

# DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD FERMENTATIVA EN LEVADURAS NATIVAS DE UVAS NEGRAS EN EL VALLE DEL CAUCA

**Yuliana Alexandra Guerrero Murillo**  
**Jennifer Alejandra Mateus Llanos**

**Directora**  
**Dra. Paola Carolina Alzate Calderón, PhD**

**Directora**  
**Dra. Omaira Vera Lizcano, PhD**

**Universidad Santiago de Cali**  
**Facultad de Ciencias Básicas**  
**Programa de microbiología**  
**Cali, Colombia**  
**2022**

# **DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD FERMENTATIVA EN LEVADURAS NATIVAS DE UVAS NEGRAS EN EL VALLE DEL CAUCA**

**Yuliana Alexandra Guerrero Murillo  
Jennifer Alejandra Mateus Llanos**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:  
Microbióloga**

**Directora  
Dra. Paola Carolina Alzate Calderón, PhD**

**Directora  
Dra. Omaira Vera Lizcano, PhD**

**Línea de Investigación:**

Biotecnología

**Grupo de Investigación:**

GIM

**Universidad Santiago de Cali  
Facultad de Ciencias Básicas  
Programa de microbiología  
Ciudad, Colombia  
2022**

## IMPACTOS

| <b>IMPACTO</b>                | <b>PRODUCTO</b>   | <b>BENEFICIARIO(S)</b>           |
|-------------------------------|---|----------------------------------|
| <b>Económico</b>              | Opción novedosa para el uso de variedad de uva de la región y posible creación de nuevo producto con beneficios monetarios. | Agricultores de la región.       |
| <b>Responsabilidad social</b> | Apropiación de posible estrategia de uso de uvas de la región para la fabricación de vino tinto.                            | Comunidad académica.             |
| <b>Científico</b>             | Estudio futuro y prometedor acerca de alternativa para la fabricación de vino tinto.  | Comunidad estudiantil y docente. |
| <b>Social</b>                 | Mejoramiento de economía de la región, al obtener producto vinícola novedoso con gran potencial en el mercado.              | Sociedad.                        |

## DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD FERMENTATIVA EN LEVADURAS NATIVAS DE UVAS NEGRAS EN EL VALLE DEL CAUCA

Yuliana Alexandra Guerrero Murillo<sup>1</sup>, Jennifer Alejandra Mateus Llanos<sup>2</sup>  
[yuliana.guerrero00@usc.edu.co](mailto:yuliana.guerrero00@usc.edu.co)<sup>1</sup>, [jennifer.mateus00@usc.edu.co](mailto:jennifer.mateus00@usc.edu.co)<sup>2</sup>

Grupo de investigación QUIBIO

Facultad de ciencias básicas

Universidad Santiago de Cali

Campus Pampalinda Calle 5 # 62-00, Santiago de Cali, Colombia

### RESUMEN

La uva Isabella (*Vitis labrusca*) es una variedad de uva negra que se cultiva en el municipio de la Unión (Valle del Cauca). Este municipio, es uno de los mayores productores de este tipo de uva en la región, para consumo en la canasta familiar; siendo esta variedad de uva una de las principales fuentes de levaduras nativas, las cuales podrían ayudar positivamente en el proceso fermentativo para elaboración de vino. El objetivo principal de esta investigación fue aislar algunas cepas de levaduras en uvas negras, con el fin de estandarizar un vino tinto. En cuanto a la metodología usada, se evaluó el proceso de fermentación alcohólica de una manera espontánea, realizando un proceso de re-fermentación a partir de un lote de vino. Para lograr lo anterior, se analizaron parámetros como el pH, temperatura, densidad y porcentaje de alcohol. Los resultados demuestran que la uva Isabella de la Unión Valle, puede ser utilizada en el proceso de fermentación y es apta para la obtención de vino, debido a que en ella se encuentran levaduras nativas idóneas para la realización de un adecuado proceso fermentativo. Como conclusión, se determinó que la carga microbiana es apta para corroborar que, dentro de los parámetros anteriormente mencionados, el porcentaje alcohólico se encuentra dentro de lo indicado por la normatividad colombiana para vinos de fruta comerciales y, además, las características sensoriales del vino obtenido son óptimas y adecuadas para la producción de este tipo de vino favoreciendo a la economía de la región principalmente.

**Palabras clave:** levaduras, fermentación, crioconservación, uvas, viabilidad, aislamiento.

## DETERMINATION OF FERMENTATIVE CAPACITY IN NATIVE YEASTS OF BLACK GRAPES IN THE VALLE DEL CAUCA

### ABSTRACT

Isabella grape (*Vitis labrusca*) is a black grape variety grown in the municipality of La Unión (Valle del Cauca). This municipality is one of the largest producers of this type of grape in the region, for consumption in the family basket; this grape variety is one of the main sources of native yeasts, which could help positively in the fermentation process for winemaking. The main objective of this research was to isolate some yeast strains in black grapes, to standardize a red wine. Regarding the methodology used, the alcoholic fermentation process was evaluated in a spontaneous way, performing a re-fermentation process from a batch of wine. To achieve this, parameters such as pH, temperature, density, and alcohol percentage were analyzed. The results show that the Isabella de la Unión Valle grape can be used in the fermentation process and is suitable for obtaining wine, since it contains native yeasts suitable for carrying out an adequate fermentation process. In conclusion, it was determined that the microbial load is suitable to corroborate that, within the parameters, the alcoholic percentage is within what is indicated by Colombian regulations for commercial fruit wines, and, in addition, the sensory characteristics of the wine obtained are optimal and suitable for the production of this type of wine, mainly favoring the economy of the region.

**Keywords:** yeast, fermentation, cryopreservation, grapes, viability, isolation.

## 1. INTRODUCCIÓN

En Colombia, la producción de vino en los últimos años ha venido en aumento, más específicamente en el área de la siembra y la producción de uva, donde se estiman cifras equivalentes a toneladas, especialmente en el Valle del Cauca, debido a sus vinos artesanales; siendo el vino tinto el más destacado por los viñedos gracias a su aroma, sabor y cuerpo. El vino es el resultado de una fermentación alcohólica del mosto de uvas (*Vitis vinífera*) (Navarre, 1998). En el proceso de elaboración de esta bebida, existen factores como la vinificación, la variedad y el método de cultivo, que marcan diferencias en las propiedades del producto final (Kennedy, 2008); no obstante, el llamado terroir (terroir), influenciado por la luminosidad, altitud, latitud, régimen pluvial, pendiente, orientación y tipo de suelo, es el que define la tipicidad de la uva y del vino (Torres et al., 2006), lo cual se expresa en el contenido de azúcar, acidez, color y aroma, entre otros (Tonietto, 2007). En general, la calidad de una vendimia está determinada por la interacción del cultivar con el suelo y el clima predominante en una región, en un año determinado (Ferrer et al., 2007). Existen miles de cultivares de *Vitis vinífera*, pero el mercado mundial de la producción de vino está dominado por sólo unos pocos cultivares debido, en gran parte, a la forma en que se comercializa actualmente el vino. Los cultivares se clasifican generalmente según su producción final: uvas de vino, uvas de mesa y uvas pasas (This, Lacombe y Thomas, 2006). Dentro de las uvas usadas para producir vino, además de estar presente la especie *Vitis vinífera* la cual permite producir variedades como Cabernet Sauvignon, Pinot Noir, Chardonnay y Merlot entre otros. Se conocen otras especies como lo es *Vitis labrusca* (dentro de esta se encuentra la variedad Isabella, cultivada en el Valle del Cauca) al no ser esta considerada una de las variedades viníferas, en Colombia se ha elaborado vino con uva Isabella (*Vitis labrusca*) produciendo vinos tintos en donde se han determinado factores fisicoquímicos, densidad del mosto, relación de azúcares y la acidez que establecen la calidad de la uva. Para uvas tintas es muy importante su contenido en polifenoles que se encuentran en la piel y las semillas que dan un aporte importante en los sabores, colores y aromas de este tipo de vinos (Hernández et al., 2011).

La flora microbiana de la uva incluye levaduras, responsables de la transformación del azúcar en etanol y bacterias acéticas, las cuales se encargan de oxidar el etanol produciendo ácido acético. El proceso mediante el cual la uva se transforma en vino difiere según el lugar donde se produce, las tradiciones de la elaboración o el tipo de vino que se realice. Sin embargo, todos los grandes vinos, sean blancos, tintos, del norte o del sur, responden siempre a unos patrones generales en su elaboración y producción; es la fermentación alcohólica la que se considera la más importante y contundente en la producción del vino (Cruz de Aquino, Mario A, 2012). Los vinos tintos, son aquellos obtenidos del mosto de uvas tintas, sometidos a un proceso de elaboración que permite transmitir al mosto la materia colorante contenida en los hollejos de las uvas. Fundamentalmente, este tipo de vinos se pueden obtener mediante dos procesos distintos de elaboración, el método tradicional y el de maceración carbónica. El color del vino depende de factores como las variedades de uva empleadas, la forma en que se ha elaborado o su edad. Las tonalidades de los tintos van desde el rojo claro hasta el negro (González-Neves, 2007).

Las comunidades microbianas presentes durante la fermentación del mosto de uva contribuyen en gran medida a las características sensoriales y organolépticas de los vinos. Algunos de estos estudios sugieren que las propias variedades de uva condicionan la población microbiana durante la fermentación espontánea. (Raymond y Rosa, 2019). Apoyando esta idea, los viñedos que cultivan diferentes variedades de uva parecen albergar cepas más diversas de *Saccharomyces cerevisiae* y no *Saccharomyces*, que los viñedos que cultivan una sola variedad de uva. Además, se ha observado que determinadas especies de levaduras muestran preferencias para ciertas variedades de uva (por ejemplo, los basidiomicetos rojos o rojizos predominan en las uvas blancas, mientras que se observaron cantidades iguales de ascomicetos y basidiomicetos en uvas tintas). (Raymond y Rosa, 2019). En cuanto a las especies de levaduras, se encuentran principalmente, géneros de metabolismo oxidativo y forma apiculada como: *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Picchia* y *Hansenula*, y en mucha menor cantidad y raramente las del tipo fermentativo: *Saccharomyces*. Sin embargo, estas últimas también se hallan en mayor número en las bodegas, sobre suelos, paredes, depósitos, conducciones y maquinaria de procesado, de tal forma que se considera a las instalaciones como parte de la ecología en las fermentaciones espontáneas (Hidalgo Togores, 2003). Por otro lado, en uvas *Vitis noviniifera* también se han aislado algunas especies encontradas en *Vitis vinífera* como lo es *Hanseniaspora uvarum* (identificada como la especie de levadura no *Saccharomyces* más frecuente en variedad de uvas Isabel o Isabella y Burdeos), además de otras levaduras como *Issatchenkia orientalis* e *Issatchenkia occidentalis* (Raymond y Rosa, 2019). En estudios posteriores con uvas de la variedad Isabella se reconocieron especies poco frecuentes de levaduras no *Saccharomyces* como lo son: *Candida zymoides*, *Pichia cecembensis*, *Candida californica*, *Candida bentonensis*, *Issatchenkia hanoiensis* y *Candida*

*apícola* (Raymond y Rosa, 2019). No obstante, aunque existen levaduras comerciales, teóricamente apropiadas para realizar vinificaciones, resulta mucho más adecuado usar cepas autóctonas (locales) seleccionadas (Lema et al., 1994).

Algunos productores de vino seleccionan y cultivan sus propias levaduras, mientras que otros, compran cepas levaduriformes comerciales, especiales para esta producción. Generalmente estas especies de levadura se encuentran en el hollejo de la uva (Chávez, 1998). En la actualidad, las industrias optan por levaduras enológicas seleccionadas en vez de las “nativas” ya que las enológicas fermentan a bajas temperaturas, produciendo bastante alcohol con poca espuma y sustancias aromáticas amenas (terpenos y ésteres). Además, éstas toleran mayores cantidades de dióxido de azufre y de alcohol en el medio y son vectores del factor “killer” que cooperan con la eliminación de otras levaduras no deseadas. Los agentes fisicoquímicos del jugo de uva influyen en la producción y funcionalidad de las enzimas microbianas. Por lo tanto, el curso y resultado final de cada fermentación puede ser diferente según las características fisiológicas de la levadura y las condiciones ambientales en que se realice el proceso de fermentación del vino (Suárez Lepe, 1997). En la vinificación, la inoculación se realiza con levaduras enológicas seleccionadas en plena actividad, donde se reproducen con mucha más velocidad que las nativas. En la vinificación, se agrega dióxido de azufre al mosto para inhibir el desarrollo de microorganismos indignos, que perduran en estado latente. La mayoría de los productores de vinos objetan que las levaduras enológicas masifican la calidad del vino; ya que se han creado bancos de levaduras autóctonas donde se busca mantener una calidad diferente y conservar la biodiversidad (Chávez, 1998).

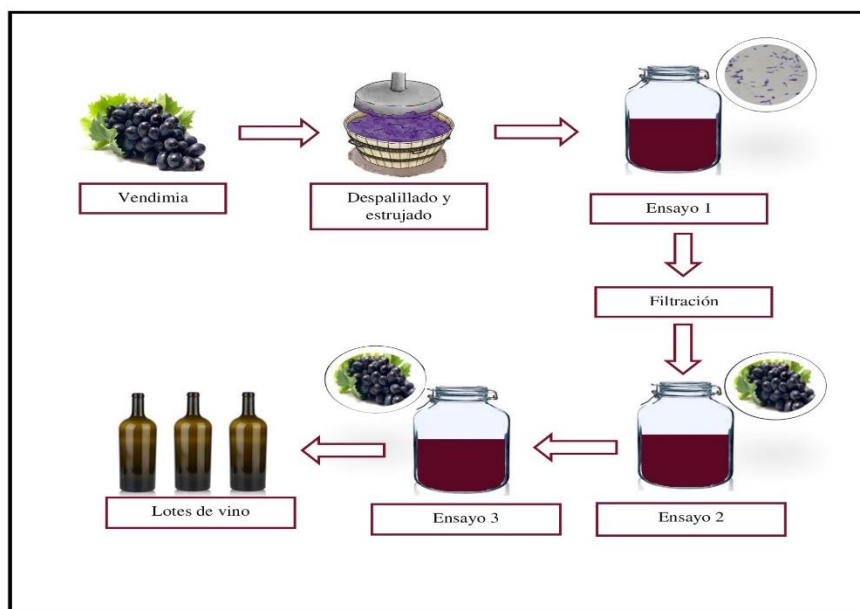
La identificación de levaduras se puede llevar a cabo atendiendo a cuatro criterios: morfológicos, fisiológicos, inmunológicos y genéticos. Identificar las levaduras presentes durante el proceso de fermentación permite establecer los factores principales y contrastarlos con las características organolépticas del producto terminado, generando valor agregado en el proceso productivo (Ochiuzzi, 2014). Esta identificación se puede realizar, por ejemplo, por medio del sistema VITEK, el cual es un sistema que utiliza tarjetas con reactivos colorimétricos, las cuales son inoculadas con la suspensión de un cultivo puro microbiano y el perfil de desarrollo es interpretado de forma automática. Este es un equipo que identifica y establece el patrón de sensibilidad de diversos microorganismos. La tarjeta YST permite identificar levaduras de importancia industrial y organismos relacionados a través de 47 pruebas bioquímicas fluorescentes, las cuales incluyen asimilación de carbohidratos y ácidos orgánicos y detección de oxidasas y arilamidasa. Diversos estudios han demostrado que mediante este sistema se puede identificar correctamente más del 93% de las cepas analizadas en aproximadamente 18 horas (Beatriz Romeu, et al. 2010).

El propósito de esta investigación fue identificar especies de levaduras nativas presentes en uva negra Isabella y evaluar su capacidad fermentativa en la elaboración de un vino tinto ya que, en el Valle del Cauca no se han realizados hasta el momento estudios relacionados con la identificación de levaduras nativas en esta variedad de uva que cumpla con los parámetros establecidos para este tipo de productos. En este estudio, además, se usaron métodos de identificación y caracterización de levaduras por medio de siembra en cultivos diferenciales, evaluación de la viabilidad celular, identificación microscópica mediante tinción Gram, reactivación de las cepas conservadas en caldo YGC con glicerol e identificación de géneros y especies, por medio del sistema VITEK.

## **2. MATERIALES Y METODOS**

En primer lugar, la obtención del mosto de uva Isabella se realizó en los laboratorios de la universidad Santiago de Cali, para ello se utilizaron 24 Kg de uva Isabella (*Vitis labruca*) provenientes de la Unión Valle. Se obtuvieron de forma artesanal 3 litros de mosto, los cuales se distribuyeron en 3 ensayos: el primer ensayo se realizó en un fermentador de vidrio con capacidad de 6 litros con un airlock el cual disponía de un tapón, en este fermentador se agregaron 8 Kg de uva Isabella, la cual fue previamente estrujada de forma manual. Posteriormente se incubó en un estado de anaerobiosis durante 10 días, periodo en el cual se determinaron parámetros como pH (pHmetro), temperatura (termómetro digital), densidad (picnómetro de 25 mL) y porcentaje de alcohol (densimetría). Para la realización del ensayo 2, se usaron los datos del ensayo 1 y, el producto resultante se transvasó de la siguiente forma: pasado el periodo de fermentación del ensayo se procedió a filtrar el mosto y se agregó a otro fermentador con la misma capacidad que el anterior, posterior a esto se añadieron nuevamente 8 Kg de uva Isabella y se dio inicio nuevamente al proceso de fermentación; por último, para el ensayo 3, se procedió a hacer lo mismo del ensayo 2, con la diferencia que en el ensayo 3 se obtuvo una mezcla entre el ensayo 1 el ensayo 2. De esta

mezcla se obtuvo el mosto final, el cual, se envasó en botellas ámbar de 1 litro, estas se almacenaron a una temperatura de 8 °C durante un mes. El procedimiento anteriormente descrito se puede observar en la **Figura 1**. En esta etapa es importante resaltar que en el proceso de refermentación no se adicionó ningún tipo de microorganismo al vino y esto se realizó con el fin de identificar en esta uva la posibilidad de obtener levaduras nativas, de lograr identificar las levaduras propias, responsables del proceso de fermentación del alcohol en el mosto obtenido a partir de la Uva Isabella.



Guerrero Y; Mateus J. (2022)

**Figura 1.** Diagrama del proceso de re-fermentación del mosto.

A partir del vino obtenido en los ensayos 1, 2 y 3, se procedió a realizar la etapa de aislamiento de las levaduras, donde se separaron 20 mL de cada muestra en tubos falcon, luego se centrifugó cada muestra durante 7 minutos a 3000 rpm. Del precipitado resultante, se tomaron 100  $\mu$ L para ser sembrados en superficie en agar YGC y agar WL. En paralelo, se tomó el mismo volumen de muestra, es decir, 100  $\mu$ L provenientes directamente de los ensayos de vino y se sembraron en los medios de cultivo mencionados anteriormente. Las placas se llevaron a incubar a 27°C, durante 3 días para el medio YGC y 8 días para el medio WL.

Posteriormente, se realizó una tinción Gram a partir de las colonias crecidas en las placas anteriores, con el fin de evaluar las características microscópicas de las cepas, como la pureza del cultivo obtenido. Una vez realizada la microscopía se hicieron diluciones 1:10 usando como diluyente agua peptona, se realizaron diluciones seriadas hasta la dilución  $10^{-7}$  y se seleccionaron aleatoriamente las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-7}$  para realizar una siembra en superficie por duplicado en agar WL, este medio se incubó a 27°C por 8 días. Luego se seleccionaron las placas con mayor crecimiento y sin contaminación visual, estas, se analizaron macroscópicamente, evaluando la textura, color, forma, elevación y tamaño de las colonias. Se seleccionaron 4 cepas, las cuales se aislaron en agar YGC por la técnica de punción y se incubaron a 27°C por 3 días. Pasado el tiempo de incubación se crioconservaron por 3 meses en medio YGC usando glicerol como agente crioprotector, con el fin de conservarlas adecuadamente para su posterior activación y así continuar con los análisis planteados en esta investigación.

### Reactivación de las cepas y determinación de la viabilidad

Cada cepa se reactivó en agar YGC, por duplicado, mediante la siembra por agotamiento y se llevó a incubar por 5 días. Una vez pasado el periodo de incubación se verificó la viabilidad mediante la reactivación de estas. Posterior a esto, se aislaron cada una de las cepas obtenidas en agar WL durante 5 días a 27°C en anaerobiosis. Se determinó la viabilidad mediante recuento en cámara de Neubauer, usando como colorante azul de metileno para su observación en el microscopio y con el fin de calcular la viabilidad del cultivo. Se contaron tanto las células no viables como las viables; y se usó la siguiente fórmula para obtener el porcentaje de viabilidad:

$$\% \textit{Viabilidad} = \left( \frac{\textit{Células totales} - \textit{Células no viables}}{\textit{Células totales}} \right) \times 100 \quad (1)$$

### Identificación de levaduras por VITEK

Se seleccionaron dos cepas, teniendo como criterio el mayor porcentaje de viabilidad obtenido, para ser procesadas por el sistema automatizado VITEK del laboratorio de servicios externos de la Universidad Santiago de Cali. Dichas cepas se encontraban aisladas y puras en medio de cultivo sólido WL para una mejor identificación.

### Determinación de la capacidad fermentativa – Microvinificación

Con las cepas identificadas (cepa 3 y cepa 4) se realizaron dos procesos de microvinificación para cada una. En dos frascos de vidrio se añadieron uvas, las cuales fueron previamente estrujadas y maceradas, posteriormente, de las cajas Petri donde se encontraban las cepas aisladas se tomó una asada de cada una y se procedió a inocular cada ensayo con las respectivas cepas, finalmente se sellaron los frascos con su respectiva tapa y una trampa de aire para cada uno, dejando que se realice el proceso de fermentación espontáneo a temperatura ambiente durante 8 días. Pasado el tiempo se determinó la capacidad fermentativa calculando el porcentaje de alcohol a partir de la densidad inicial y final del mosto de cada ensayo, para ello se utilizó un picnómetro de 5mL el cual fue pesado previamente para tener el registro del peso seco, seguido se agregó el mosto de cada ensayo y se registró el peso para así calcular la densidad y previamente el porcentaje de alcohol.

## 3. RESULTADOS

En la **Figura 2** se observa el proceso de elaboración del vino, el cual comienza con la separación de los tallos y las bayas para posteriormente añadirse al fermentador e iniciar el proceso de estrujado, con el fin de extraer la mayor cantidad de jugo posible, y, teniendo en cuenta de no afectar la semilla.



Guerrero Y; Mateus J. (2022)

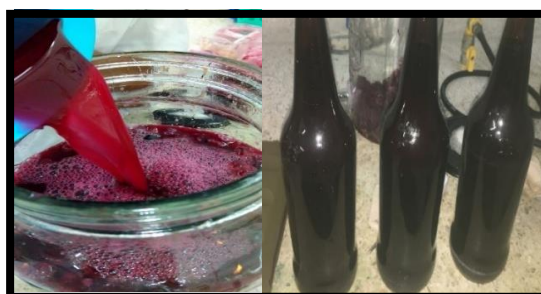
**Figura 2.** Elaboración del vino a partir de uva Isabella.

En la **Figura 3** se muestra el proceso de sellado del fermentador, con el fin de lograr la anaerobiosis de la fermentación. En esta etapa se espera un crecimiento exponencial de las levaduras gracias al ambiente anaerobio generado. En este proceso, se calcularon los parámetros de pH, temperatura y densidad, para los cuales, se elaboró un registro inicial (antes del sellado) y uno final, cuando el proceso de fermentación finalizó.



Guerrero Y; Mateus J. (2022)  
**Figura 3.** Sellado y fermentación.

En la **Figura 4** se observa el proceso de trasvasado, el cual consta en la mezcla de los mostos resultantes de los ensayos 1 y 2, dicha mezcla fue trasvasada a otro recipiente para dar inicio al ensayo 3 y, a partir de este último, se obtuvo la última fermentación; para finalmente realizar la maduración en tres botellas ámbar de 1 litro.



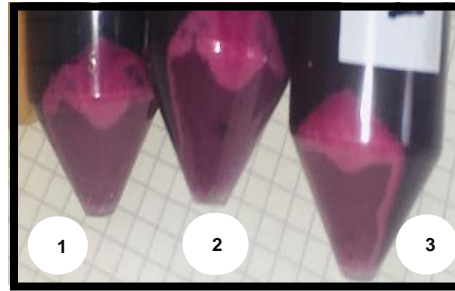
Guerrero Y; Mateus J. (2022)  
**Figura 4.** Trasvasado del mosto y embotellado.

En la **Tabla 1** se registran los parámetros de fermentación del mosto de uva tomando en cuenta la norma técnica colombiana (NTC 708 de 2000), y adicionalmente se determinó el porcentaje alcohólico del producto final (vino).

**Tabla 1.** Parámetros evaluados durante la fermentación del mosto de uva de los tres ensayos.

| Parámetros       | Ensayo 1 |        | Ensayo 2 |        | Ensayo 3 |        |
|------------------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|
|                  | Inicial  | Final  | Inicial  | Final  | Inicial  | Final  |
| pH               | 3.5      | 3.1    | 2.9      | 3.5    | 3.1      | 3.2    |
| Temperatura (°C) | 20.4     | 20.6   | 25.2     | 20.4   | 20.5     | 22.8   |
| Densidad (g/L)   | 1.0807   | 1.0837 | 1.0580   | 1.0581 | 1.0679   | 0.9726 |
| Alcohol (%)      | 4.5      |        | 5.5      |        | 12.0     |        |

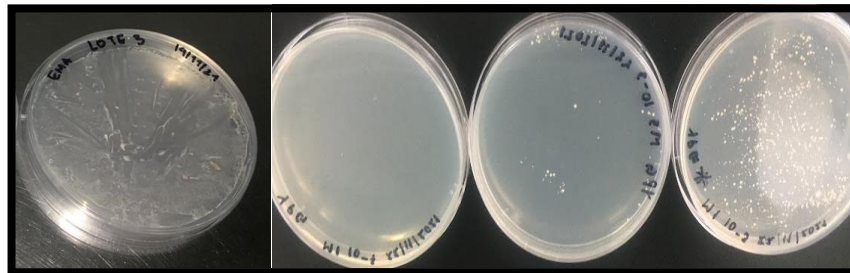
La **Figura 5** muestra el precipitado resultante luego del proceso de centrifugación realizado para los tres ensayos.



Guerrero Y; Mateus J. (2022)

**Figura 5.** Tubos falcon con el pellet obtenido después de la centrifugación (ensayos 1,2 y 3).

La **Figura 6** muestra las cajas de Petri luego de realizar las diluciones decimales seriadas (1:10) en medio de cultivo YGC. En esta etapa, se sembraron las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-7}$  y, además, se realizó la siembra directa de los lotes de vino.



Guerrero Y; Mateus J. (2022)

**Figura 6.** Siembras realizadas en medio sólido YGC a partir del ensayo 3: a) siembra directa y b) diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-7}$  (de izquierda a derecha).

En las **Figuras 7 y 8** se muestra la siembra por agotamiento en medio sólido WL y siembra por punción en medio sólido YGC. De las fotografías es posible observar un crecimiento típico de levaduras mediante las dos técnicas anteriormente mencionadas.



Guerrero Y; Mateus J. (2022)

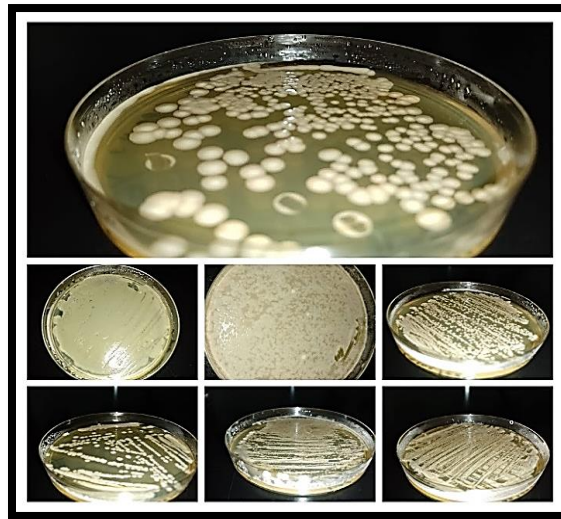
**Figura 7.** Resultado de la siembra por agotamiento en agar WL.



Guerrero Y; Mateus J. (2022)

**Figura 8.** Resultado de la siembra por punción en agar YGC.

En la **Figura 9** se muestra la reactivación de las cepas crioconservadas en agar YGC + Glicerol, este proceso se realizó por medio del descongelamiento de las cepas, para su posterior reactivación en agar YGC, aquí puede observarse un crecimiento abundante de colonias típicas de levaduras.


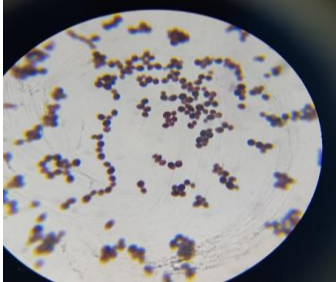
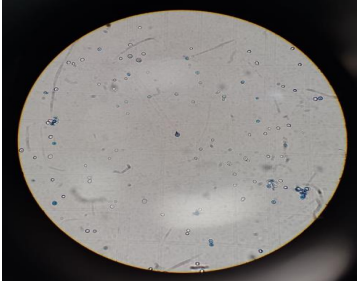




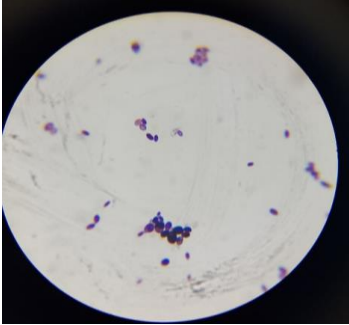
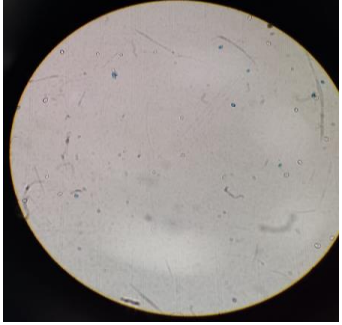

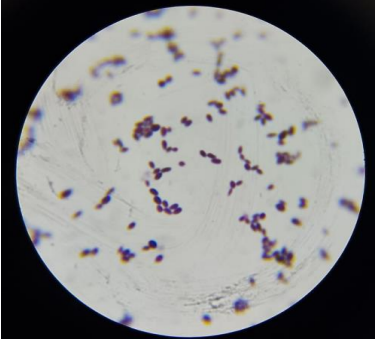
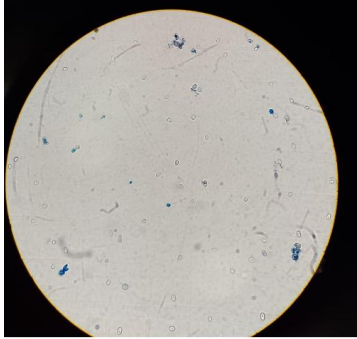



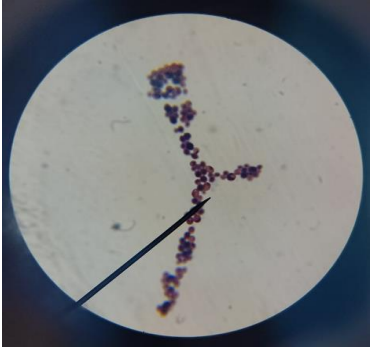
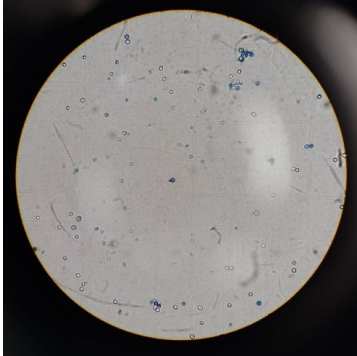

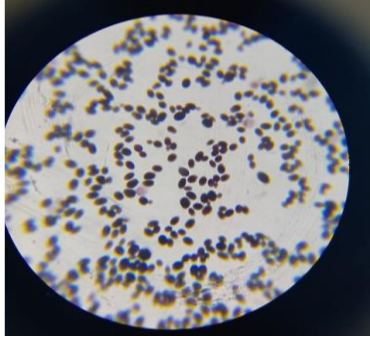


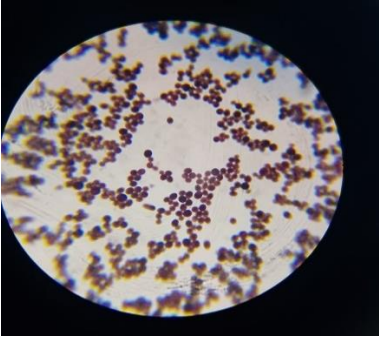
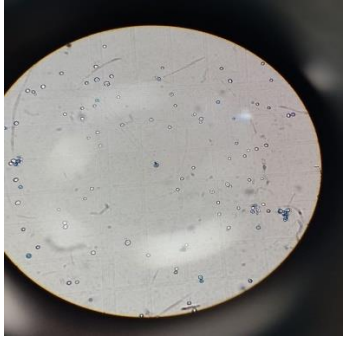

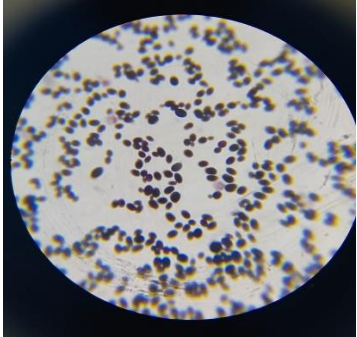
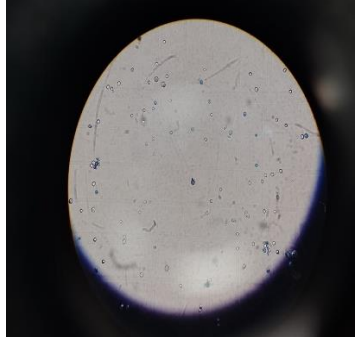
Guerrero Y; Mateus J. (2022)

**Figura 9.** Resultado de la reactivación en agar YGC de las cepas crioconservadas.

En la **Tabla 2**, se detalla el crecimiento de las cepas seleccionadas sembradas en agar selectivo y diferencial (WL), su microscopia mediante tinción de Gram y una muestra del conteo en Cámara de Neubauer para determinar la viabilidad de las cepas. Es importante aclarar que las 8 cepas mostradas a continuación, corresponden a las aisladas del ensayo 3 (final) del proceso de refermentación; y, son las más importantes debido a que para este ensayo final, ya se había alcanzado el % de alcohol requerido por la normatividad colombiana para vino de fruta comercial (12 %).

**Tabla 2.** Resultados de la observación macroscópica, microscópica y recuento en cámara Neubauer para las cepas aisladas a partir del ensayo 3.

| CEPA | MACROSCOPIA   | MICROSCOPIA  | CONTEO EN CÁMARA NEUBAUER   |
|------|---|--|---|
| 1    |    |    |    |
| 2    |   |   |   |
| 3    |  |  |  |
| 4    |  |  |  |

|   |   |  |   |
|---|---|--|---|
| 5 |    |    |    |
| 6 |    |    |    |
| 7 |  |  |  |
| 8 |  |  |  |

En la **Tabla 3** se detallan los resultados del recuento realizado en la Cámara de Neubauer a todas las cepas aisladas a partir del ensayo final 3 (**Tabla 2**). Donde **V** corresponde a las células viables contadas, **NV** corresponde a las células no viables contadas en cada cuadrante seleccionado en la cámara.

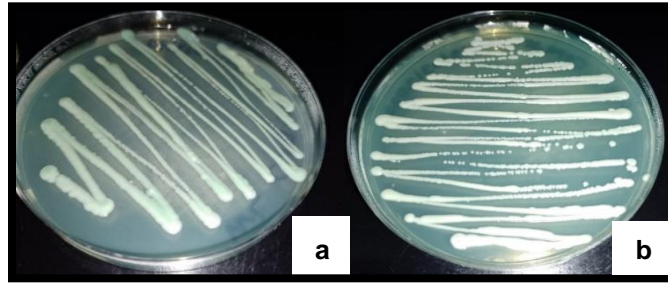
**Tabla 3.** Resultados obtenidos a partir del recuento en cámara de Neubauer.

| Cuadrante            | Cepa 1      |    | Cepa 2      |    | Cepa 3      |    | Cepa 4      |    | Cepa 5      |    | Cepa 6      |    | Cepa 7      |    | Cepa 8      |    |
|----------------------|-------------|----|-------------|----|-------------|----|-------------|----|-------------|----|-------------|----|-------------|----|-------------|----|
|                      | V           | NV | V           | NV | V           | NV | V           | NV | V           | NV | V           | NV | V           | NV | V           | NV |
| 1                    | 18          | 4  | 23          | 3  | 19          | 0  | 9           | 0  | 8           | 1  | 8           | 2  | 10          | 3  | 9           | 1  |
| 2                    | 17          | 1  | 18          | 2  | 14          | 2  | 7           | 1  | 6           | 2  | 8           | 2  | 14          | 5  | 7           | 1  |
| 3                    | 6           | 1  | 12          | 4  | 12          | 2  | 6           | 1  | 8           | 2  | 14          | 4  | 18          | 7  | 9           | 1  |
| 4                    | 6           | 2  | 12          | 3  | 15          | 1  | 5           | 0  | 6           | 2  | 15          | 3  | 16          | 4  | 4           | 1  |
| 5                    | 11          | 6  | 13          | 1  | 14          | 1  | 9           | 0  | 5           | 1  | 11          | 2  | 17          | 3  | 4           | 1  |
| <b>Viabilidad(%)</b> | <b>80.5</b> |    | <b>85.7</b> |    | <b>92.5</b> |    | <b>94.7</b> |    | <b>80.5</b> |    | <b>81.2</b> |    | <b>77.3</b> |    | <b>86.8</b> |    |

La fórmula usada para calcular el porcentaje de viabilidad se muestra a continuación.

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{\text{Células totales} - \text{células no viables}}{\text{Células totales}} \times 100 \quad (1)$$

Para la identificación por medio del sistema automatizado Vitek, se seleccionaron dos cepas de las analizadas en la Tabla 2. El criterio de selección fue elegir las cepas que mostraran el mayor porcentaje (%) de viabilidad, tal como se indica en la literatura, (Fernández de Piérola, 2018), donde se destaca microorganismos con porcentajes de viabilidad elevados los cuales permiten obtener productos de buena calidad. Cuando se quiere seleccionar una cepa para utilizarla, por ejemplo en un proceso de fermentación, se parte de un número elevado de cepas diferentes, aplicando lo que se conoce como selección masiva por competencia, este método de selección ocurre en las fermentaciones espontaneas, y se basa, en la propia competencia entre las cepas por los nutrientes del medio para elegir aquellas que tengan una mejor capacidad fermentativa; para ello, se emplean criterios de selección como lo son la temperatura de fermentación, la viabilidad de las cepas y los análisis organolépticos del vino obtenido (María Jesús Torija, 2002). Estas cepas mostraron los mayores porcentajes de viabilidad siendo de 92.5% (cepa 3) y de 94.7% (cepa 4) mostradas en la **Figura 10**. Los resultados del análisis por Vitek indicaron (tal como se detalla en ANEXOS) que las cepas identificadas en el vino fabricado en el presente estudio, corresponden a *Candida sphaerica* y *Saccharomyces cerevisiae*. La primera levadura se utiliza para la producción de etanol y también es ampliamente utilizada en la producción de otros metabolitos a través de la fermentación del suero en quesos, debido a su capacidad para metabolizar la lactosa. Esta levadura se conoce como la forma no esporulante de *Kluyveromyces lactis* (Setati et al., 2012; Bokulich et al., 2013; Bokulich et al., 2014; Pinto et al., 2015). Sin embargo, a la fecha no se ha encontrado en la literatura investigaciones relacionadas con *Kluyveromyces lactis* (*Candida sphaerica*) en la producción de vino. Por lo que el resultado hallado abre puertas en este campo de investigación y permitirá profundizar más en el estudio de esta cepa levaduriforme para producción de vinos.



Guerrero Y; Mateus J. (2022)

**Figura 10.** Cepas crecidas en medio WL y seleccionadas para el análisis VITEK a) cepa 2 y b) cepa 4.

En la **Tabla 4** se muestran los resultados obtenidos para el ensayo final de capacidad fermentativa (microvinificación) realizado a las cepas 3 y 4, aisladas del mosto final e identificadas mediante el equipo Vitek.

**Tabla 4.** Resultados del ensayo de microvinificación para determinar la capacidad fermentativa de las cepas aisladas del mosto final.

| Cepa # | Densidad Inicial (g/mL) | Densidad Final (g/mL) | Alcohol (%) |
|--------|-------------------------|-----------------------|-------------|
| 3      | 1.4283                  | 1.4145                | 1.8         |
| 4      | 1.4372                  | 1.4155                | 2.8         |

Guerrero Y; Mateus J. (2022)

#### 4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Ya que el propósito de esta investigación fue identificar especies de levaduras nativas presentes en uva negra Isabella y evaluar su capacidad fermentativa en la elaboración de un vino tinto; es importante resaltar que en el presente trabajo se realizó un proceso de re-fermentación, el cual se llevó a cabo en 3 etapas denominadas ensayo 1, ensayo 2 y ensayo 3. Para iniciar el proceso de fermentación se usaron 8 kilos de uva, a partir de este proceso se obtuvo un mosto y de este, se realizaron las re-fermentaciones posteriores necesarias hasta lograr obtener un % de alcohol mayor al 12% o lo equivalente a 6° alcoholímetros, según el Decreto 162 de 2021 (Ministerio de Salud y Protección Social). Ya que en el último ensayo (ensayo 3) se obtuvo este valor de porcentaje (%) de alcohol deseado, en esta etapa se detuvo el proceso de la re-fermentación.

Las uvas tintas permiten obtener un vino fino, con cuerpo y complejidad, que posee un sabor y aroma a notas frutales y dulces, cítricas, algo de madera, cuero, entre otras (Soto, A. 2009), lo anterior fue corroborado por el catador y maestro cervecero Carlos Orejuela de la Universidad Santiago de Cali (**Anexo 1**), también se observó un color intenso a jugo de uva debido a su maceración en frío. Como se observó en la sección de resultados (**Figuras 2,3 y 4**) la elaboración del vino se realizó de forma artesanal, iniciando con el estrujado de las bayas para la extracción del zumo de uva, este zumo se compone en un 86% de agua aproximadamente (Soler, M.E. 2018). En este proceso los hollejos fueron incluidos debido a que estos producen una liberación de compuestos fenólicos como antocianinas, flavonas y taninos, con la finalidad de obtener un vino tinto (María A. Muñoz, 2008). Este proceso se realizó a partir de la fermentación espontánea siendo esta una forma natural en la cual las levaduras nativas se adaptan a un entorno biológico, y las fermentaciones realizadas con la variedad de uva Isabella, permitieron obtener en primera instancia un vino con buenas características enológicas.

Es importante aclarar que la metodología llevada a cabo implicó un proceso de re-fermentación, este proceso se realizó con la intención de aumentar la biomasa en el mosto de uva, ya que, se comprobó que, al traspasar la biomasa del primer ensayo al segundo, y de este último al tercero, aumentaron las probabilidades de encontrar

diversidad de especies de levaduras, creando así un método diferente para la elaboración del vino, logrando un buen proceso fermentativo, el cual cumplió con el porcentaje mínimo de acuerdo al Decreto 162 de 2021. Sin embargo, no es posible encontrar investigaciones relacionadas, este método se realizó libremente para lograr una diversidad de microorganismos en el vino.

El alcohol producido durante las dos primeras etapas de fermentación fue considerable (4.5% y 5.5% para los ensayos 1 y 2 respectivamente), teniendo en cuenta que no se agregó a la fermentación un cultivo iniciador. Además de la levadura de fermentación tradicional *Saccharomyces cerevisiae*, existe una creciente contribución de las especies de levadura no *Saccharomyces* a las características sensoriales del vino y al grado alcohólico de este (González y Morales, 2017). Como se observó en la **Tabla 1**, la correlación entre las temperaturas de los tres ensayos y el porcentaje de alcohol, de acuerdo con la literatura, un rango de temperaturas entre 15 y 35°C disminuye la duración de la fase de latencia y aumenta la velocidad de fermentación; y, al incrementar la temperatura, aumenta la velocidad de consumo de azúcar y nitrógeno. Además, al modificarse el metabolismo de las levaduras, también se varía la composición del vino final. Así, las temperaturas más elevadas favorecen una mayor producción de la mayoría de los productos de la fermentación gliceropirúvica a costa de una menor producción de etanol. Aun así, los compuestos cuya formación está más influenciada por la temperatura son los alcoholes superiores, los ácidos grasos de cadena corta y sus ésteres, ya que tienen su máximo de producción a los 20°C, para progresivamente ir disminuyendo a medida que aumenta la temperatura del proceso (Cirene F. González-Silva, 2015).

Con respecto al crecimiento de las levaduras, aunque se conocen algo más de 100 géneros distintos, las levaduras enológicas que están presentes de manera significativa en la uva, en el mosto, que intervienen en el proceso fermentativo, o son capaces de desarrollar alteraciones en el vino, están representadas por algo más de una quincena de géneros, entre ellos *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Candida*, *Pichia*, *Hansenula*, *Torulaspora*, *Rhodotorula*, *Metschnikowia*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Brettanomyces/Dekkera*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* y *Zygosaccharomyces* (Kurtzman y Fell, 1998; Ribéreau-Gayon et al., 1998; Hidalgo, 2002). Como se observó en las **Figuras 6,7 y 8** se utilizaron medios de cultivo nutritivos como YGC el cual se compone de extracto de levadura que es una fuente de vitaminas esenciales para el crecimiento de las levaduras, también se usó un medio de cultivo diferencial como el WL el cual permite encontrar diferencias entre las especies por la morfología de las colonias de acuerdo con el color, textura, forma, tamaño, consistencia y brillo.

Este medio es utilizado para estudios en vinificaciones con el fin de diferenciar cepas nativas del género *Saccharomyces* (Carol, et al., 1987, Carrau, et al., 1988). En esta investigación se demostró que el WL es un medio viable para el crecimiento de este tipo de levaduras ya que, se observó crecimiento de diferentes colonias que tomaron la coloración del medio y esto, permitió diferenciarlas entre sí. Se realizaron las siembras en este medio y se seleccionaron las cepas que presentaron características morfológicas correspondientes a levaduras a partir del ensayo 3, de acuerdo con lo mencionado al inicio de la discusión, por presentar dicho ensayo el % de alcohol mínimo de acuerdo con la normatividad colombiana (NTC 708 del 2000). Para la supervivencia de estas colonias se usó el método de preservación denominado crioconservación, que consiste en congelar las células de las cepas aisladas del mosto de uva Isabella a una temperatura de -20°C en medio YGC con glicerol, con la finalidad de reducir el metabolismo celular. Luego de dos meses en crioconservación, se reactivaron las cepas y se sembraron en agar YGC para verificar el estado de pureza y viabilidad de las levaduras. En la **Tabla 2** se observó el crecimiento de las cepas del 1 a la 8 en el medio WL, con diferentes morfologías, donde fue posible apreciar que algunas de ellas presentaron formas circulares e irregulares, con bordes enteros, ondulados y lobulados, presentan una elevación convexa, acuminada, plana y elevada y se observan superficies lisas, rugosas, brillantes, secas y cremosas, también tienen un crecimiento invasivo y superficial; además, estas levaduras adsorbieron el color del medio WL y presentaron diversas coloraciones como crema, verde pálido y blanco.

Las cepas aisladas mostraron un porcentaje de viabilidad mayor al 77% (José Luis Hoyos, et al 2010), como lo muestra la **Tabla 3**, dichos valores se determinaron mediante recuento en cámara de Neubauer; los resultados mostraron a las cepas 3 y 4 como las que presentaron el mayor porcentaje de viabilidad entre las ocho cepas aisladas del ensayo 3, con valores de viabilidad superiores al 90% (92.5% y un 94.7% respectivamente). *S. cerevisiae* es un microorganismo modelo utilizado en muchas aplicaciones industriales debido a su capacidad para sintetizar etanol a partir de diversas fuentes de azúcar. Actualmente esta levadura se emplea en varios procesos tecnológicos como la elaboración de cerveza, horneado y vinificación. En esta última, la fermentación alcohólica implica la sucesión y coexistencia de una gran diversidad de géneros y especies de levaduras. Al

comienzo de la fermentación, las poblaciones de levadura no *Saccharomyces* son altas, y géneros como *Hanseniasspora*, *Issatchenkia*, *Starmerella* (*sym. Candida*), *Torulaspora*, *Metschnikowia* se encuentran comúnmente. Durante la fermentación, las especies no *Saccharomyces* son reemplazadas por *S. cerevisiae* debido a su rendimiento superior durante este proceso y su capacidad para producir altas concentraciones de etanol (Fleet, 2003; Heard y Fleet, 1988). Sin embargo, varios estudios confirmaron recientemente las contribuciones positivas de estas levaduras no *Saccharomyces* al vino: son capaces de producir ciertos compuestos aromáticos adicionales que mejoran el sabor y el aroma, además de contribuir al incremento del grado alcohólico del vino (Fleet, 2003; Jolly et al., 2014; Lleixà et al., 2016). Como se mencionó anteriormente, las fermentaciones fueron espontáneas, por lo tanto, no hubo inoculación con un cultivo iniciador, sino que la fermentación del mosto fue llevada a cabo por levaduras nativas presentes en la uva Isabella, las cuales fueron las encargadas de realizar la fermentación alcohólica de manera espontánea. Por último, en esta investigación, al vino obtenido se le realizó la identificación de dos cepas de levaduras nativas halladas: *Sacchromyces cerevisiae* y *Candida Spherica* (*Kluyveromyces lactis*) por medio del equipo de VITEK el cual proporcionó de manera estimada el género y especie. Solo se realizó la identificación de estas cepas debido a que, estas presentaron un porcentaje de viabilidad mejor a comparación de las otras cepas como se muestra en la **Tabla 3** ya que como se mencionó antes, un parámetro importante a la hora de elegir levaduras fermentativas es su viabilidad, entre mayor sea mejor será el proceso en cuanto a su calidad y rendimiento (José Luis Hoyos, et al 2010).

El trabajo de identificación suele ser largo y tedioso y requiere cierta experiencia para identificar las diferentes levaduras de un mosto. Aunque si se desea identificar un único género o especie, el trabajo se simplifica y puede solamente ser necesario realizar alrededor de 20 pruebas. Este trabajo se complica con los diversos cambios que se han producido en la taxonomía de levaduras en los últimos años, lo cual ha llevado a una confusión en la clasificación y nomenclatura de las levaduras con interés en la enología (Jose Antonio, 1997). Todos los cambios organolépticos que sufre el mosto hasta convertirse en vino suceden durante esta etapa de fermentación alcohólica, resultado en gran medida, de los metabolitos que surgen del crecimiento microbiano durante la fermentación. Posteriormente, el vino puede seguir sufriendo modificaciones. De entre las levaduras más conocidas de este proceso, el género *Saccharomyces* ha tenido la mayor parte de la atención del mundo científico por su utilidad como cepa fermentadora, y así especies tales como *S. cerevisiae* (SC), *S. bayanus*, *S. pastorianus* y *S. paradoxus* entre otros, son bien conocidas en el campo. Pero *Saccharomyces* es sólo una pequeña fracción de la comunidad microbiana que habita el mosto. De hecho, este género rara vez se aísla de la superficie de la uva o del suelo de los viñedos. Géneros tales como *Candida*, *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces*, etc. aparecen también en el jugo de la uva y tienen una importancia notoria en las características organolépticas del vino, aunque los datos genómicos sugieren que la diversidad puede ser mucho mayor (Javier Gutierrez, 2018). Es bien sabido que las levaduras no- *Saccharomyces* modifican los aromas y sabores del vino, pero también pueden interactuar con *Saccharomyces* en su crecimiento o metabolismo. De acuerdo con los resultados obtenidos para determinar la capacidad fermentativa de las levaduras aisladas del vino obtenido en este trabajo, se observó que la cepa 3 tuvo un porcentaje de alcohol de 1.8% y la cepa 4 un porcentaje de 2.8%, estas levaduras están caracterizadas por un bajo poder fermentativo y una sensibilidad importante frente al etanol. Las no-*Saccharomyces* son las encargadas de iniciar la fermentación y sus poblaciones van variando conforme lo hace el grado alcohólico. De la mano con el aumento de grado alcohólico va la reducción de nutrientes y juntas generan una presión selectiva que determinará la especie que predomine en cada etapa. *S. cerevisiae* es la más cualificada para la alta graduación alcohólica y por eso es ella la que lleva a cabo la mayor parte de la fermentación (Javier Gutiérrez, 2018). Hasta muy reciente, entre los enólogos europeos predomina la idea que la fermentación espontánea inducida por flora autóctona conduce a la obtención de vinos de mejor aroma y sabor, apoyando la idea de que una flora autóctona consolidada a través de una ancestral tradición vitivinícola produce mejores mostos. La tendencia es distinta hoy en día, ya que se ha comprobado que el uso de levaduras seleccionadas tiene importante ventaja frente a la fermentación espontánea tradicional (José Antonio, 1997).

## 5. CONCLUSIONES

Se logró elaborar vino a partir de levaduras nativas aisladas de la uva Isabella y esto, se evidencia en estudios donde se destaca el uso de levaduras no *Saccharomyces* en los procesos fermentativos que aportan características diferentes en la producción de vino con propiedades organolépticas y sensoriales óptimas.

En el proceso de re-fermentación del vino elaborado, no se adiciono ningún tipo de microorganismo y esto permitió identificar en la uva estudiada, a las levaduras nativas responsables del proceso de fermentación espontánea del alcohol en el mosto proveniente de la uva Isabella.

Se fabricó un vino artesanal a partir de uvas de la variedad Isabella, obtenidas del municipio de la Unión Valle, dicho producto mostró características organolépticas acorde con los requisitos comerciales de acuerdo con el Decreto 1686 de 2012 de Colombia.

Las cepas aisladas 3 y 4, no lograron completar el proceso fermentativo, ya que se obtuvieron valores de alcohol por debajo de lo requerido en la normatividad colombiana (NTC 708 de 2000).

Esta investigación es sumamente importante, ya que en la región del Norte del Valle hay muchos cultivos de uvas; se espera que, en un futuro, la región tenga un reconocimiento en la producción de vino y, además lograr impactar económicamente a la región en el campo vitivinícola con el aporte de un producto de excelente calidad además de impulsar la investigación en el campo de la enología.

## 6. AGRADECIMIENTOS

Agradecemos primero a Dios por permitirnos llegar a concluir este trabajo, a nuestros padres por su apoyo, paciencia y colaboración económica en este proyecto. A nuestras tutoras por su paciencia, dedicación, tolerancia y motivación de sacar adelante y lograr culminar con la investigación y a nuestra alma mater universidad Santiago de Cali por guiarnos a ser grandes profesionales

Se declara que no hay conflicto de intereses entre los autores.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bokulich, N.A., Ohta, M., Richardson, P.M., y Mills, D.A. (2013) Monitoreo de los cambios estacionales en la microbiota residente de la bodega. PLoS One 8: e66437.

Bokulich, N.A., Thorngate, J.H., Richardson, P.M., and Mills, D.A. (2014) La biogeografía microbiana de las uvas de vino está condicionada por el cultivar, la cosecha y el clima. Proc Natl Acad Sci USA 111: E139–E148.

Chávez A, Sonia. (1998). Optimización de la producción del agente de biocontrol *Candida sake* (CPA-1). Tesis doctoral, Universidad de Lleida, 24.

Cirene F. González-Silva et al. (2015) Cinética de fermentación espontánea de vinos tintos de la región de cananea, Sonora. Universidad de Sonora, México D.F.

Cruz de Aquino, Mario A.; Martínez P, Ramón A.; Becerril R, A. Enrique y Chavaro O, Ma. del Socorro. (2012). Caracterización física y química de vinos tintos producidos en Querétaro. Rev. fitotec. mex [online]. vol.35, pp.61-67. ISSN 0187-7380.

Dolande M, Reviakina V, Panizo MM. (2008). Manual de identificación y pruebas de susceptibilidad de levaduras a los antifúngicos. Caracas: Pfizer de Venezuela.

De Malajovich.M, María A. (2008). Biotecnología y vida cotidiana. Manuela de trabajo prácticas de biotecnología, vinos y vinagres. 14-16.

Esteve-Zarzoso, B., Manzanares, P., Ramón, D., Querol, A. (1998). The role of non-*Saccharomyces* yeasts in industrial winemaking. Int. Microbiology, 1: 143-148.

- Fernández de Piérola G. Javier. (2018). El papel de las levaduras en la elaboración del vino, Universidad de Salamanca. 169-198
- Ferrer M, R Peducchi, M Michalazzo, G González, A Carbonneau (2007) Delimitación y descripción de regiones vitícolas del Uruguay en base al método de clasificación climática multicriterio utilizando índices bioclimáticos adaptados a las condiciones del cultivo. *Agrociencia* 11: 47-56.
- Fleet, G. H. (2008). Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Research* 8, 979-995.
- Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.*, 86(1-2), 11-22.
- Fleet, G.H. (1993). *Wine microbiology and biotechnology*. Ed. Harwod Academic Publishers, Switzerland, pp. 510.
- Flota de G.H. (2003). Interacciones de levadura y sabor a vino *Int. J. Food Microbiol.*, 86, págs. 11-22.
- González-Neves, G., Franco, J., Ferrer, M., & Moutounet, M. (2007). Predicción de la composición fenólica y el color de los vinos tintos de acuerdo con el potencial polifenólico de la uva.
- González C., López B., Pérez R., Álvarez M., García A., Acedo E., (2015) caracterización fenotípica de levaduras nativas durante el proceso de fermentación de 11 variedades de uva procedentes de cananea, sonora. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. Hermosillo, Sonora, México.
- Granchi, L., Augruso, S., Ganucci, D., Vicenzini, M. (2007). Biodiversité genomique de *Saccharomyces cerevisiae* pendant la fermentation spontanée du vin conditionnée par le progresión de la vendage dans la cave. *Proceedings XXXth OIV World Congress*, Budapest.
- Goddard, M.R. (2008) Cuantificación de las complejidades de la ingeniería ecosistémica de *Saccharomyces cerevisiae* a través de la fermentación. *Ecología* 89: 2077-2082.
- Hazen C, Howell. (2007) *S. Candida, Cryptococcus and other yeast of medical importance*. In: Murray P, et al Eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th edition. Washington DC: ASM Press; pp 1762-1788.
- Hernández C. José., Trujillo N. Yanine., & Durán O. Daniel. (2011). Contenido fenólico e identificación de levaduras de importancia vínica de la uva Isabella (*Vitis labrusca*) procedente de Villa del Rosario (Norte de Santander) Vitae, revista de la facultad de química farmacéutica, 18, 17-25.
- Hoyos, J. L., Urbano, F. E., Villada Castillo, H. S., Mosquera Sanchez, S. A., & Navia, D. P. (2010). Determinación de parámetros fermentativos para la formulación y obtención de vino de naranja (*Citrus sinensis*). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 8(1), 26-34.
- Jiménez Ochoa, J. P., Otálora Palmezano, E., & Amorocho-Cruz, C. M. (2018). Evaluación de la fermentación alcohólica del mosto de uva Isabella (*Vitis labrusca*). *Ingeniería Y Región*, 20(1), 2-8.
- Lleixà, J., Manzano, M., Mas, A., Portillo, M del C. (2016). Competencia de *Saccharomyces* y no *Saccharomyces* durante la microvinificación bajo diferentes condiciones de azúcar y nitrógeno *Frente. Microbiol.*, 7.
- Kennedy., J. A. (2008) Grape and wine phenolics: observations and recent findings. *Ciencia e Investig. Agraria* 35: 77-90.
- Mateos R. José A (1997). Obtención y caracterización de cepas autóctonas para la elaboración estandarizada de vinos de calidad. Universidad de Extremadura. Departamento de biología y producción de los vegetales, páginas 6-8

Miño Valdés, J. E., Martos Actis, M. A., Herrera Garay, J. L., & González Suarez, E. (2015). fermentación alcohólica con mosto de uva niágara rosada y levaduras de la misma fruta. *Centro Azúcar*, 42, 10-20.

Miranda-Castilleja, D. E., Ortiz-Barrera, E., Arvizu-Medrano, S. M., Ramiro-Pacheco, J., Aldrete-Tápia, J. A., & Martínez-Peniche, R. Á. (2015). Aislamiento, selección e identificación de levaduras *Saccharomyces spp.* nativas de viñedos en Querétaro, México. *Agrociencia*, 49, 759-773.

Minnaar, P. P., du Plessis, H. W., Jolly, N. P., van der Rijst, M., & du Toit, M. (2019). Non-*Saccharomyces* yeast and lactic acid bacteria in Co-inoculated fermentations with two *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains: A strategy to improve the phenolic content of Syrah wine. *Food Chemistry*: X, 4, 100070. doi:

Minebois, R., Pérez-Torrado, R., & Querol, A. (2020). A time course metabolism comparison among *Saccharomyces cerevisiae*, *S. uvarum* and *S. kudriavzevii* species in wine fermentation. *Food Microbiology*, 90, 103484.

Navarre J (1998) *L'oenologie*. Ed. Lavoisier. París, Francia. 354 p.

N.P. Jolly, C. Varela, I.S. Pretorius No es su levadura ordinaria: levaduras no *Saccharomyces* en la producción de vino descubiertas.

Ochiuzzi, M. E., Cataldi, S., Guelfand, L., Maldonado, I., & Arechavala, A. (2014). Evaluación del sistema Vitek 2 para la identificación de las principales especies de levaduras del género *Candida*. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(2), 107-110.

Pincus DH, Oregna S, Chatellier S. (2007). Yeast identification-past, present, and future methods. *Med Mycol*; 45:97-121.

Pinto, C., Pinho, D., Cardoso, R., Custódio, V., Fernandes, J., Sousa, S., et al. (2015) Microbioma de fermentación del vino: un paisaje de diferentes denominaciones vinícolas portuguesas. *Microbiol frontal* 6: 905.

Romeus, B., Salazar, P., Navarro, A., Lugo, D., Hernández, U., Rojas, N., Eslava, C. (2010) Utilidad del sistema VITEK en la identificación y determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de bacterias aisladas de ecosistemas dulceacuícolas. Centro Nacional de Investigaciones Científicas Cuba. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, vol. 41, pp. 1-9.

Raymond E. María Laura; Rosa L. Alberto. (2019). Yeast diversity in *Vitis non-vinifera* ecosystems. *Revista Argentina de microbiología*. Volumen 51. Pag 278 – 283.

Rojo, M. C., Torres Palazzolo, C., Cuello, R., González, M., Guevara, F., Ponsone, M. L. Combina, M. (2017). Incidence of osmophilic yeasts and *Zygosaccharomyces rouxii* during the production of concentrate grape juices. *Food Microbiology*, 64, 7-14.

Rementería, A., Rodríguez, J. A., Calvo, E., Amenabar, R., Muguruza, J. R., Vivanco, A. B., . . . Sevilla, M. J. (2006). Selección e implantación de cepas de levadura del género *Saccharomyces* en la producción de vinos de la Denominación de Origen (DO) Chacolí de Vizcaya/Bizkaiko Txakolina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 23(4), 224-232.



Ruiz, J., Ortega, N., Martín-Santamaría, M., Acedo, A., Marquina, D., Pascual, O. Belda, I. (2019). Occurrence and enological properties of two new non-conventional yeasts (*Nakazawaea ishiwadae* and *Lodderomyces elongisporus*) in wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 305, 108255.

R. González, P. Morales. (2017) Aroma secundario del vino: Comprender la producción de levadura de alcoholes más altos *Bioteología microbiana*, 10 (6), p. 1449.

- Ramon Gonzalez, Andrea M. Guindal, Jordi Tronchoni, Pilar Morales, (2021). Biotechnological Approaches to Lowering the Ethanol Yield during Wine Fermentation, *Biomolecules*, 10.3390/biom11111569, 11, 11, (1569).
- Semana Sostenible (2017). ¡Salud por los viñedos sostenibles! [sostenibilidad.semana.com/medio-ambiente/articulo/vinedos-y-vino-sostenible-en-el-mundo/37685](https://sostenibilidad.semana.com/medio-ambiente/articulo/vinedos-y-vino-sostenible-en-el-mundo/37685).
- Soto, Anjela. (2009). "Características de vinos tintos Pinot Noir, producidos con cepas autóctonas de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas del Valle del Maule". Tesis de pregrado – Ingeniería de Alimentos. Universidad de Chile.
- Soler, M.E. (2018). Calidad y conservación de uva de mesa mínimamente procesada. Tesis de Pregrado - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Setati, M.E., Jacobson, D., Andong, U.C., y Bauer, F. (2012) El microbioma de levadura de viñedo, un mapa microbiano modelo mixto. *PLoS One* 7: e52609.
- Suarez Lepe, J.A. (1997) LEVADURAS VINICAS, Funcionalidad y uso en bodega. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. España. 269 p.
- Torres M F, P C García, F A Pombo, A R Cicero (2006) Índice radio-térmico para el cultivo de la vid. *Rev. Fac. Ciencias Agrarias Universidad Nal. Cuyo* 38: 19-23.
- Tonietto J (2007) Evaluación climática global de las zonas vitícolas. *Rev. Enología*. 4:24-35. This, P., Lacombe, T., & Thomas, M. R. (2006). Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends in Genetics*, 22(9), 511-519.
- Tello,N,Farid.,(2017). Evaluación enológica de la levadura indígena de la provincia del Río Negro: estudios preliminares (tesis de grado). Universidad Nacional de La Plata, ciudad de La Plata, Argentina.
- This, P., Lacombe, T., & Thomas, M. R. (2006). Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends in Genetics*.

Anexos

Anexo 1. Cata del vino por el maestro cervecero Carlos Orejuela (USC).

## BEER SCORESHEET

http://www.bjcp.org / AHA/BJCP Sanctioned Competition Program http://www.homebrewersassociation.org

Judge Name (print) Carlos A. Orejuela Category # 8 Subcategory (a-f) 8 Entry #         

Judge BJCP ID 829161 Subcategory (spell out) wine - wild

Judge Email Carlosorejuela@usc.edu.co Special Ingredients:         

*Use Avery label #3160*

**BJCP Rank or Status:**

|  |  |   |
|--|--|---|
| <input type="checkbox"/> Apprentice        | <input checked="" type="checkbox"/> Recognized | <input checked="" type="checkbox"/> Certified |
| <input type="checkbox"/> National          | <input type="checkbox"/> Master                | <input type="checkbox"/> Grand Master         |
| <input type="checkbox"/> Honorary Master   | <input type="checkbox"/> Honorary GM           | <input type="checkbox"/> Mead Judge           |
| <input type="checkbox"/> Provisional Judge | <input type="checkbox"/> Rank Pending          | <input type="checkbox"/> Cider Judge          |

**Non-BJCP Qualifications:**

|   |   |  |
|---|---|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> Professional Brewer | <input type="checkbox"/> Beer Sommelier | <input type="checkbox"/> GABF/WBC        |
| <input checked="" type="checkbox"/> Certified Cicerone  | <input type="checkbox"/> Adv. Cicerone  | <input type="checkbox"/> Master Cicerone |
| <input checked="" type="checkbox"/> Sensory Training    | <input type="checkbox"/> Other          |  |

**Descriptor Definitions (Mark all that apply):**

- Acetaldehyde – Green apple-like aroma and flavor.
- Alcoholic – The aroma, flavor, and warming effect of ethanol and higher alcohols. Sometimes described as *hot*.
- Astringent – Puckering, lingering harshness and/or dryness in the finish/aftertaste; harsh graininess; huskiness.
- Diacetyl – Artificial butter, butterscotch, or toffee aroma and flavor. Sometimes perceived as a slickness on the tongue.
- DMS (dimethyl sulfide) – At low levels a sweet, cooked or canned corn-like aroma and flavor.
- Estery – Aroma and/or flavor of any ester (fruits, fruit flavorings, or roses).
- Grassy – Aroma/flavor of fresh-cut grass or green leaves.
- Light-Struck – Similar to the aroma of a skunk.
- Metallic – Tinny, coin, copper, iron, or blood-like flavor.
- Musty – Stale, musty, or moldy aromas/flavors.
- Oxidized – Any one or combination of stale, winy/vinous, cardboard, papery, or sherry-like aromas and flavors.
- Phenolic – Spicy (clove, pepper), smoky, plastic, plastic adhesive strip, and/or medicinal (chlorophenolic).
- Solvent – Aromas and flavors of higher alcohols (fusel alcohols). Similar to acetone or lacquer thinner aromas.
- Sour/Acidic – Tartness in aroma and flavor. Can be sharp and clean (lactic acid), or vinegar-like (acetic acid).
- Sulfur – The aroma of rotten eggs or burning matches.
- Vegetal – Cooked, canned, or rotten vegetable aroma and flavor (cabbage, onion, celery, asparagus, etc.)
- Yeasty – A bread, sulfury or yeast-like aroma or flavor.

**Bottle Inspection:**  Appropriate size, cap, fill level, label removal, etc.

Comments:         

**Aroma** (as appropriate for style)  
Comment on malt, hops, esters, and other aromatics

Aroma dulce por fental, cere, malta, ligero tostado con presencia de levadura panal y plasticos. Broma sobre el aroma a uva dulce

**Appearance** (as appropriate for style)  
Comment on color, clarity, and head (retention, color, and texture)

Suyo de uva

**Flavor** (as appropriate for style)  
Comment on malt, hops, fermentation characteristics, balance, finish/aftertaste, and other flavor characteristics

Sabor suave, bromado, cítrico, ácido, aroma de intermediarios a cereales, especias, T.H.P. Sabor crudo a vino sin malta. Juntos, muy fuerte de alcohol

**Mouthfeel** (as appropriate for style)  
Comment on body, carbonation, warmth, creaminess, astringency, and other palate sensations

Astringente, poco dulce, ligero, cuerpo medio, leve alcohol, licor, carbonatado normal

**Overall Impression**  
Comment on overall drinking pleasure associated with entry, give suggestions for improvement

Sabor muy ácido, fuerte malta, sin ser una fermentación de levadura, sabores (Dekkering, Bruxelles) Brest and m. ces

Crédito del proceso en el uva y estereotipo

Total         

|               |   |   |                          |                          |                          |                          |             |                          |       |                          |
|---------------|---|---|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------|--------------------------|-------|--------------------------|
| SCORING GUIDE | Outstanding   | (45 - 50): World-class example of style.                        | Stylistic Accuracy       | <input type="checkbox"/> | Technical Merit          | <input type="checkbox"/> | Intangibles | <input type="checkbox"/> | Total |                          |
|               | Excellent   | (38 - 44): Exemplifies style well, requires minor fine-tuning.  |                          | <input type="checkbox"/> |                          | <input type="checkbox"/> |             | <input type="checkbox"/> |       | <input type="checkbox"/> |
|               | Very Good   | (30 - 37): Generally within style parameters, some minor flaws. |                          | <input type="checkbox"/> |                          | <input type="checkbox"/> |             | <input type="checkbox"/> |       | <input type="checkbox"/> |
|               | Good  | (21 - 29): Misses the mark on style and/or minor flaws.         |                          | <input type="checkbox"/> |                          | <input type="checkbox"/> |             | <input type="checkbox"/> |       | <input type="checkbox"/> |
| Fair          | (14 - 20): Off in aromas or major style deficiencies. Unpleasant. | <input type="checkbox"/>  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |                          |             |                          |       |                          |
| Problematic   | (00 - 13): Major off flavors and aromas dominate. Hard to drink.  | <input type="checkbox"/>  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |                          |             |                          |       |                          |

BJCP Beer Scoresheet Copyright © 2017 Beer Judge Certification Program rev. 170612

Please send any comments to [Comp\\_Director@BJCP.org](mailto:Comp_Director@BJCP.org)

**Anexo 2. Resultados del análisis - equipo VITEK 2**

Cliente de bioMérieux:  
Equipo N°:

**Informe de examen**

Editado por: Elizala  
Revisión n°: 2 de 2

Aislamiento: CEPA3I-1 (Revisado)  
Tipo de tarjeta: YST Código de barras: 2431715403336871 Prueba de instrumento: 00001A0FCC72 (22456)  
Técnico de preparación: Angelica Elizalde(Elizala)

Bionúmero: 4002545201304100  
Cantidad de organismo:

**Organismo seleccionado: Saccharomyces cerevisiae**

|                     |  |
|---------------------|--|
| <b>Comentarios:</b> |  |
|                     |  |
|                     |  |
|                     |  |

**Patrón McFarland: 2.15 (1.80 - 2.20)**

|  |  |                                 |                                     |
|--|--|---------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Información de identificación</b>               | Tarjeta: YST   | Nº de lote: 2431715403          | Fecha caduc.: 07-ago-2022 12:00 COT |
|  | Estado: Final  | Tiempo de análisis: 17,80 horas | Finalizado: 13-may-2022 11:13 COT   |
| <b>Origen del organismo</b>                        | VITEK 2  |                                 |                                     |
| <b>Organismo seleccionado</b>                      | 97% Probabilidad <b>Saccharomyces cerevisiae</b><br>Bionúmero: 4002545201304100 Nivel de confianza: Identificación excelente |                                 |                                     |
| <b>Organismo SRF</b>                               |  |                                 |                                     |
| <b>Organismos de análisis y pruebas a separar:</b> |  |                                 |                                     |
| <b>Mensajes análisis:</b>                          |  |                                 |                                     |
| <b>Perfil(es) típico(s) contraindicante(s)</b>     |  |                                 |                                     |
| Saccharomyces cerevisiae dTREa(20),dMLZa(13),      |  |                                 |                                     |

| <b>Detalles bioquímicos</b> |       |   |    |       |   |    |       |   |    |       |   |    |       |   |    |       |   |
|-----------------------------|-------|---|----|-------|---|----|-------|---|----|-------|---|----|-------|---|----|-------|---|
| 3                           | LysA  | - | 4  | IMLTa | - | 5  | LeuA  | + | 7  | ARG   | - | 10 | ERYa  | - | 12 | GLYLa | - |
| 13                          | TyrA  | - | 14 | BNAG  | - | 15 | ARBa  | - | 18 | AMYa  | - | 19 | dGALa | + | 20 | GENa  | - |
| 21                          | dGLUa | + | 23 | LACa  | - | 24 | MAdGa | + | 26 | dCELa | - | 27 | GGT   | - | 28 | dMALa | + |
| 29                          | dRAFa | + | 30 | NAGA1 | - | 32 | dMNEa | + | 33 | dMELa | - | 34 | dMLZa | + | 38 | ISBEa | - |
| 39                          | IRHAa | - | 40 | XLTa  | - | 42 | dSORa | - | 44 | SACa  | + | 45 | URE   | - | 46 | AGLU  | - |
| 47                          | dTURa | + | 48 | dTREa | + | 49 | NO3a  | - | 51 | IARAa | - | 52 | dGATa | - | 53 | ESC   | - |
| 54                          | IGLTa | - | 55 | dXYLa | - | 56 | LATa  | + | 58 | ACEa  | + | 59 | CITa  | - | 60 | GRTas | - |
| 61                          | IPROa | - | 62 | 2KGa  | - | 63 | NAGa  | - | 64 | dGNTa | - |    |       |   |    |       |   |

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 9.02  
Guía de interpretación de CMI:  
Nombre de juego de parámetros de AES:

Guía de interpretación terapéutica:  
Última modificación de parámetros de AES:

Cliente de bioMérieux:  
Equipo N°:

### Informe de examen

Editado por: Elizala  
Revisión n°: 2 de 2

Aislamiento: CEPA4I-1 (Revisado)  
Tipo de tarjeta: YST Código de barras: 2431715403336870 Prueba de instrumento: 00001A0FCC72 (22456)  
Técnico de preparación: Anglica Elizalde(Elizala)

Bionúmero: 4003105021204110

Cantidad de organismo:

Organismo seleccionado: *Candida spherica*

|                     |  |
|---------------------|--|
| <b>Comentarios:</b> |  |
|                     |  |
|                     |  |
|                     |  |

#### Patrón McFarland: 2.12 (1.80 - 2.20)

|  |   |                                 |  |
|--|---|---------------------------------|--|
| <b>Información de identificación</b>               | Tarjeta: YST  | N° de lote: 2431715403          | Fecha caduc.: 07-ago-2022 12:00 COT          |
|  | Estado: Final   | Tiempo de análisis: 17,78 horas | Finalizado: 13-may-2022 11:12 COT            |
| <b>Origen del organismo</b>                        | VITEK 2   |                                 |  |
| <b>Organismo seleccionado</b>                      | 93% Probabilidad <i>Candida spherica</i><br>Bionúmero: 4003105021204110 |                                 | Nivel de confianza: Identificación muy buena |
| <b>Organismo SRF</b>                               |   |                                 |  |
| <b>Organismos de análisis y pruebas a separar:</b> |   |                                 |  |
| <b>Mensajes análisis:</b>                          |   |                                 |  |
| <b>Perfil(es) típico(s) contraindicante(s)</b>     | Candida spherica LACa(94),dSORa(83),                                    |                                 |  |

| Detalles bioquímicos |       |   |    |       |   |    |       |   |    |       |     |    |       |   |    |       |   |
|----------------------|-------|---|----|-------|---|----|-------|---|----|-------|-----|----|-------|---|----|-------|---|
| 3                    | LysA  | - | 4  | IMLTa | - | 5  | LeuA  | + | 7  | ARG   | -   | 10 | ERYa  | - | 12 | GLYLa | - |
| 13                   | TyrA  | - | 14 | BNAG  | - | 15 | ARBa  | - | 18 | AMYa  | (+) | 19 | dGALa | + | 20 | GENa  | - |
| 21                   | dGLUa | + | 23 | LACa  | - | 24 | MAdGa | - | 26 | dCELa | -   | 27 | GGT   | - | 28 | dMALa | - |
| 29                   | dRAFa | + | 30 | NAGA1 | - | 32 | dMNEa | + | 33 | dMELa | -   | 34 | dMLZa | - | 38 | ISBEa | - |
| 39                   | IRHAa | - | 40 | XLTa  | + | 42 | dSORa | - | 44 | SACa  | +   | 45 | URE   | - | 46 | AGLU  | - |
| 47                   | dTURa | - | 48 | dTREa | + | 49 | NO3a  | - | 51 | lARAA | -   | 52 | dGATa | - | 53 | ESC   | - |
| 54                   | IGLTa | - | 55 | dXYLa | - | 56 | LATa  | + | 58 | ACEa  | +   | 59 | CITa  | - | 60 | GRTas | - |
| 61                   | IPROa | + | 62 | 2KGa  | - | 63 | NAGa  | - | 64 | dGNTa | -   |    |       |   |    |       |   |

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 9.02  
Guía de interpretación de CMI:  
Nombre de juego de parámetros de AES:

Guía de interpretación terapéutica:  
Última modificación de parámetros de AES:

**Anexo 3.** Parámetros de la NORMA TÉCNICA NTC COLOMBIANA 708 del 2000.

### 3.2 REQUISITOS ESPECÍFICOS

Los vinos de frutas deberán cumplir con los requisitos específicos establecidos en la Tabla 1.

**Tabla 1. Requisitos específicos de los vinos de frutas**

| Requisitos   | Valores  |        |
|--|----------|--------|
|  | Mínimo   | Máximo |
| Contenido del alcohol en grados alcoholimétricos a 20 °C   | 6        | -      |
| Acidez total expresada como ácido tartárico en g/dm <sup>3</sup> (libre de SO <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> y ácido sórbico). | 3,5      | 10     |
| Acidez volátil expresada como ácido acético en g/dm <sup>3</sup> (libre de SO <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> y ácido sórbico). | -        | 1,2    |
| Metanol en mg/dm <sup>3</sup> de alcohol anhidro   | -        | 1 000  |
| Azúcares totales previa inversión expresados como glucosa, en g/dm <sup>3</sup>  |          |        |
| - Seco   | 0        | 15     |
| - Semiseco   | 15,1     | 50     |
| - Dulce  | 50,1     | -      |
| Extracto seco reducido en g/dm <sup>3</sup>  | 10,0     |        |
| Sulfatos expresados como sulfato de sodio, en g/dm <sup>3</sup>  |          | 2,0    |
| Cloruros expresados como cloruro de sodio, en g/dm <sup>3</sup>  |          | 1,0    |
| Anhidrido sulfuroso total en mg/dm <sup>3</sup>  |          | 350    |
| Ácido sórbico o sus sales de sodio o potasio en mg/dm <sup>3</sup> , expresado como ácido sórbico.                             |          | 150    |
| Hierro expresado como Fe en mg/dm <sup>3</sup>   |          | 8,0    |
| Cobre expresado como Cu en mg/dm <sup>3</sup>  |          | 1,0    |
| pH   | 2,8      | 4,0    |
| Colorantes artificiales  | negativo |        |