabo la interpretación del análisis sensorial se realizará un breve resumen general de cada parámetro evaluado por los catadores sobre cada uno de los ensayos.

Ensayo N°1. En la vista el vino se presenta transparente, brillante y de color rojo intenso.

En la nariz se presenta limpio, con buena intensidad aromática y armonía. Los aromas encontrados en general son los de la variedad (frutos rojos, higos y mermelada).

En boca es ligero, de buena entrada, equilibrado y afrutado, de final corto y con poca persistencia. El postgusto es agradable.

En general, el vino recuerda al varietal respetando los aromas y gustos del bonarda. No presenta defectos ni alteraciones.

Ensayo N°2. En la vista el vino se percibe transparente, brillante y de color rojo intenso con algunos tonos negros.

En nariz es limpio, con buena intensidad aromática y armónico. Contiene una mayor complejidad aromática, encontrando aromas primarios como frutos rojos y mermelada (“cocido”) y también aromas secundarios de fermentación.

En boca es de buena entrada, ligero, suave, redondo y algo untuoso. La persistencia es baja siendo también de final corto, el postgusto es agradable.

En general, el vino se presenta normal al análisis sensorial, no contiene defectos ni alteraciones.

Ensayo N°3. Se percibe en la vista de manera brillante y transparente, de buena intensidad colorante y de una tonalidad roja con tonos negros.

En la nariz se presenta con buena intensidad aromática pero no tan limpio, fino y armónico como los dos anteriores. Contiene aromas secundarios de fermentación sumado a aromas herbáceos, especiados y lácticos. Los aromas primarios no son percibidos fácilmente como en los ensayos anteriores.

En la boca es ácido, especiado, desequilibrado, de final corto y postgusto no tan agradable. Es de poca persistencia y la armonía se ve alterada por lo descrito anteriormente.

En general, el vino no contiene defectos ni alteraciones.

Ensayo N°4. El color del vino es rojo con tonos negros pero de mayor intensidad que en los 3 casos anteriores. En la vista también se percibe transparente y brillante.

En nariz se encuentran aromas secundarios, lácticos y notas acéticas (pickles). Los aromas primarios no son tan fáciles de detectar. La intensidad aromática es buena aunque no es fino ni armónico.

En la boca es ácido, especiado y desequilibrado. No tiene buena persistencia siendo también de final corto. El postgusto no es tan agradable como en los primeros ensayos.

En general, el vino no contiene defectos ni alteraciones.

El vino que mayor puntaje global obtuvo fue el correspondiente al ensayo N°1, seguido por el ensayo N°2. Los ensayos N°3 y 4 presentaron puntajes similares.

Evaluación de costos

Para la siguiente evaluación y comparación de los costos necesarios para llegar a un descenso del pH significativo, teniendo en cuenta el fin buscado al elegir este tipo de levaduras, se decidió realizar la comparación con diferentes productos/medios acidificantes, los cuales fueron:

. Utilización de ácido clorhídrico por medio de columna de intercambio catiónico

Se calculó para poder definir y comparar este método, que se necesitan 100 litros de ácido clorhídrico puro para acidular 8000 litros de vino, descendiendo el pH de 3,90 a 2,55. Este volumen de 8000 litros nos permite realizar un corte con 28000 litros de vino (pH 3,90), dejando así un volumen total de 36000 litros con pH 3,60. En conclusión se utilizaron 2,7 ml de ácido clorhídrico por litro de vino corregido a pH 3,60, el valor monetario por litro es de \$1,70 + IVA.

El resultado de la prueba organoléptica del ensayo fue óptimo.

. Utilización de ácido tartárico de agregado directo

El ensayo se realizó con ácido tartárico puro, utilizando dosis de 3 g/L donde se llevó a valores de pH cercanos a 3,60. El valor monetario por litro es de \$20,25 + IVA.

El resultado de la prueba organoléptica del ensayo fue que el vino se notó con una acidez total muy desequilibrada. Aconsejable en uso como cortes.

. Utilización de ácido láctico de agregado directo

El ensayo se realizó con ácido láctico puro, utilizando dosis de 1,75ml/L, donde se llevó a valores de pH cercanos a 3,60. El valor monetario por litro es de \$15,81 + IVA.

El resultado de la prueba organoléptica del ensayo fue que el vino se notó demasiado untuoso con aromas lácticos ajenos a los de una fermentación maloláctica normal. También se acentuó la acidez. Aconsejable en uso como cortes.

. Utilización de producto acidificante (mix de ácidos) de venta comercial no aprobado por el INV

Este producto es una mezcla de ácidos (láctico, fosfórico, fumárico y tartárico) que se vende a bodegas bajo denominaciones comerciales que no lo definen. Su uso no está permitido bajo la legislación argentina, pero es muy usado aún en la industria.

El ensayo se realizó utilizando dosis de 1ml/L, donde se llevó a valores de pH cercanos a 3,60. El valor monetario por litro es de \$9,42 + IVA.

El resultado de la prueba organoléptica del ensayo fue óptimo.

Por otro lado, se comparó el costo de las levaduras utilizadas en inoculación secuencial para tener un descenso del pH (bioacidificación). Para ello se tuvo en cuenta el uso de dosis de 20 g/hl ya sea en *L. thermotolerans* como en *S. cerevisiae*. Para el caso de la levadura *L. thermotolerans*, el valor monetario por litro fue de \$19,16 + IVA y para el caso de la levadura *S. cerevisiae* fue de \$ 3 + IVA; haciendo un total de gasto en levadura para la bioacidificación de \$ 22,16 + IVA por litro de vino.

Cabe destacar que como se verá más adelante en las conclusiones, los valores de descenso de pH no llegaron a 3,6

Conclusiones

“En zonas cálidas de suelos pobres y salinos, el uso exclusivo de *L. thermotolerans* para provocar un descenso del pH significativo, no resulta una alternativa eficaz que permita llegar a los valores enológicos necesarios para la conservación del vino”.

Teniendo en cuenta que el clima y el suelo influyen de manera directa en la acidez fija de un mosto/vino, es crucial tener en cuenta que la producción de ácido láctico por la levadura *L. thermotolerans* va a influir de manera positiva llegando a pH de conservación más bajo en vinos de zonas frías y suelos poco salinos. El contenido de ácidos fijos en zonas cálidas y salinas siempre va a ser menor que en zonas frías y con poco contenido mineral, causado por la respiración excesiva de los ácidos orgánicos y la alta formación de sales.

“Culminada la fermentación alcohólica, el descenso del pH en ambos ensayos con *L. thermotolerans* no fue tan significativo; bajando el mismo solo una décima desde el pH inicial del mosto”.

Durante la realización de la fermentación alcohólica en los ensayos que involucraron a *L. thermotolerans*, el ácido láctico producido durante la misma no provocó descensos drásticos del pH. En fase mosto se parte de un pH aproximadamente igual a 3,90 y luego de la fermentación alcohólica, en los ensayos N°3 y 4 se llega a un pH de 3,80, tan solo bajando al mismo en una décima. Este hecho radica en que la producción de ácido no fue abundante y que además es un ácido orgánico (débil) y monoprótico. La zona de origen de la uva también influye en esto, ya que esta proviene de zonas muy cálidas en donde la respiración de los ácidos orgánicos se ve muy pronunciada y la salificación de los mismos también, generando un efecto buffer importante.

Los ensayos que han fermentado con *S. cerevisiae* de manera única ya sea natural o agregada, presentan un mayor pH y menor acidez total que los ensayos fermentados en inoculación secuencial con la levadura *L. thermotolerans*. La acidez total en los ensayos con fermentación única por *S. cerevisiae* rondó entre 4,40 y 4,50 g/L, y el pH fue aproximadamente igual a 4,0; a diferencia de los ensayos con inoculación secuencial, en donde la acidez total oscila entre 6,40 y 6,50 g/L y el pH ronda en 3,80.

Con respecto a la cinética fermentativa se comprueba que la inoculación secuencial, con estos valores de azúcares ensayados fue una herramienta muy útil para llevar a rastros de azúcares los mostos a fermentar, evitando así tener posibles desviaciones y alteraciones por paradas de fermentación que pueden afectar al vino.

“El uso de *L. thermotolerans* en vinificaciones con inoculación secuencial permite asegurar un descenso de pH y un aumento de acidez total, que se mantiene estable en el tiempo hasta la conservación”.

Finalizada la fermentación alcohólica e iniciada la etapa de conservación y “limpieza” del vino, se observa que los ensayos que fermentaron en presencia de *L. thermotolerans* a través de la inoculación secuencial con *S. cerevisiae*, presentaron menores cantidades de insolubilizaciones tartáricas que los demás ensayos. Esto se debe a la presencia del ácido láctico que, aunque sea poca la cantidad elaborada, igualmente genera estabilidad química, evitando que precipiten grandes cantidades de sales tartáricas y no dejando por lo tanto que caiga la acidez total y aumente el pH en este periodo. El ácido láctico tiene la capacidad de unirse a los minerales más abundantes de la uva y del vino, y de esta manera formar sales que son solubles a comparación de las tartáricas que precipitan con el tiempo. Este fenómeno que se refleja al poder comparar los productos obtenidos con los diferentes microorganismos trabajando por separado; nos permite observar que partiendo de iguales valores de acidez total y pH, la

producción de ácido láctico por la levadura *L. thermotolerans* permite que se formen sales más solubles con los cationes presentes, impidiendo así que los mismos formen sales insolubles con el ácido tartárico ocasionando que este ácido se mantenga en estado libre, mostrando así una acidez total más elevada y pH más bajo.

“Los resultados organolépticos al poco tiempo de finalizada la fermentación alcohólica con *L. thermotolerans* exponen notas semejantes al fermento de vegetales (lactonas, acetoina), que luego con el correr del tiempo van desapareciendo y se transforman en sensaciones más frutadas, vinosas y especiadas. Las fermentaciones que no contienen a la levadura *L. thermotolerans* poseen aromas normales, semejantes al proceso ordinario del vino; que se asemejan en un principio a aromas algo reductivos y frutados, y luego en el estadio de conservación, de frutos varietales y vinosos.”

Organolépticamente los ensayos que tuvieron inoculación secuencial (presencia de *L. thermotolerans*) se presentaron con mejor intensidad colorante con respecto a los demás ensayos, comprobando que *L. thermotolerans* presenta una baja capacidad para fijar los antocianos en las paredes celulares y que el descenso del pH provoca que exista una mayor cantidad de antocianos coloreados en su forma de catión flavilium, aumentando la intensidad colorante. Aromáticamente, en los ensayos 3 y 4 se elaboraron ciertos aromas no tan agradables (“pickles o vegetales en fermentación”) como se muestra en el análisis organoléptico, en comparación a los demás ensayos, estos aromas no fueron percibidos. En boca, los vinos obtenidos a partir de los ensayos 3 y 4 se presentaron con una acidez desequilibrada producto de la presencia de ácido láctico, esto no ocurrió en los ensayos 1 y 2, en los cuales el vino recuerda al varietal y se presenta más armónico. En normas generales, los vinos no presentaron defectos o alteraciones microbiológicas.

“El uso de la levadura *L. thermotolerans* requiere de un gran cuidado y precaución, desde el inicio hasta el final de la vinificación, manifestando importantes desviaciones analíticas/organolépticas si su atención no es la adecuada”.

Sabiendo que para obtener el mejor resultado en la producción del ácido láctico se debe inocular secuencialmente de manera distanciada, donde primero participa *L. thermotolerans* y luego *S. cerevisiae*, el trabajo para dicho desarrollo implica un mayor cuidado, dedicación y control, siendo así todo este proceso poco práctico.

El tiempo que se deja trabajar la primera levadura influye en la cantidad de ácido láctico producido, recomendando por el vendedor un tiempo mínimo de 24 horas y máximo de 72 horas. Ensayos recientes extienden cada vez más el tiempo de trabajo, lo cual enriquece aún más este tipo de investigación. La idea de dejar trabajar 48 horas a *L. thermotolerans* fue para asegurarnos que la producción de ácido láctico era sola y exclusivamente producida por dicha levadura y no así por otro microorganismo que era muy factible que se desarrollaran en un medio con baja concentración de anhídrido sulfuroso y alto tenor azucarino.

Dado esto es importante tener ciertos cuidados a la hora de realizar esta vinificación secuencial, como por ejemplo contar con una buena sanidad de la materia prima, no excedernos en los niveles iniciales de SO_2 que pueden afectar negativamente al desarrollo de esta levadura y su acción, también requiere una alta cantidad de NPA al momento de realizar la inoculación. *L. thermotolerans* no resiste grandes concentraciones de alcohol, por lo tanto, es necesario realizar una inoculación secuencial o una co-inoculación con *S. cerevisiae*.

L. thermotolerans cuenta con una gran diversidad clonal indicando que las características tanto analíticas como organolépticas de los vinos obtenidos dependen en gran medida de la cepa que participa en la fermentación alcohólica, hoy en día existen distintos laboratorios que venden a *L. thermotolerans* bajo diversas marcas comerciales.

“Con el fin de la acidificación y modificación del pH en un vino, el uso de *L. thermotolerans* es un proceso no muy económico en comparación a métodos más simples y/o tradicionales que también pueden llegar a los mismos y/o mejores resultados”.

Como se mencionó en el capítulo de “Resultados” existen varias maneras de acidificar los mostos y vinos y cada uno tiene sus costos. La bioacidificación con *L. thermotolerans* no es la vía más económica para acidificar, existen otras maneras, como por ejemplo, el uso de resinas de intercambio catiónico y la aplicación de ciertos productos comerciales que son métodos más económicos, llegando a mismos y/o mejores resultados trabajando de manera correcta. La ventaja que tiene la bioacidificación con el resto de los métodos es que es una herramienta natural en donde participa una levadura que tiene la capacidad de formar ácido láctico primordialmente y otros metabolitos que afectan también al plano organoléptico, pudiendo aportar complejidad aromática y gustativa que en general los otros métodos no pueden hacerlo o incluso desmejoran ciertas cualidades del vino.

Como consejo técnico sugiero el uso de *L. thermotolerans* para bioacidificar vinos de manera microbiológica donde la producción de ácido láctico junto con el agregado extra de un ácido orgánico (ácido tartárico) permitirá una estabilidad y descenso más significativo del pH en el tiempo debido a la poca formación de sales insolubles exaltando el potencial del ácido orgánico agregado.

También resalto que el uso de este tipo de levadura *No Saccharomyces* permite obtener vinos diferentes de aromas poco frecuentes en una vinificación normal que, si se acompaña con una conservación a un pH corregido que le confiera una estabilidad microbiológica, estos aromas son muy interesantes y complejizan a un vino; tanto como para su uso total o en participación de un corte.

Índice de Tablas

Tabla 1: <i>Géneros y especies de levaduras relacionadas con la uva y el vino, y hábitat donde se han encontrado</i>	23
Tabla 2: <i>Balance energético oxidación de la glucosa extraído de Pascal Riberau – Gayon en su Tratado de Enología</i>	35
Tabla 3: <i>Facilidad de absorción según naturaleza química de los compuestos nitrogenados basado en “Tratado de enología” Hidalgo Togores</i>	41
Tabla 4: <i>Las principales características que aportan especies no Saccharomyces en la elaboración de vino</i>	47
Tabla 5: <i>Resumen de la variabilidad reportada para Lachancea thermotolerans en varios parámetros de calidad en la fermentación del vino</i>	52
Tabla 6: <i>Diferentes estudios realizados en base a la producción de ácido láctico y el consecuente incremento de la acidez total y descenso del pH</i>	68
Tabla 7: <i>Estado fisicoquímico de la materia prima</i>	100
Tabla 8: <i>Transcurso de la fermentación alcohólica ensayo N°1</i>	101
Tabla 9: <i>Transcurso de la fermentación alcohólica ensayo N°2</i>	103
Tabla 10: <i>Transcurso de la fermentación alcohólica ensayo N°3</i>	104
Tabla 11: <i>Transcurso de la fermentación alcohólica ensayo N°4</i>	106
Tabla 12: <i>Datos analíticos una vez finalizada la fermentación alcohólica (primer trasiego)</i>	109

Tabla 13: *Datos analíticos una vez finalizada la fermentación alcohólica (segundo trasiego)*..... 110

Tabla 14: *Datos analíticos una vez finalizada la fermentación alcohólica (tercer trasiego)*..... 110

Índice de Figuras

Figura 1: <i>Célula de una levadura</i>	13
Figura 2: <i>Quimismo de la glicolisis y fermentación alcohólica</i>	29
Figura 3: <i>Compuestos secundarios formados por la levadura durante la fermentación alcohólica</i>	31
Figura 4: <i>Quimismo de la fermentación alcohólica</i>	32
Figura 5: <i>Quimismo de la fermentación gliceropirúvica</i>	33
Figura 6: <i>Quimismo de la fermentación maloalcohólica</i>	39
Figura 7: <i>Quimismo de la fermentación alcohólica de los aminoácidos</i>	45
Figura 8: <i>Alcoholes superiores desarrollados a partir de los aminoácidos correspondientes</i>	46
Figura 9: <i>Observación microscópica de células de L.thermotolerans</i>	51
Figura 10: <i>Escala de pH extraída de Enología: teórico practica / Francisco Oreglia / Tomo 1</i>	72
Figura 11: <i>Clasificación de los ácidos del vino</i>	74
Figura 12: <i>Estructura química de los esteroisómeros correspondientes al ácido láctico</i>	81
Figura 13: <i>Ionización del ácido láctico</i>	81
Figura 14: <i>Imagen ilustrativa del viñedo</i>	90
Figura 15: <i>Imagen de toma de muestra para determinar punto de cosecha</i>	92

Figura 16: <i>Estado de la uva al momento de cosecha</i>	93
Figura 17: <i>Recipiente de fermentación plástico empleado</i>	95
Figura 18: <i>Evolución de la cinética de fermentación (ensayo N°1)</i>	102
Figura 19: <i>Evolución de la cinética de fermentación (ensayo N°2)</i>	104
Figura 20: <i>Evolución de la cinética de fermentación (ensayo N°3)</i>	106
Figura 21: <i>Evolución de la cinética de fermentación (ensayo N°4)</i>	108
Figura 22: <i>Ficha del análisis sensorial de los ensayos</i>	117

Referencias

- Ribéreau Gayon, Pascal, Dubourdiou, Denis, Doneche, Bernard, Lonvaud, Aline. (2003.). *Tratado de enología : microbiología del vino / Pascal Ribéreau Gayon , Denis Dubourdiou, Bernard Doneche* . Buenos Aires: hemisferio sur.
- Usseglio Tomasset, Luciano. (1998). *Química enológica / Luciano Usseglio Tomasset* . Madrid: Mundi Prensa.
- Moreno Vigará, Juan J., Peinado Amores, Rafael A.. (2010). *Química enológica* (1a. ed.). Madrid: Mundi Prensa Antonio Madrid Vicente.
- Hidalgo Togores, José. (2018). *Tratado de enología / Tomo I* (3a. ed.). Madrid: Mundi Prensa Antonio Madrid Vicente.
- Hidalgo Togores, José. (2018). *Tratado de enología / Tomo II* (3a. ed.). Madrid: Mundi Prensa Antonio Madrid Vicente.
- Oreglia, Francisco. (1978.). *Enología : teórico practica / Francisco Oreglia* (3 a. ed.). Buenos Aires: Instituto Salesiano de Artes Gráficas.
- Javier Vicente, Yasemin Baran, Eva Navascués, Antonio Santos, Fernando Calderon, Domingo Marquina, Doris Rauhut, Santiago Benito. (2022). *Biological management of acidity in wine industry: A review*.
- Santiago Benito. (2018). *The impacts of Lachancea thermotolerans yeast strains on winemaking*. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9117-z>
- Tristan Jade Porter, Benoit Divol, Mathabatha Evodia Setati. (2019). *Lachancea yeast species: Origin, biochemical characteristics and oenological significance*.

Javier Vicente, Eva Navascués, Fernando Calderón, Antonio Santos, Domingo Marquina and Santiago Benito. (2021). *An Integrative View of the Role of Lachancea thermotolerans in Wine Technology*. <https://doi.org/10.3390/foods10112878>

Martínez Quesada, M. (2012, abril-junio). Hongos domésticos
<https://www.micobotanicajaen.com/>

Viramontes Álvarez, R. Levaduras vínicas.
https://www.acenologia.com/levaduras_vinicas/