



UNCUYO
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE CUYO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

TESIS DE MAESTRIA

**SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN ENOLÓGICA DE LEVADURAS
AUTÓCTONAS DE VIÑEDOS DE ALTURA ESTABLECIDOS EN LA
QUEBRADA DE HUMAHUACA, PROVINCIA DE JUJUY**

MAESTRÍA EN VITICULTURA Y ENOLOGÍA

Maestrando: Ortega, Amalia María de los Angeles

Directora: Dra. Laura Mercado

Codirectora: Dra. Mariana Combina

Lujan de Cuyo, Mendoza; 2024

i. DEDICATORIA

A Dios, quien me dio la fe, la fortaleza, la salud, paciencia y la esperanza para poder terminar esta Maestría.

A mi adorada hija Agus Arias Ortega, por ser la fuente de mi inspiración y motivación para superarme cada día. Mi triunfo es tuyo, ¡te amo!

A mi madre Miriam quien me enseñó desde pequeña a luchar para alcanzar mis metas.

A mi abuela Adelaida, la persona que más confió en mí y la que me dio la positividad necesaria cada día.

A mis familiares y amigos que tuvieron unas palabras de apoyo durante mis estudios.

A mis directoras de tesis Dra. Laura y Dra. Mariana, cuya guía, experiencia y ejemplo de dedicación han sido fundamentales en mi formación y en la realización de este trabajo.

A todas aquellas personas que compartieron desinteresadamente sus amplios conocimientos y experiencias conmigo.

A todos ustedes, les dedico este trabajo con el corazón, porque cada logro aquí alcanzado, es en gran medida, fruto de su cariño y apoyo constante.

ii. AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, sobre todas las cosas.

A la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo- Mendoza y la Universidad Nacional de Jujuy, por brindarme un espacio propicio para el aprendizaje y el desarrollo de mis ideas, así como por el apoyo constante que he recibido a lo largo de mi formación académica.

A los vitivinicultores de la Quebrada de Humahuaca, por su generosa predisposición para proporcionar muestras y compartir su valiosa experiencia, lo que ha sido fundamental para el desarrollo de esta investigación.

Al Laboratorio de Microbiología de la Estación Experimental Agropecuaria de Luján de Cuyo, Mendoza, del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), por haberme brindado el espacio, los recursos y el acompañamiento técnico necesarios para la realización de algunos ensayos experimentales.

A mis directoras de tesis Dra. Laura y Dra. Mariana, por su dedicación y apoyo incondicional. También extendiendo mi agradecimiento a todos los docentes de la Maestría de Viticultura y Enología, cuyas enseñanzas han sido fundamentales en mi formación profesional.

A Valeria Chimeno por acompañarme y compartir sus conocimientos durante el proceso de identificación molecular de las levaduras.

A mis compañeros de estudio, principalmente a Cristian, por su colaboración y apoyo a lo largo de este proceso académico. Su compromiso y dedicación han sido fundamentales para enriquecer nuestra experiencia compartida. La interacción y el trabajo en equipo con cada uno de ustedes han contribuido significativamente al desarrollo de este trabajo final.

A todos ustedes, gracias por su valioso apoyo.

iii. RESUMEN

La provincia de Jujuy, especialmente la Quebrada de Humahuaca, es un lugar excepcional para el desarrollo de la vitivinicultura, gracias a su clima, la radiación, la altitud y las condiciones edafológicas particulares. Estas características han motivado a varios productores a incorporar la elaboración de vinos de altura, con valor agregado, de excelente calidad como una alternativa socio-económica viable. En este contexto, el papel de las levaduras es fundamental. Por ello, en los últimos años, la tendencia en la industria enológica ha sido utilizar levaduras seccionadas en la misma región donde se van a emplear. Esta práctica no solo permite controlar el proceso de fermentación, debido a que las levaduras están mejor adaptadas a las condiciones locales, sino también favorece la elaboración de vinos con mayor complejidad sensorial y diferenciados, que potencian el *terroir*, esa impronta única de la región. En el presente trabajo se propuso aislar, caracterizar e identificar levaduras autóctonas *Saccharomyces spp.* con potencial enológico, a partir de fermentaciones espontáneas de uvas Malbec de viñedos de altura, pertenecientes a 14 productores de la Quebrada de Humahuaca, provincia de Jujuy, durante la vendimia 2024. Se realizaron análisis físico químicos y microbiológicos mediante métodos convencionales a los mostos utilizados para los distintos ensayos. Se realizaron fermentaciones espontáneas de estos mostos, las cuales se controlaron diariamente midiendo los grados brix, luego se realizó el recuento y aislamiento de levaduras autóctonas. Se realizó una identificación presuntiva del género *Saccharomyces*, en base a sus características morfológicas y crecimiento en agar lisina. Se realizó la tipificación molecular por PCR Interdelta, lo cual permitió confirmar la asignación de especie. En todas las levaduras se evaluaron características tecnológicas que determinaron la eficiencia de las mismas en el proceso de fermentación y características cualitativas que determinaron su participación en las cualidades sensoriales de los vinos. Las levaduras se agruparon según las semejanzas de las características evaluadas, mediante un análisis de conglomerados. Las muestras de uvas colectadas presentaron una calidad fisicoquímica óptima para la elaboración de vinos. Al finalizar la fermentación espontánea se obtuvieron recuentos de 10^6 a 10^8 UFC/mL y se aislaron un total de 57 levaduras, las cuales presentaron características morfológicas típicas del género *Saccharomyces*. Se identificaron 10 perfiles moleculares de *Saccharomyces cerevisiae* diferentes. Las levaduras AM21, 25, 28, 35 y 38 presentaron las mejores características enológicas para su selección como cultivos iniciadores mostrando un buen poder de fermentación con una producción de alcohol potencial por encima del 14% v/v. Presentaron una dinámica de fermentación que se caracterizó por una fase

de latencia corta y un desprendimiento total de 10 a 11,3 g de CO₂/100 mL, sin la necesidad de la adición de una fuente externa de nitrógeno. Además, estas levaduras resistieron la concentración más alta de alcohol y SO₂ probadas, por lo que podrían seleccionarse para cosechas con concentraciones elevadas de azúcar. Produjeron concentraciones traza de ácido acético, ácido sulfhídrico. En la actualidad, las levaduras autóctonas son claves en la preservación tanto de la tipicidad como de la complejidad de los vinos. Por esta razón, y a medida que aumenta el interés por la producción de alimentos y bebidas locales y saludables, la selección de levaduras autóctonas podría representar un enfoque equilibrado, entre lo innovador y lo auténtico para la vitivinicultura de nuestra región. La industria vitivinícola se convierte así, en un ejemplo inspirador de cómo la producción y el consumo pueden coexistir en armonía con la tierra, la comunidad y el bienestar de todos.

Palabras claves: levaduras autóctonas, vinos de altura, *Saccharomyces*, Quebrada de Humahuaca.

IV. ABSTRACT

The province of Jujuy, particularly the Quebrada de Humahuaca, is an exceptional region for the development of viticulture, based on its climate, solar radiation, altitude, and unique edaphic conditions. These characteristics have motivated several producers to incorporate the production of high-altitude wines with added value, of excellent quality, as a viable socio-economic alternative. In this context, the role of yeasts is crucial. Therefore, in recent years, the trend in the winemaking industry has been to use region-specific yeasts, isolated from the same area where they will be employed. This practice not only allows for better control of the fermentation process, as the yeasts are better adapted to the local conditions, but also promotes the production of wines with greater sensory complexity, sustainability, and differentiation, enhancing the unique terroir of the region. This study aimed to isolate, characterize, and identify native *Saccharomyces* yeasts with oenological potential from spontaneous fermentations of Malbec grapes from high-altitude vineyards, belonging to 14 producers in the Quebrada de Humahuaca, province of Jujuy, during the 2024 harvest. Physicochemical and microbiological analyses were conducted using conventional methods on the musts used for the different trials. Spontaneous fermentations were carried out with these musts, which were daily monitored by measuring Brix degrees. Yeast counts and isolations of native yeasts were then performed. A presumptive identification of the *Saccharomyces* genus was made based on morphological characteristics and growth on lysine agar. Molecular typing was performed by Interdelta PCR, which also confirmed the species assignment. Technological characteristics were evaluated for all yeasts, determining their efficiency in the fermentation process, and qualitative traits that defined their contribution to the sensory qualities of the wines. Yeasts were grouped based on the similarities in the evaluated characteristics using cluster analysis. The collected grape samples exhibited optimal physicochemical quality for winemaking. At the end of the spontaneous fermentations, yeast counts ranged from 10^6 to 10^8 CFU/mL, and a total of 57 yeasts were isolated, all exhibiting typical morphological characteristics of the *Saccharomyces* genus. Ten different molecular profiles of *Saccharomyces cerevisiae* were identified. The yeasts AM21, 25, 28, 35, and 38 displayed the most efficient oenological characteristics for selection as starter cultures, with good fermentation power and a potential alcohol production above 14% v/v. They exhibited a fermentation dynamic characterized by a short lag phase and a total release of 10 to 11.3 g of CO₂/100 mL, without the need for an external nitrogen source. Additionally, these yeasts resisted the highest concentrations of alcohol and SO₂ tested, making them suitable for harvests with high sugar concentrations. They produced trace amounts of acetic acid, hydrogen

sulphide. Currently, native yeasts are key to preserving both the typicity and complexity of wines. For this reason, as interest grows in the production of local and healthy foods and beverages, the selection of native yeasts could represent a balanced approach, between innovation and authenticity, for the viticulture of our region. The wine industry thus becomes an inspiring example of how production and consumption can coexist in harmony with the land, the community, and the well-being of all.

Keywords: native yeasts, high-altitude wines, *Saccharomyces*, Quebrada de Humahuaca.

V. INDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Antecedentes.....	1
1.1. Producción de vino en Argentina.....	1
1.1.1. Origen e importancia de la vitivinicultura en la provincia de Jujuy.....	1
1.1.1.2. Producción de vino en la provincia de Jujuy	5
1.2. Variedad Malbec.....	5
1.2.1. Origen de la variedad Malbec	5
1.2.1. El Malbec argentino	6
1.2.2. Distribución del Malbec por provincias productoras	8
1.3. Las levaduras	8
1.3.1 Levaduras Fermentativas	9
1.3.2. Origen y domesticación de levaduras fermentativas	10
1.3.3. Ecología de las levaduras fermentativas.....	11
1.3.4. Especies de levadura de interés industrial.....	12
1.3.4.1. Género <i>Saccharomyces</i>	12
1.3.5. Selección de levaduras en bebidas alcohólicas fermentadas	14
1.3.5.1. Aislamiento de levaduras:.....	15
1.3.5.2. Identificación de especies.....	15
1.3.5.3. Caracterización tecnológica.....	16
1.3.5.3.1. Poder de fermentación:	16
1.3.5.3.2. Dinámica de fermentación.....	17
1.3.5.3.3. Tolerancia a compuestos inhibidores:	18
1.3.5.3.4. Producción de enzimas:	19
2. Formulación y Fundamentación	21
3. OBJETIVOS	24
4. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	24
II. MATERIALES Y MÉTODOS	25
1. Toma de muestras.....	25
2. Aislamiento de las levaduras.....	26
3. Identificación presuntiva de levaduras <i>Saccharomyces</i>	27
4. Tipificación molecular de <i>S. cerevisiae</i>	31
5. Caracterización enológica de las levaduras autóctonas aisladas	32
5.2. Evaluación Inicial.....	33
5.3 Caracterización tecnológica de las levaduras autóctonas.....	34
5.3.1. Resistencia al etanol.....	34
5.3.2. Evaluación del desempeño fermentativo	35
5.3.2.1. Evaluación del poder fermentativo en diferentes condiciones de nutrición.....	35
5.3.2.2 Dinámica de fermentación.....	36
5.3.2.3. Análisis físico-químico de las fermentaciones.....	36
5.3.3. Resistencia al dióxido de azufre	36
5.4.1. Actividad β -glucosidasa	37

6. Análisis estadístico	38
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
1. Origen de los mostos y características físico-químicas.....	39
2. Monitoreo de las fermentaciones espontáneas.....	39
3. Identificación presuntiva de levaduras <i>Saccharomyces</i>	40
3.1. Recuento, caracterización morfológica y diferenciación de las levaduras autóctonas aisladas.....	40
4. Diferenciación intraespecífica de las levaduras aisladas	41
5. Caracterización enológica de las levaduras autóctonas aisladas	44
5.1. Evaluación inicial	44
5.2. Caracterización tecnológica de las levaduras autóctonas.....	46
5.2.1. Resistencia al etanol.....	47
5.2.2. Poder Fermentativo en dos condiciones de nutrición, con y sin la adición de nitrógeno	47
5.2.2.1. Poder fermentativo sin el agregado de una fuente de nitrógeno	47
5.2.2.2. Poder fermentativo con el agregado de una fuente de nitrógeno	50
5.2.2.3. Dinámica de Fermentación	51
5.2.2.5. Análisis fisicoquímico de las fermentaciones utilizadas para estudiar el poder y dinámica de fermentación	54
5.2.3. Tolerancia al Dióxido de Azufre	55
6. Evaluación de otras características de impacto enológico	57
6.1. Actividad β -glucosidasa.....	57
Figura 3.11 a y b. Resultado negativo para producción de actividad β -glucosidasa.	
c- Ejemplo de un control positivo para la metodología utilizada.....	58
6.2. Producción de ácido a partir de la glucosa.....	58
7. Selección final de levaduras autóctonas	60
IV. CONCLUSIONES	64
V. BIBLIOGRAFÍA.....	66

Vii. LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Localización de viñedos de Valles Templados de Jujuy.....	2
Figura 1.2: Viñedo ubicado en Maimara, Jujuy, Argentina.....	4
Figura 1.3: Mapa de producción vitivinícola en la Quebrada de Humahuaca.....	4
Figura 1.4: Superficie de vid y cantidad de viñedos según escala de superficie distribución por departamentos.....	5
Figura 1.5: Mapa de Argentina con su área apta para el cultivo de la vid.....	7
Figura 1.6: Hectáreas cultivadas de la variedad Malbec por provincias.....	8
Figura 2.1. Georreferenciación de los viñedos muestreados.....	25
Figura 2.2. Toma de muestra en viñedos de la Quebrada de Humahuaca.....	26
Figura 2.3. Procedimiento para el aislamiento de las levaduras autóctonas en la etapa final de la fermentación espontánea.....	27
Figura 2.4. Procedimiento para el aislamiento de las levaduras autóctonas en Agar Nutritivo Wallerestein Laboratory (WL).....	28
Figura 2.5. Preparación de cultivos para su conservación.....	28
Figura 2.6. Observación macroscópica de levaduras.....	29
Figura 2.7. Observación microscópica de levaduras.....	29
Figura 2.8. Siembras: Control positivo, agar lisina y control negativo.....	30
Figura 2.9. Ejemplo de trabajo de procesamiento para tipificación molecular de <i>S. cerevisiae</i>	32
Figura 2.10. Recuento de levaduras en cámara de Neubauer.....	32
Figura 2.11. Análisis físico químico de mosto.....	33
Figura 2.12. Tolerancia al etanol.....	34
Figura 2.13. Fermentaciones inoculadas con las levaduras autóctonas.....	35
Figura 2.14. Tolerancia al SO ₂	36
Figura 2.15. Producción de ácido acético.....	37
Figura 3.1. Evolución de las fermentaciones espontáneas.....	40
Figura 3.2. Ejemplo de imagen obtenida para gel de electroforesis mostrando 10 patrones moleculares obtenidos por PCR interdelta.....	44
Figura 3.3. Producción de SH ₂ por las levaduras aisladas en agar biggy.....	45
Figura 3.4. Producción de SH ₂ por las levaduras aisladas.....	46
Figuras 3.5 Evolución de la concentración de etanol producido por las levaduras autóctonas.....	49

Figura 3.6. Evolución de la concentración de etanol producido por las levaduras autóctonas con la adición de una fuente de nitrógeno.....	50
Figura 3.7. Evolución de la concentración de etanol producido por las levaduras autóctonas con la adición de una fuente de nitrógeno a las 48h.....	51
Figuras 3.8 Dinámica Fermentativa obtenida en las fermentaciones a 25° C.....	52
Figuras 3.9 Pérdida de peso (g CO ₂ /100 mL) durante las fermentaciones a las 48 horas.....	53
Figura 3.10. Desprendimiento del tapón de vaspar en mosto con concentraciones de 300 ppm de SO ₂	56
Figura 3.11 Resultado negativo para producción de actividad β-glucosidasa.....	58
Figuras 3.12. Producción de ácido acético.....	59
Figura 3.13. Dendrograma de relaciones moleculares entre patrones obtenidos por PCR interdelta.....	60
Figura 3.14. Dendrograma de caracterización enológica de levaduras autóctonas seleccionadas.....	61
Figura 3.15. Selección de levaduras autóctonas con mejores características enológicas.....	62

Vi. LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1: Programa de Interdelta-PCR utilizado.....	31
Tabla 3.1. Composición físico-química de mostos obtenidos y recuentos de levaduras viables.....	39
Tabla 3.2. Código, origen y patrón molecular de 10 levaduras autóctonas.....	44
Tabla 3.3. Caracterización enológica de las levaduras preseleccionadas.....	47
Tabla 3.4. Análisis fisicoquímico de las fermentaciones utilizadas para estudiar el poder y dinámica de fermentación.....	54

I. INTRODUCCIÓN

1. Antecedentes

1.1. Producción de vino en Argentina

Según el Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV), se registran superficies implantadas con vid en 19 provincias argentinas. El 71,2% del total se encuentra en Mendoza, 19,9% en San Juan, 3,6% en La Rioja, 1,8% en Salta, 1,3% en Catamarca, 0,9% Neuquén y 0,7% Río Negro. Estas 7 provincias concentran el 99,4% de la superficie total. El restante 0,6% se distribuye en 12 provincias: La Pampa, Córdoba, Buenos Aires, Tucumán, San Luis, Chubut, Jujuy, Entre Ríos, Misiones, Santiago del Estero, Santa Fe y Santa Cruz (INV, 2023).

En lo referido a la elaboración de vinos, en el año 2024, se elaboraron 10.868.843 hl de vino, de los cuales 7.403.722 hl corresponden a vinos tintos, 3.101.977 hl a vinos blancos y 363.143 hl a vinos rosados (INV, 2024).

1.1.1. Origen e importancia de la vitivinicultura en la provincia de Jujuy

La vitivinicultura en Jujuy tiene sus orígenes en el departamento de El Carmen, principalmente en la ciudad de Monterrico, Perico y San Antonio, ubicadas en la región de los Valles Templados, el cual siempre contó con un clima privilegiado, templado en invierno y cálido en verano, ideal para la actividad agropecuaria. Por su parte, el río Perico proveía de agua a seis acequias principales aprovechando las aguas de dominio público.

Hacia el 1914, el Gobierno Provincial fomentó la actividad vitícola mediante una política de protección que eximía al vino jujeño de impuestos al consumo por un lapso de diez años. Dándole una clara ventaja sobre aquellos fabricados en otros puntos del país. Durante este período, en El Carmen llegaron a existir 55 bodegas que producían alrededor de dos millones de litros de vino (Montalvetti, 2005).

Sin embargo, a fines de 1934, dos leyes nacionales afectaron gravemente la viticultura provincial. La primera imposibilitaba a los vinos jujeños de baja graduación alcohólica, a competir con los producidos en la provincia de Mendoza y la segunda que fue la más severa, instrumentaba la expropiación de fracciones de tierras con viñedos cultivados, las cuales posteriormente fueron comercializadas a productores rurales con la estricta condición de no cultivar vides. Estas vicisitudes desarticularon la actividad vitivinícola dando lugar a otras que de forma obligada necesitaban aprovechar las

superficies de cultivo, tales como la caña de azúcar y los tabacos finos del tipo Virginia, los cuales por sus óptimos resultados fueron desplazando la producción del vino (Montalvetti, 2005).

El auge de la actividad tabacalera junto con la depreciación del vino, provocó que la viticultura se extinguiera en su totalidad. No fue sino hasta el año 2014 que se reinició la actividad vitivinícola en la región del Valle, en el departamento de El Carmen y Dr. Manuel Belgrano. Actualmente, existen 10 productores que elaboran vino en esta zona (Figura 1.1) (Braticevic, 2022).

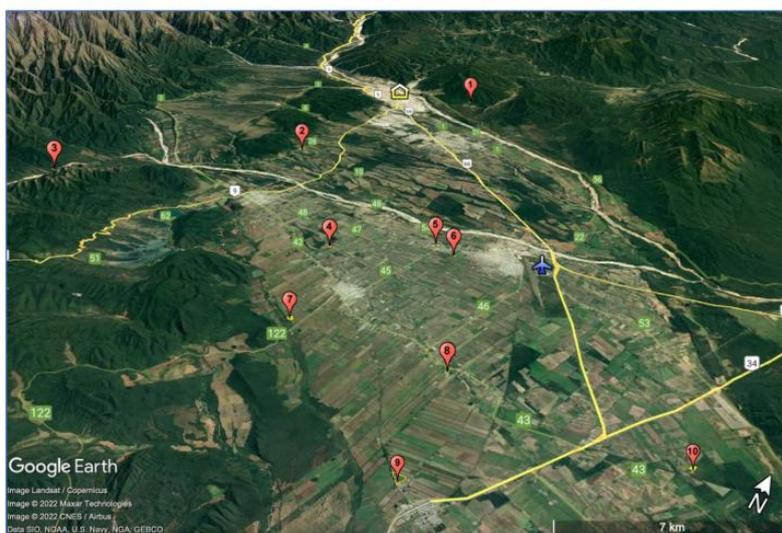


Figura 1.1. Localización de viñedos en Valles Templados de Jujuy
Fuente: Braticevic, 2022.

1.1.1.1. La vitivinicultura en la región de la Quebrada

A raíz de las políticas que prohibían el cultivo de vides en la provincia, la actividad vitivinícola en El Carmen fue erradicada, lo que llevó a un cambio en la producción agropecuaria de la región. Sin embargo, la viticultura no desapareció por completo en Jujuy. En 2003, la actividad resurgió en la Quebrada de Humahuaca, en el pueblo de Maimará (Figura 1.2), donde comenzó a ganar terreno nuevamente, dando paso a un nuevo capítulo para la vitivinicultura jujeña (Carmona Torres, 2020).

La Quebrada de Humahuaca es un extenso, estrecho y árido valle montañoso, donde la altura sobre el nivel del mar asciende desde 1.250 a 3.700 metros. Los vinos elaborados en el corazón de la Quebrada de Humahuaca son considerados de extrema altura, con plantaciones que se encuentran a 3.300 metros (INV, 2018). De norte a sur

atraviesa diferentes climas. Genéricamente se lo clasifica como de montaña. Los días son de sol intenso y por las noches la temperatura baja de manera pronunciada. Esas amplitudes térmicas diarias también se producen a nivel estacional, con veranos de mucho calor e inviernos fríos, con vientos y heladas. Estas condiciones son propicias para la obtención de vinos de calidad, ya que se considera que al crecer en amplitud térmica los vinos ganan en aroma y al crecer en altura, ganan en color (Vallone et al., 2024).

Los suelos de la Quebrada de Humahuaca son escasamente desarrollados. En general, se observan terrazas bajas de influencia fluvial y depósitos coluvio-aluviales y vías de escurrimiento, predominando suelos del Orden Entisoles, con alto porcentaje de suelo desnudo, abundantes fragmentos líticos gruesos y amplias zonas de acumulaciones de arena. Los suelos muy cercanos al alveolo del Río Grande con agua infiltrada cercana a superficie suelen ser Haplustoles fluvénticos. Gran variabilidad de texturas, pedregosidad y profundidad efectiva a lo largo de la quebrada según cercanías a los grupos de material madre, a su posición en taludes y terrazas y en función de la potencia de los aluviones que acarrearón los sedimentos en tiempos pretéritos. En general son de pH moderadamente alcalino a neutro, no salinos y no sódicos, con poco riesgo de erosión (Vallone et al., 2024).



Figura 1.2. Viñedo ubicado en Maimara, Jujuy, Argentina. Elaboración propia.

En el año 2015, la región obtuvo su Indicación Geográfica (IG), reconociendo la Quebrada de Humahuaca como un área de producción vitivinícola de calidad. El alcance geográfico de la normativa cubre el espacio de la quebrada hasta 400 metros por encima del Río Grande desde el extremo sur de la localidad de Purmamarca hasta el extremo norte de la localidad de Humahuaca, a lo largo de 80 kilómetros (INV, 2015). Esta IG es

un atractivo adicional para el enoturismo, especialmente el internacional, que empieza a tomar en cuenta la región (INV, 2018).

Esta es una de las razones que incentivaron a los productores de la zona, a incluir dentro de sus sistemas productivos la actividad vitivinícola para la elaboración de vinos como una alternativa socio-económica viable. En la actualidad existen 22 bodegas en la Quebrada de Humahuaca, ubicadas principalmente en los departamentos de Tilcara, Tumbaya y Humahuaca (Figura 1.3) (Braticevic, 2022; Vallone et al., 2024).



Figura 1.3. Mapa de producción vitivinícola. Quebrada de Humahuaca.
Índice de Winkler: parámetro bioclimático utilizado para evaluar principalmente como influye la temperatura y la altitud sobre el color y características sensoriales del vino. Winkler I: Grados Día <1800 (uvas para vinos de alta calidad). Winkler II: >1800.

Fuente: Braticevic, 2022.

1.1.1.2. Producción de vino en la provincia de Jujuy

En cuanto a la producción, Jujuy representa el 0,01% en el país y registra 13 variedades de uva, todas aptas para la elaboración de vino. Del total, 8 son tintas, 3 son blancas y 2 rosadas. Las más cultivadas son: Malbec, Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Merlot, y Syrah. Antes del año 2000 sus viñedos no estaban declarados, por lo que no figuran registros del INV de esa época. Las variedades tintas representan el 90% del total de superficie cultivada, las blancas alcanzan el 9% y las rosadas el 1% (INV, 2018).

Con una producción de uva de 2435 quintales, registrada en el año 2024, los departamentos de Tumbaya, Tilcara y Humahuaca son los principales productores de vino en la provincia de Jujuy y elaboraron 1742 hectolitros de vino, de los cuales 1411 es tinto, 191 es blanco y 141 es rosado (INV, 2024). Con respecto a la superficie total de hectáreas de vid, de acuerdo con datos informados por el INV es de 64, la cantidad total de viñedos es de 38 (Figura 1.4). En la Quebrada de Humahuaca, la producción se inició con 11 hectáreas en el año 2003, llegando al año 2023 con 57,5 ha, concentrando la mayoría de la producción en el departamento de Tilcara (INV, 2023).

PROVINCIA: JUJUY

DEPARTAMENTOS	VIÑEDOS		SUPERFICIE		Tamaño medio del viñedo (ha)
	Cantidad	% sobre total	Hectáreas	% sobre total	
TILCARA	16	42,1	36,9	50,4	2,3
TUMBAYA	12	31,6	15,6	21,3	1,3
EL CARMEN	6	15,8	13,2	18,1	2,2
HUMAHUACA	2	5,3	5,0	6,8	2,5
DR MANUEL BELGRANO	1	2,6	1,3	1,8	1,3
SAN ANTONIO	1	2,6	1,1	1,5	1,1
TOTAL JUJUY	38	100,0	73,2	100,0	1,9

Figura 1.4. Superficie de vid y cantidad de viñedos según escala de superficie distribución por departamentos – Año 2023 (INV, 2023).

1.2. Variedad Malbec

1.2.1. Origen de la variedad Malbec

La variedad Malbec (*Vitis Vinifera L.*) es considerada la uva tinta emblemática de la Argentina y se caracteriza por ser un cultivar exigente respecto a las condiciones agroecológicas de las zonas de producción y al manejo del viñedo, al momento de expresar todo su potencial. Según diversos autores sería originaria de las zonas de

Cahors, Quercy o la Touraine, en el sud-oeste de Francia, donde se la conoce con el nombre de Cot o Auxerroirs (Rodríguez, 2011).

La introducción del Malbec en Argentina coincidió con el ingreso de otros cultivares europeos a mediados del siglo XIX, atribuyéndose esta labor al agrónomo francés Michel Aimé Pouget. Esta variedad tuvo una rápida difusión en la Provincia de Mendoza, adaptándose notablemente a diferentes condiciones agroecológicas y alcanzando una superficie superior a 50.000 ha en el año 1966 (Pandolfi, 2000). La denominación "Malbec" por la cual se la conoce en Argentina, proviene de "Malbeck", el nombre del viticultor húngaro que habría introducido esta variedad en Burdeos (Catania y Avagnina, 2010).

1.2.1. El Malbec argentino

La variedad implantada en nuestro país resalta un racimo mediano, lleno, cónico, con bayas negro-azuladas, medianas y redondas. Ampelográficamente se caracteriza por su hoja mediana, orbicular y cuneiforme, y por su dimorfismo (enteras y trilobadas), con característicos dientes agudos y agresivos, seno peciolar en V, punto peciolar levemente rosado y pecíolo mediano, muy coloreado (INV, 2022).

La variedad fue difundida desde Mendoza al resto del país. Actualmente, las regiones vitivinícolas se extienden como se indica en el Figura 1.5, desde el departamento de Humahuaca, en la provincia de Jujuy (22° de latitud, 2939 msnm), hasta los valles de la provincia de Rio Negro (40° de latitud sur y 300 msnm) en la región patagónica.



Figura 1.5. Mapa de Argentina con su área apta para el cultivo de la vid.
Fuente: Cesari, 2015

Desde el punto de vista enológico, es una variedad apta para la elaboración de vinos tintos jóvenes y de guarda, como así también para la producción de vinos rosados y espumantes. Organolépticamente, los vinos Malbec se caracterizan por una alta intensidad colorante, con matices violetas y negros. Los descriptores aromáticos más citados son frutos rojos (ciruela, mora), violetas y anís, con algún carácter herbáceo cuando las uvas provienen de viñedos desequilibrados. En boca, se caracteriza por presentar taninos suaves, maduros y redondos, y por un sabor ligeramente dulce. Envejece muy bien y es adecuado para la crianza en barricas (Vila, 2002; Casassa, 2007).

La altitud y la temperatura son factores importantes que influyen en las características de los vinos. A mayor altitud, y en combinación con temperaturas más bajas, los vinos presentaron mayor intensidad de matices violeta y negro, con marcada presencia aromática de frutos secos y frutas deshidratadas. Vinos provenientes de sitios de menor altura, se expresaron de manera más variada, presentando un mayor abanico aromático, siendo a su vez menos astringentes y presentar menor intensidad de amargor (Barroso et al., 2019).

1.2.2. Distribución del Malbec por provincias productoras

La variedad Malbec está presente en 17 provincias vitivinícolas de Argentina (Figura 1.6) registró en el año 2023, un total de 46.941 ha cultivadas, lo cual representa el 22,5% del total de vid del país y el 40,8% de las variedades tintas aptas para elaboración de vinos y/o mostos. La superficie cultivada aumentó un 50% desde el año 2010 al 2023, aproximadamente 15.894 ha (INV, 2023).

El Malbec es la variedad más cultivada en la provincia de Jujuy, tanto en la zona de la Quebrada con 26,55 ha, como también en los valles templados con 4,15 ha, le siguen la variedad Syrah, Cabernet Franc y Cabernet Sauvignon (Figura 1.6) (I.N.V, 2023).

TINTAS DE ELABORACIÓN							
VARIEDAD	TILCARA	TUMBAYA	EL CARMEN	HUMAHUACA	DOCTOR MANUEL BELGRANO	SAN ANTONIO	TOTAL JUJUY
MALBEC	17,82	6,06	3,35	2,67	0,62	0,18	30,70
SYRAH	4,82	2,51	0,27	0,84	-	-	8,44
CABERNET FRANC	4,24	2,50	1,21	-	0,37	0,07	8,38
CABERNET SAUVIGNON	1,98	1,12	1,78	0,12	-	0,18	5,18
MERLOT	1,06	0,01	1,61	1,25	0,03	0,18	4,14
TANNAT	1,44	0,08	0,26	0,01	-	-	1,79
PINOT NEGRO	0,21	0,40	0,20	-	0,04	-	0,85
PETIT VERDOT	0,36	0,43	-	0,05	-	-	0,84
BONARDA	-	0,52	-	-	-	0,07	0,59
TEMPRANILLO	-	0,14	0,42	-	-	-	0,57
CARMENERE	0,02	-	0,44	-	-	-	0,46
MARSELAN	0,03	0,27	0,15	-	-	-	0,45
MONASTRELL	0,26	-	-	-	-	-	0,26
GARNACHA (GRENACHE NOIR)	0,26	-	-	-	-	-	0,26
CORDISCO	-	-	0,15	-	-	-	0,15
ANCELOTTA	-	0,05	0,05	-	-	-	0,10
TOTAL TINTAS ELABORACIÓN	32,48	14,10	9,88	4,93	1,05	0,68	63,12

Figura 1.6. Hectáreas cultivadas de la variedad Malbec en la provincia de Jujuy.

Fuente: INV, 2023.

1.3. Las levaduras

Las levaduras son microorganismos unicelulares eucariotas, pertenecientes al reino Fungi, concretamente a la división Eumycota. En esta división encontramos las subdivisiones Basidimycotina, y Ascomycotina, representada por las levaduras capaces de producir esporas dentro de ascos (denominadas ascosporas), y Deuteromycotina, que actualmente se las conoce también como mitospóricos, formada por las levaduras incapaces de formar esporas (Kurtzman et al., 2011). Este grupo de microorganismos comprende alrededor de 100 géneros y 700 especies. Las células de levadura presentan diferentes morfologías en función del género y especie, pudiendo observarse formas esféricas u ovoides, elípticas o apiculadas (forma de un limón). Además, en determinadas condiciones ambientales, como el tipo y cantidad de nutrientes

disponibles, o fase de crecimiento de la levadura y la especie podemos observar la formación pseudohifas o agrupaciones de células sin septos (Kurtzman et al., 2011).

Son capaces de reproducirse asexualmente mediante gemación, que dependiendo de la posición de la yema o brote puede ser polar, bipolar o multipolar; o excepcionalmente mediante fisión (algunas especies), dando lugar a individuos genéticamente idénticos, cuyo estado se denomina anamórfico. Asimismo, muchas especies pueden reproducirse sexualmente, mediante la formación de ascosporas, estado que recibe el nombre de teleomórfico. De hecho, a menudo encontramos que algunas especies de levaduras reciben nombres diferentes en función de su estado sexual. Por ejemplo, al género *Brettanomyces* (estado asexual o anamorfo) se le denomina *Dekkera* en su estado sexual o teleomorfo, aunque en la práctica se aplique uno de los dos nombres (Kurtzman et al., 2011).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae*, es la levadura más estudiada, la reproducción asexual se realiza por gemación. Este proceso implica la formación de una yema en la célula madre seguida de la división nuclear y la citoplasmática, resultando en una célula hija de menor tamaño. En condiciones de estrés nutricional las levaduras diploides mediante meiosis pueden originar cuatro ascosporas haploides. Estas últimas, al germinar, dan lugar a células haploides que, al encontrarse con un tipo sexual compatible, se fusionan para formar un cigoto diploide, reiniciando así el ciclo de vida (Kurtzman et al., 2011). Su metabolismo le permite crecer tanto en condiciones de aerobiosis como de anaerobiosis. Posee una alta actividad metabólica, por lo que en la fase aerobia se caracteriza por la producción de biomasa y en la fase anaerobia son capaces de asimilar y fermentar un amplio espectro de carbohidratos, de complejidad variable como la glucosa, maltosa, fructosa, sacarosa, maltotriosa e incluso dextrinas. A este grupo de levaduras se las conoce como levaduras fermentativas (Kurtzman et al., 2011).

1.3.1 Levaduras Fermentativas

La mayoría de los alimentos fermentados están elaborados por especies de levaduras pertenecientes al grupo *Saccharomyces* (Alsammar y Delneri, 2020). especializadas en el consumo de hidratos de carbono en ausencia de oxígeno o incluso en presencia de oxígeno, cuando existe una alta concentración de azúcares, ya que se produce una represión por sustrato, en un efecto conocido como "Efecto Crabtree" (Ciani y Comitini, 2019). Estas levaduras convierten el azúcar en etanol, lo que supone una ventaja competitiva frente a otras levaduras (Ciani et al., 2020). El género

Saccharomyces está constituido actualmente por ocho especies, como son, *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. jurei*, *S. kudri avzevii*, *S. arboricola*, *S. eubayanus* y *S. uvarum* (Alsammar y Delneri, 2020).

1.3.2. Origen y domesticación de levaduras fermentativas

La domesticación de las levaduras fermentativas es un proceso que se remonta a la antigüedad. Aunque no se sabe con certeza, estudios arqueológicos sugieren que las primeras fermentaciones dirigidas por humanos ocurrieron hace más de 7.000 años, posiblemente en el antiguo Egipto, Mesopotamia y otras civilizaciones tempranas. Almeida et al (2015), encontraron evidencias de que las levaduras de vino de los bosques de roble americano albergaban el linaje de las cepas de vino domesticadas. Por otro lado, es probable que todas las cepas procedan de China, ya que es en esta región donde se han encontrado más evidencias acerca del origen de *S. cerevisiae* (Duan et al., 2018).

Durante la domesticación, las levaduras *S. cerevisiae* han sido sometidas a procesos de selección tanto naturales como dirigidos, y en muchos casos, el aislamiento y la propagación de cepas específicas de levaduras en cultivos han permitido mejorar las características deseables. A medida que los humanos comenzaron a entender mejor el proceso de fermentación, seleccionaron levaduras que no solo produjeran etanol de manera eficiente, sino que también fueran resistentes a las condiciones ambientales de las fermentaciones, como la concentración de etanol, la variabilidad de la temperatura o la presencia de otros microorganismos competidores. La domesticación también ha implicado la adaptación de las levaduras a las condiciones específicas de los procesos industriales, como la producción de vino, a través de la selección y propagación de cepas con rasgos fenotípicos y genéticos deseados (Duan et al., 2018).

Lo que parece claro es que la domesticación, tiene un origen en la evolución adaptativa de la especie, debido a una fuerte selección en nichos específicos, condicionada por el ser humano a lo largo de cientos de años (Gallone et al., 2016). Un ejemplo obvio se encuentra en la cerveza, ya que las levaduras se reutilizan después de cada lote de fermentación, lo que provoca que se encuentren creciendo de forma continua en su nicho industrial (Gallone et al., 2018). Asimismo, en el vino las levaduras solo pueden crecer en mosto durante unas semanas en una determinada época del año, por lo que el resto del año al carecer de nutrientes pueden permanecer en forma de ascosporas y cuando el medio sea favorable reproducirse e incluso hibridar con otras cepas, contribuyendo así a la diversidad genética de estas cepas (Stefanini et al., 2016).

Además, muchos genes asociados con la resistencia al estrés, la respuesta ambiental y el transporte y metabolismo de azúcares generalmente se duplican en los linajes domesticados (Duan et al., 2018).

1.3.3. Ecología de las levaduras fermentativas

Las levaduras son microorganismos ubicuos, que pueden habitar en ambientes naturales e industriales, cuya abundancia y presencia en los mismos dependerá de factores bióticos y abióticos.

Las levaduras fermentativas se pueden encontrar en los viñedos repartidas irregularmente sobre los sarmientos, hojas, racimos y en la superficie de los granos de uva maduros; localizándose sobre todo en los estomas y lugares donde existen microfisuras, que pueden exudar hacia el exterior sustancias azucaradas, y en mucha menor cuantía sobre la pruina que cubre el resto del hollejo (Hidalgo Togores, 2003).

La dispersión de las levaduras está influenciada por su interacción con otras especies, como los insectos, con los que establecen relaciones de mutualismo. En estas interacciones, los insectos son capaces de localizar fuentes de azúcares gracias a la liberación de compuestos volátiles producidos por las levaduras, mientras que estas últimas logran dispersarse hacia nuevos ambientes. Esta dispersión no solo les permite colonizar nuevos hábitats, sino que también incrementa la diversidad genética al generar oportunidades de exogamia con las cepas presentes en el nuevo entorno (Madden et al., 2018). El suelo, las yemas de vid y principalmente la corteza son reservorio de las levaduras, ya que la disponibilidad de azúcares en las uvas solamente se restringe a determinadas épocas del año (Gonzalez et al., 2019; Cadez et al., 2019).

Es importante tener en cuenta que la mayor parte de las levaduras aisladas en el ambiente natural corresponden a levaduras débilmente fermentativas (No-*Saccharomyces*) y raramente se encuentran levaduras del género *Saccharomyces*. Las levaduras No-*Saccharomyces* se encuentran principalmente en la superficie de la piel de las uvas. La densidad de la población y biodiversidad de levaduras autóctonas en las uvas están estrechamente relacionadas con numerosos factores, como la ubicación geográfica del viñedo, el ambiente propio en el que se encuentra, la composición físico-química del suelo, el clima, la edad de los viñedos, los productos fitosanitarios usados, la variedad de uva, su condición sanitaria y el grado de maduración (Ciani et al., 2020). En las uvas inmaduras, por ejemplo, la concentración celular es baja ($10\text{-}10^3$ ufc/g),

mientras que en el fruto maduro o dañado puede superar las 10^4 - 10^6 ufc/g al haber mayor disponibilidad de azúcar (Fleet, 2003; Querol et al., 2003).

Durante la fermentación espontánea es posible observar un fenómeno en la diversidad y ecología de las levaduras en el mosto. De acuerdo con distintos autores, en la etapa inicial de una fermentación espontánea, podemos encontrar levaduras de los géneros *Hanseniaspora*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Hansenula*, *Rhodotorula*, y *Kluyveromyces*, ocasionalmente especies de los géneros *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Issatchenkia*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Torulaspota*, *Dekkera* y *Schizosaccharomyces* (Fleet, 2003; Jolly et al., 2014; Roudil et al., 2020). A medida que la fermentación avanza, el bajo pH, en conjunto con el aumento del etanol y el agregado de SO₂ principalmente, favorecen el dominio de las levaduras del género *Saccharomyces* que llevan a término el proceso (Bokulich et al., 2016; Wei et al., 2022).

Los factores que pueden afectar a la diversidad, abundancia y sucesión de las levaduras, están relacionados con factores bióticos y abióticos como, la composición del medio, la distinta afinidad por los nutrientes, la presencia de toxinas, enzimas hidrolíticas, la disminución del oxígeno disponible, pH, temperatura de fermentación y de las interacciones que se producen entre especies de levaduras y con otros organismos (bacterias, hongos, e incluso insectos), los cuales pueden producir sustancias inhibitoras (Pretorius, 2020), o incluso la liberación de sustancias que participen en procesos de comunicación celular o "Quorum Sensing" (Fleet, 2003; Wang et al., 2015; Conacher et al., 2019).

En el caso de las bebidas fermentadas, compuestos inhibidores como el etanol producido durante la fermentación, o el SO₂ añadido como antioxidante y antiséptico selectivo, también pueden afectar a la ecología de las levaduras, especialmente a las levaduras no- *Saccharomyces*, que son menos tolerantes (Papadopoulou et al., 2023; Chen et al., 2022).

1.3.4. Especies de levadura de interés industrial

1.3.4.1. Género *Saccharomyces*

Las levaduras de la especie *S. cerevisiae* están adaptadas a la fermentación de mosto para la obtención de vino. La principal característica de estas levaduras es que poseen una elevada capacidad fermentativa y una elevada tolerancia al etanol lo que les permite implantarse a medida que el oxígeno disminuye y se incrementa la cantidad de etanol (Bokulich et al., 2016; Wei et al., 2022; Vicente et al., 2023).

El avance de la tecnología aplicada en la industria de la producción de vino y la necesidad de mantener una calidad estandarizada año tras año, han conducido a la selección de levaduras *S. cerevisiae* en diferentes lugares del mundo para ser usadas como cultivos iniciadores de la fermentación (Molinet y Cubillos, 2020; Parapouli et al., 2020). Actualmente, existen en el mercado cientos de estas cepas, capaces de influir de forma decisiva sobre la calidad general del vino y en particular sobre sus características aromáticas (Garofalo et al., 2018; Tufariello et al., 2019; Berbegal et al., 2023). Sin embargo, esta práctica, actualmente se cuestiona, debido a que los vinos elaborados tienden a carecer de complejidad organoléptica y presentan perfiles sensoriales homogéneos, con pérdida de tipicidad asociada a su origen de producción o variedad (Molinet y Cubillos, 2020; Alperstein et al., 2020).

Es por esto, que las nuevas tendencias en la elaboración de vino hacen foco en el concepto de "huella microbiológica del *terroir*" (Bokulich et al., 2016; Wei et al., 2022; Chen et al., 2023; Papadopoulou et al., 2023;), y proponen el uso de levaduras autóctonas aisladas en el mismo lugar en el cual van a ser utilizadas. Esto trae ventajas en términos de eficiencia en la implantación y adaptación al entorno específico, su aporte a la composición química y las propiedades sensoriales de los vinos elaborados en cada región, contribuyendo de manera significativa a la diversidad organoléptica tan apreciada por los consumidores (Capece et al., 2014; Li et al., 2021; Pacheco et al., 2021; Chen et al., 2023).

Se pueden encontrar numerosos trabajos de investigación realizados en regiones con tradición vinícolas, como el de Berbegal et al (2023) donde aislaron y caracterizaron cepas autóctonas de *S. cerevisiae* de uvas Cabernet Sauvignon de Requena, España. Once de las cepas aisladas presentaron características enológicas eficientes, con las cuales se elaboraron vino con bajo contenido de ácido acético, etanol moderado y mayor concentración de glicerol; así como altas concentraciones de antocianinas, taninos y compuestos aromáticos, como ésteres y alcoholes, especialmente 2-feniletanol y butirolactona, que contribuyeron en la calidad del aroma. En Italia, Tufariello et al (2019), aislaron, identificaron y caracterizaron 15 levaduras *S. cerevisiae* autóctonas. Los vinos elaborados con uva "Primitivo" cultivada en Apulia, se caracterizaron por altos niveles de ésteres, asociados a matices frutales, así como de alcoholes responsables de notas vinosas, dulces y florales. Además, desde el punto de vista sensorial, todos los vinos fueron valorados positivamente, caracterizándose por su persistencia e intensidad, buen equilibrio y cuerpo. En la misma región, Garofalo et al (2018) seleccionaron cepas de *S. cerevisiae* que presentaron potencial biotecnológico

adecuados para mejorar la calidad de los vinos espumosos de la región y proporcionar un motor de innovación/segmentación en el mercado. Vaudano et al (2019) caracterizaron levaduras aisladas de uvas Grignolino de Piamonte, Italia. Se aisló una levadura *S. paradoxus* y diez cepas diferentes de *S. cerevisiae*, todas presentaron potencial enológico.

Existen algunas experiencias previas en la Quebrada de Humahuaca, Ortega et al (2017) y Burgos et al (2019) aislaron y caracterizaron levaduras autóctonas de uvas de distintas variedades tintas cultivadas en esta región, encontrando algunas levaduras características enológicas eficientes, las cuales se encuentran en evaluación.

1.3.5. Selección de levaduras en bebidas alcohólicas fermentadas

Investigaciones recientes basadas en estudios metagenómicos indican que, en la industria, solo se utiliza una pequeña porción de la diversidad natural de levaduras. Esto sugiere que existen cepas con características que podrían mejorar la eficiencia de las fermentaciones industriales. La amplia diversidad de levaduras disponibles en la naturaleza ofrece un gran potencial para identificar cepas con propiedades superiores que optimicen los procesos de fermentación industrial (Parapouli et al., 2020).

La selección de levaduras se basa en el estudio de la diversidad y abundancia de estos microorganismos en un determinado ambiente con el objetivo de elegir la levadura más eficiente para elaborar el vino con las características deseadas y producirla en suficiente cantidad para su uso industrial. Para ello, es necesario establecer un criterio de selección que incluyan pruebas para determinar las características tecnológicas y fermentativas relevantes de las levaduras (Suárez- Lepe, 2007; Fleet, 2008). La selección de cepas autóctonas se lleva a cabo analizando un gran número de cultivos puros aislados de fermentaciones espontáneas de mostos de la región vitivinícola correspondiente. Aquellas cepas que, una vez aisladas y usadas como inóculo en fermentación presenten las mejores características enológicas, podrán ser seleccionadas (Suárez-Lepe, 2007).

Los criterios para seleccionar la levadura más adecuada dependen en gran medida de las características deseadas para el vino producido, así como las problemáticas a las que se enfrenta la bodega en particular. Sin embargo, podemos mencionar algunas características que generalmente son consideradas favorables para una levadura seleccionada, como una adecuada cinética de fermentación (Tristezza et

al., 2012), escasa producción de espuma, rápida formación de sedimento para la obtención de vinos límpidos e inexistencia de la formación de película/anillo y un uso eficiente de fuentes de nitrógeno (Varela et al., 2004). Además, resulta imprescindible que presenten capacidad para tolerar el etanol y el SO₂, con el fin de garantizar la finalización del proceso fermentativo (Garofalo et al., 2018). Otras propiedades adicionales que pueden evaluarse son el fenotipo killer (Vaudano et al., 2019), presencia de actividad de la enzima β-glucosidasa que permite la liberación de compuestos volátiles (Strauss et al., 2001) y la ausencia de sabores u olores desagradables que puedan afectar de forma negativa la percepción del vino (Comitini et al., 2011).

1.3.5.1. Aislamiento de levaduras:

La disminución de la densidad durante la fermentación de los mostos es un indicador directo del aumento en el contenido de alcohol. Se puede considerar que cuando la concentración de etanol supera el 7% v/v, la diversidad de levaduras está constituida principalmente por *S. cerevisiae*. La selección ecológica en este punto de la fermentación permite aislar cepas de *S. cerevisiae* altamente adaptadas a las condiciones finales de la fermentación. Esta estrategia asegura una exitosa implantación de la cepa seleccionada en procesos de vinificación dirigidos (Querol et al., 2018).

La técnica más habitual para aislar levaduras a partir de un medio en fermentación es la dilución y siembra en medios ricos como el YPD (del inglés Yeast extract, Peptone, Dextrose) o el medio MEA (Malt Extract Agar). Estos medios nos permiten conocer la diversidad y abundancia de levaduras en una muestra (Kurtzman et al., 2011). También se utiliza el agar nutritivo Wallerstein Laboratory (WL) que permite la identificación presuntiva de algunos géneros y especies de levaduras, según la morfología y el color de la colonia (Chen et al., 2022).

1.3.5.2. Identificación de especies

La elección del método de identificación va a depender de los equipos y tecnologías disponibles; del coste; así como de la sensibilidad y especificidad requeridas (Kurtzman et al., 2011). En los últimos años las técnicas moleculares basadas en el estudio de ADN y proteínas se han impuesto a las técnicas clásicas, basadas en las características fenotípicas, principalmente debido a la rapidez y a la reducción de costes de los métodos moleculares (Pérez et al., 2023) y la confiabilidad de los mismos.

La identificación de microorganismos fermentativos es importante tanto a nivel de especie como de cepa, ya que conocer la diversidad, nos permitirá, por un lado, determinar perfiles genéticos y/o fenotípicos, que serán los empleados en las fases de selección; y, por otro lado, una vez seleccionadas las cepas, verificar si la levadura inoculada se ha implantado en la fermentación (Legras y Karst, 2003). Los métodos de identificación se pueden clasificar en:

a) Métodos independientes de cultivo

Consisten en analizar los microorganismos directamente de la muestra mediante técnicas moleculares sin cultivo previo y nos permite identificar rápidamente todos los microorganismos presentes en una muestra, así como aquellos en un estado viable no cultivables (Pérez et al., 2023). Sin embargo, al no tener los microorganismos aislados no es posible realizar una posterior selección de las mejores cepas, por lo que su principal utilidad se basa en estudios ecológicos o de detección de contaminantes.

b) Métodos dependientes de cultivo

Son aquellos métodos que implican aislar los microorganismos en medios de cultivo, por lo que son más lentos, no obstante, nos permiten conservar las cepas en cultivo puro para posteriormente seleccionar las mejores. Las técnicas de identificación basadas en el cultivo pueden ser morfológicas, bioquímicas y moleculares.

Una vez identificadas las distintas cepas de levadura *S. cerevisiae* se hace necesario el análisis de sus propiedades fermentativas, así como del resto de características de interés enológico (Suárez-Lepe, 2007).

1.3.5.3. Caracterización tecnológica

1.3.5.3.1. Poder de fermentación

Se entiende por poder de fermentación o poder alcoholígeno la capacidad que tienen las levaduras para producir el máximo porcentaje de etanol al fermentar un mosto estéril con contenido de azúcares, igual o superior a 212 g/L de azúcar (12° Bè) (Ribéreau-Gayon et al., 2006). La proporción de alcohol del vino está relacionado directamente con el estado de madurez de la uva; los porcentajes altos se alcanzan sólo en ciertos años favorables y en determinadas condiciones de cultivo, sin embargo, también juegan un papel clave las levaduras responsables de la fermentación del mosto, ya que presentan diferentes eficiencias en la conversión de azúcares en etanol. Por ello,

generalmente se prefieren aquellas cepas con mayor poder de fermentación (Abad Arranz, 2006). Este criterio puede variar según la tendencia a consumir vinos jóvenes afrutados, con menor graduación alcohólica. De cualquier forma, se considera que un valor de 12,5% v/v de etanol es un valor óptimo para un vino de mesa (CAA, Art. 1098, 2024).

1.3.5.3.1.1. Poder de fermentación con el agregado de una fuente de nitrógeno

En el estudio de cepas de levadura para la producción de vino, es fundamental el análisis de la demanda de nitrógeno, como parte del control de su metabolismo fermentativo. Analizar este parámetro nos permite conocer la exigencia nutricional de cada cepa de levadura, lo que ayuda a predecir si será necesario añadir nutrientes adicionales o no durante la fermentación. Un bajo nivel de Nitrógeno Fácilmente Asimilable (NFA) residual al final de la fermentación es deseable, ya que indica una eficiente conversión de los azúcares en etanol. Por el contrario, un alto nivel de NFA puede ser consecuencia de una limitación de nitrógeno durante la fase inicial de la fermentación, lo que puede llevar a una fermentación lenta o incompleta, o bien a una excesiva lisis celular al final del proceso.

Una excesiva demanda de recursos nitrogenados puede llegar a ser un inconveniente en fermentaciones con mostos pobres en nutrientes obligando al suministro de elevadas cantidades de complementos nutricionales. Por ello, en los procesos de selección se destacan aquellas cepas cuyos consumos de nitrógeno en fermentación son moderados (Belda et al., 2014).

1.3.5.3.2. Dinámica de fermentación

La dinámica de fermentación está directamente ligada al ciclo de crecimiento microbiano; ésta puede monitorearse de diferentes maneras, entre ellas, cuantificando la cantidad de azúcares reductores consumidos, determinando la concentración de alcohol producido o valorando los gramos de gas carbónico liberado. Conocer previamente el comportamiento de la cepa durante la fermentación alcohólica permite minimizar riesgos, en particular el de paralización de la fermentación (Ribéreau-Gayon, 2003).

La correcta dinámica fermentativa asegura un inicio de la fermentación con mínima fase de latencia, disminuye las posibilidades de ataques bacterianos u oxidaciones, garantiza la ausencia de problemas de acabado asegurando que la cepa pueda terminar correctamente la fermentación sin que en el vino permanezcan restos

de azúcares (Abad Arranz, 2006). Sin embargo, si es muy rápida ocasiona problemas para controlar la fermentación, con aumentos de temperaturas y en consecuencia se pueden perder propiedades aromáticas.

1.3.5.3.3. Tolerancia a compuestos inhibidores

Con respecto a la tolerancia al etanol, también llamada resistencia al estrés fermentativo, se sabe que existe un gran número de sustancias como los antisépticos químicos y antibióticos antifúngicos, que limitan la multiplicación de las levaduras (Ribéreau- Gayon, 2006). El etanol producido durante la fermentación disminuye la asimilación nitrogenada y paraliza el metabolismo de las levaduras modificando los sistemas de transporte activo a través de la membrana celular (Jiranek et al., 1995). El principal cambio producido por el etanol en la composición lipídica de las células es un aumento tanto de la proporción de ácidos grasos insaturados como de la longitud media de cadena, conduciendo a una mayor fluidez de membrana (Torija Martínez, 2002) pero la cantidad de alcohol que bloquea la fermentación depende de numerosos factores como son: la cepa de levadura, la temperatura y/o la aireación. Una parada fermentativa supondría la presencia de azúcares residuales en el vino y por tanto los efectos negativos que esto conlleva. De aquí la importancia de evaluar la tolerancia al etanol de cada cepa.

La actividad de la levadura puede proseguir según aumente la concentración de etanol, o al menos, mientras la actividad inhibitoria del mismo no resulte excesiva. Generalmente, el primer efecto inhibitor (a partir de 12% v/v) es la imposibilidad de crecimiento y/o gemación, así como la reducción de la viabilidad, mientras que la capacidad para seguir fermentando resiste niveles mayores de este compuesto hasta 15 % v/v (Abad Arranz, 2006). La elección de una cepa con alta tolerancia al etanol será de especial importancia cuando se prevea vinificar mostos con alta concentración de azúcar.

Por otro lado, la tolerancia a SO₂ es también un criterio importante de selección. Este químico es considerado una herramienta esencial para los enólogos, debido a su bajo costo y sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas frente a un amplio espectro de microorganismos (Roullier-Gallet et al., 2017). Por lo tanto, es de gran utilidad durante la fermentación, como en el almacenamiento del vino para evitar su deterioro. Sin embargo, a pesar de las ventajas, dosis altas de SO₂ son tóxicas para las células de levaduras (Aubert, et al., 2012; Guerrero y Cantos-Villar, 2015), lo cual puede provocar fermentaciones detenidas.

Adicionalmente, es importante considerar que la ingesta excesiva de alimentos que contienen SO₂, también puede causar problemas de salud al consumidor, ya que es responsable de reacciones adversas, que incluyen broncoespasmo, bradicardia, síntomas gastrointestinales, dolores de cabeza, así como erupciones cutáneas, hipotensión y, con menos frecuencia, reacciones anafilácticas (World Health Organization, 2022). En este contexto, en la actualidad existe una creciente preocupación de las personas por comer y beber alimentos más saludables con menos conservantes químicos y respetuosos con el medio ambiente (Peres et al., 2018; Abraham et al., 2022), es por esto, que la Organización Mundial de la Salud (OMS) fomenta métodos alternativos para reducir, o incluso eliminar, el uso del SO₂ en la producción de alimentos.

En cuanto a la acción selectiva del SO₂ sobre la microbiota presente en los mostos, las bacterias y mohos son más sensibles que las levaduras, siendo las levaduras de tipo apiculadas, dentro del grupo No-*Saccharomyces*, más sensibles que las del género *Saccharomyces*. Dicha resistencia varía con el género, la especie y la cepa (Rainieri et al., 2000).

1.3.5.3.4. Producción de enzimas

La producción de enzimas con actividad enzimática específica está relacionada con la mejora tecnológica, al incrementar los rendimientos de mosto o la producción de aromas de interés. Las enzimas más estudiadas son las proteasas, pectinasas o poligalacturonasas y las glucosidasas.

El enólogo debe conocer no solo el comportamiento fermentativo de las levaduras que utiliza, sino también su incidencia sobre la tipicidad de los diferentes vinos que elabora. La composición de la uva en precursores de aromas es el origen de la riqueza aromática del vino. El rol de la levadura es transformar ese aroma potencial de la uva en aroma libre. Una adecuada cepa de levadura es la que permite expresar la fineza y la complejidad del carácter aromático de la uva (Suranska et al., 2016).

La β-glucosidasa es una enzima que actúa sobre los precursores aromáticos del vino, ya que hidroliza los glucósidos y libera compuestos aromáticos como terpenos y fenólicos. Los terpenos pueden encontrarse en la uva en forma aromática libre, pero están en cantidades inferiores a los terpenos combinados no aromáticos, los cuales generalmente se encuentran en forma de glicósidos con la glucosa, arabinosa, ramnosa y apiosa. La parte aglicona de estos compuestos, son principalmente el linalol, el nerol

y el geraniol. También esta enzima desempeña un papel fundamental en la formación de ésteres y aldehídos que contribuyen al aroma, intensidad, complejidad y sabor del vino (Suranska et al., 2016). Por ello, las levaduras que expresan actividad β -glucosidasa son preferibles a las cepas que no logran expresarla (Hernández et al., 2003; Suarez Lepe, 2004; Mas et al., 2006).

Es una propiedad atípica en cepas de *S. cerevisiae*, ya que esta enzima se reprime por la presencia de glucosa y valores bajos de pH, los valores de pH del mosto de uva y el vino oscilan entre 2,8 y 3,5; la actividad enzimática disminuye aproximadamente un 33% en el rango mencionado anteriormente (Suranska et al., 2016). En consecuencia, se espera que esta actividad disminuya durante la vinificación (Hernández, 2003).

1.3.5.3.5. Producción de metabolitos indeseados

Algunos compuestos como el ácido acético, el diacetilo o los fenoles volátiles son considerados negativos y dependen directamente del metabolismo de determinadas especies de levadura,

El ácido acético es el principal ácido volátil del vino y normalmente es sintetizado por la levadura durante la fermentación alcohólica. También se produce durante las alteraciones microbianas. Por encima de determinada concentración, que es variable según los vinos, la incidencia organoléptica de dicho compuesto en la calidad de los mismos es negativa y por lo tanto no deseada (Morata et al., 2005; Abad Arranz, 2006; Mas et al., 2006). La producción excesiva de este compuesto podría tener consecuencias en la comercialización, ya que es un componente de acidez volátil que tiene límites legales de 1,5 g /L expresados en ácido acético (INV, Resol 46/2024). De allí la necesidad de incluirlo dentro de los criterios de selección.

También es importante considerar el ácido sulfhídrico y los compuestos azufrados ya que son causantes de defectos en el aroma. Estos compuestos presentan un umbral de percepción bajo, con olor a huevo podrido, cebolla podrida, plásticos, neumáticos. La formación de compuestos sulfurados a cargo de levaduras está bajo el control de las enzimas implicadas en la reducción de sulfatos y la biosíntesis de aminoácidos azufrados, especialmente metionina, aunque pueden existir otros precursores como sulfitos, polipéptidos azufrados (Ribereau- Gayon, 2003; Suarez Lepe, 2004). En consecuencia, no es recomendable la selección de cepas que presenten elevada producción de estos compuestos (Esteve-Zarzoso, 2000; Mas et al., 2006; Swiegers et al., 2005).

2. Formulación y Fundamentación

En las bodegas de la Quebrada de Humahuaca, al igual que en muchas regiones vitivinícolas, es común que los productores empleen levaduras comerciales durante el proceso de elaboración de vinos, una práctica destinada a asegurar una fermentación homogénea y una calidad constante. Sin embargo, en los últimos años, el uso masivo de levaduras comerciales plantea desafíos significativos en términos de sostenibilidad y tipicidad regional, según se señala en diversos estudios (Capece et al., 2012; Parapouli et al., 2019; Molinet y Cubillos, 2020; Li et al., 2021; Chen et al., 2023).

Es por esto, que la selección de levaduras autóctonas para la producción vitivinícola de la Quebrada de Humahuaca, Jujuy, permite vincular esta producción a valores culturales, sociales, ambientales y económicos, y a objetivos de desarrollo sostenible que se complementan mutuamente, estableciendo un enfoque integral (Abraham et al., 2022).

En este contexto, la provincia de Jujuy, particularmente la Quebrada de Humahuaca, declarada Patrimonio de la Humanidad Cultural y Natural por la UNESCO, se destaca como un entorno excepcional para la vitivinicultura, debido a una combinación única de factores. Su potencial climático, luminosidad y radiación, pureza del aire, altitud, condiciones edafológicas, calidad de las uvas y prácticas culturales (Buitrago, 2000), convergen para crear un escenario propicio para la producción de vinos con levaduras autóctonas, de calidad y con un *terroir* distintivo.

Es importante destacar que esta iniciativa respeta la biodiversidad microbiana local (Bokulich et al., 2014; Mas et al., 2016; Portillo et al., 2016; Belda et al., 2017). Por otro lado, la búsqueda de una menor huella de carbono es un objetivo que no puede pasarse por alto. Alentar el equilibrio de los ecosistemas microbianos locales y reducir el uso de insumos importados en la producción vinícola no solo reduce los costos, sino que también tiene un impacto positivo en el medio ambiente (Mas et al., 2016; Abraham et al., 2022).

Se considera que las levaduras autóctonas seleccionadas en la misma zona de producción podrían poseer las características para ajustarse a las condiciones geobotánico-climatológicas de la misma y la composición del vino (Garofalo et al., 2016; Molinet y Cubillos, 2020; Papadopoulou et al., 2023), y de esta manera influir en gran medida en los perfiles finales del aroma del vino (Bokulich et al., 2016; Pacheco et al., 2021; Chen et al., 2023). Estas levaduras podrían generar un carácter regional único

que permitirá a los viticultores adaptar los vinos locales a un mercado tan exigente como el actual.

Además, la conexión con la comunidad y el consumidor se convierte en un valor agregado. Con la selección de levaduras autóctonas, se fortalece la identidad regional, lo que crea un sentido de pertenencia y una conexión emocional con el lugar y las personas que cultivan y elaboran el vino. Este aspecto es crucial, ya que fomenta el enoturismo y el apoyo a los productores locales, impulsando así la economía de la región (Mas et al., 2016; Suranská et al., 2016; Capozzi et al., 2019; Papadopoulou et al., 2023).

En el ámbito del mercado, la diferenciación del vino elaborado, adquiere una relevancia crucial. La utilización de levaduras autóctonas ofrece una ventaja distintiva en un mercado cada vez más competitivo. En consecuencia, esta diferenciación atrae a consumidores que buscan vinos auténticos y únicos, lo que conduce al desarrollo de mercados distintivos (Capece et al., 2012; Li et al., 2021).

Así mismo es importante que la Universidad integre las áreas de investigación y extensión, desarrollando, adaptando y transfiriendo biotecnologías acordes a la demanda actual, concientizando a los bodegueros para producir en un marco de sustentabilidad. En este aspecto, es imperativo desarrollar protocolos de selección y caracterización enológica de levaduras autóctonas de los ecosistemas locales, adecuados al lugar donde se van a implementar, que aseguren una rápida y eficaz implantación de las levaduras autóctonas en bodegas de la Quebrada de Humahuaca, a partir de una comunicación transparente entre el investigador y el productor, así como, con el consumidor.

Por esta razón, y a medida que aumenta el interés por la producción de alimentos y bebidas locales y sostenibles, la selección de levaduras autóctonas podría representar un enfoque equilibrado, entre lo innovador y lo auténtico para la vitivinicultura de nuestra región. La industria vitivinícola se convierte así, en un ejemplo inspirador de cómo la producción y el consumo pueden coexistir en armonía con la tierra, la comunidad y el bienestar de todos.

En este contexto, el presente trabajo se propone aislar, seleccionar, caracterizar e identificar levaduras autóctonas *Saccharomyces* con potencial enológico, aisladas a partir de fermentaciones espontáneas de uva Malbec de viñedos de altura,

pertenecientes a productores de la Quebrada de Humahuaca, mediante un enfoque interdisciplinario que abarca la enología, la microbiología, la agricultura y la cultura local.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

- Seleccionar y caracterizar levaduras autóctonas del género *Saccharomyces* con potencial enológico de viñedos de altura de la Quebrada de Humahuaca.

3.2. Objetivos Específicos

- Aislar levaduras autóctonas presentes en fermentaciones espontáneas realizadas con uvas de la variedad Malbec.
- Evaluar el rendimiento en el proceso fermentativo (características tecnológicas) y la influencia sobre las características sensoriales (características cualitativas) de cada una de las levaduras autóctonas aisladas.
- Identificar a nivel de especie y tipificar a nivel intraespecífico las levaduras autóctonas *Saccharomyces* aisladas.
- Conservar los recursos microbiológicos propios de la región mediante la conformación de un cepario de levaduras caracterizadas depositado en el Laboratorio de Microbiología Enológica de la Universidad Nacional de Jujuy.

4. HIPÓTESIS DE TRABAJO

4.1 Hipótesis General

Las fermentaciones espontáneas de uvas de viñedos de altura de la Quebrada de Humahuaca, albergan levaduras *Saccharomyces* autóctonas que poseen características enológicas deseables y propias de la región.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Toma de muestras

Las muestras se recolectaron de viñedos pertenecientes a 14 productores de Tumbaya (1 bodega de Tumbaya Grande, 2 de Purmamarca), Tilcara (2 bodegas de Tilcara centro, 4 de Maimara, 3 de El Perchel y 1 de Yacoraité) y Una bodega de Humahuaca (Figura 2.1), de la Quebrada de Humahuaca, provincia de Jujuy, durante la vendimia de marzo y abril de 2024.



Figura 2.1. Georreferenciación de los viñedos muestreados.

De los 14 viñedos muestreados, 7 de ellos, responden a un sistema empresarial con superficies cultivadas que llegan a las 12 hectáreas, con innovación en tecnología y equipo de asesores técnicos especializados. Los otros, responden a un sistema de producción diversificado, complementaria a la producción principal hortícola – ganadera, de familias campesinas, indígenas y agricultores familiares con superficies que no superan las 2 ha de producción vitivinícola, con manejo sustentable y producción de vinos artesanales con identidad cultural, los cuales son asistidos por instituciones estatales y trabajo asociativos entre productores. Los viñedos muestreados tienen un sistema de conducción en espaldero. En cuanto al riego varía entre sistemas de riego por goteo en las bodegas más grandes, y superficial por surco en las otras, abastecidos tanto por el Río grande y por agua subterránea mediante pozos y reservorios de agua (Vallone et al., 2024).

Se muestrearon entre 1 a 3 kg de racimos de uva de la variedad Malbec (de acuerdo a la disponibilidad de cada productor), sanos y tomados al azar (Figura 2.2), los cuales se transportaron a temperaturas de refrigeración al laboratorio de la Facultad de Ciencias Agrarias-UNJu para ser analizados.



Figura 2.2. Toma de muestra en viñedos de la Quebrada de Humahuaca, vendimia 2024.

2. Procesamiento y Aislamiento de las levaduras

Las muestras recolectadas se trituraron en condiciones asépticas en las mismas bolsas plásticas de muestreo estéril en que se colocaron inicialmente. El mosto obtenido se transfirió a recipientes estériles de 5 L y se permitió el desarrollo de las fermentaciones espontáneas a 25 °C (Figura 2.3). El proceso de fermentación se siguió de forma diaria mediante la medición de los grados Brix, La medición de grados Brix o contenido de sólidos solubles, está basada en el índice de refracción, dando una información cercana al contenido de azúcares del mosto que constituyen el principal soluto presente, aunque existen otras sustancias en el mosto, estas apenas afectan este índice (Regodón Mateos, 2004). Esta medición es ampliamente usada como una metodología sencilla de monitoreo de fermentaciones vínicas y con equipamiento accesible y disponible (Walker et al., 2021; Corona et al., 2021). Para su evaluación se utilizó un refractómetro de mano con ATC, marca Numak, modelo ZGRB-32ATC. Se consideró que el proceso de fermentación había finalizado cuando se alcanzaron valores constantes de grados Brix.



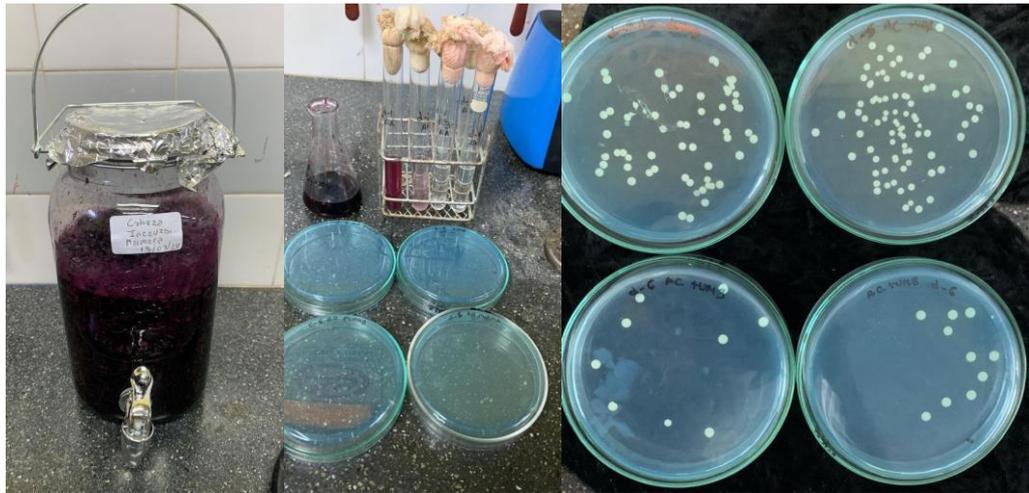
Figura 2.3. Procedimiento para el aislamiento de las levaduras autóctonas en la etapa final de la fermentación espontánea.

3. Identificación presuntiva de levaduras *Saccharomyces*

3.1 Siembra y aislamiento

Para el aislamiento de las levaduras, se tomaron alícuotas de 1 mL de forma aséptica al final de la fermentación alcohólica. Se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-6} con agua peptonada estéril al 0,1% (m/v). A partir de cada dilución, 0,1 mL de las muestras se sembraron en Agar Nutritivo Wallerstein Laboratory (WL) (Oxoid Co.) y se incubaron de 2-3 días a 28°C (Pallmann et al. 2001; Chen et al., 2022) (Figuras 2.4 a, b y c). El agar nutritivo WL permite la identificación presuntiva de las especies de las levaduras, según la morfología y el color de la colonia. Se aislaron colonias del género *Saccharomyces*, es decir, que respondían a la descripción de colonias blancas, mantecosas, lisas, circulares y muy prominentes.

Luego se procedió a purificar los cultivos a partir de las colonias crecidas en medio WL, repicando en medio YPD (extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2%, agar 2%). A cada levadura pura se le asignó una codificación con el prefijo (AM) y un número.



a) Etapa final de la Fermentación espontánea

b) Siembra en Agar Nutritivo WL

c) Crecimiento de colonias de levaduras y recuento

Figura 2.4. a, b y c. Materiales utilizados en el procedimiento para el aislamiento de las levaduras autóctonas en Agar WL.

La conservación a largo plazo de los aislados se realizó en microtubos eppendorf con glicerol al 30% (v/v) mantenidos a -80°C . Para la conservación a corto plazo y para uso inmediato, los aislados se mantuvieron en tubo de ensayo (pico de flauta) con medio de cultivo YPD (extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2%, agar 2%) a 4°C (Figura 2.5).



Figura 2.5. Preparación de cultivos para su conservación en glicerol al 30% de glicerol.

3.2. Caracterización morfológica

3.2.1. Características morfológicas macroscópicas (Barnett et al., 2000): Se evaluó la forma de la colonia, bordes, altura, tamaño y textura (Figuras 2.6).

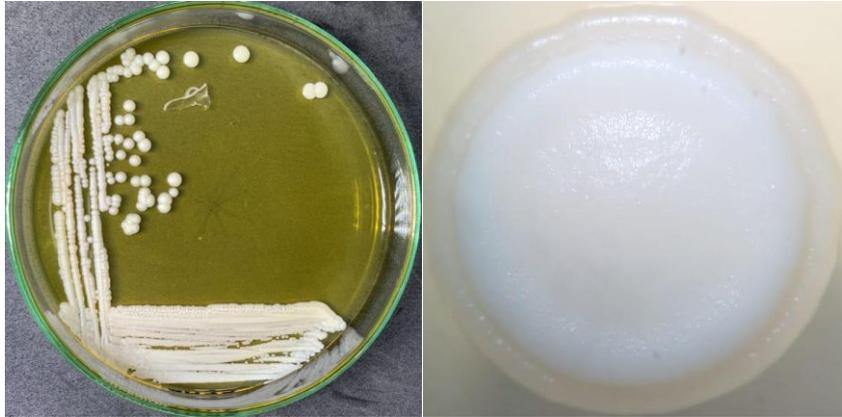


Figura 2.6. Observación macroscópica de colonias de levaduras (izquierda), observación macroscópica de una colonia en lupa al 2X (derecha), en placas de medio agar YPD.

3.2.2. Características morfológicas microscópicas (Barnett et al., 2000): Se evaluó la forma de la célula y tipo de gemación (Figura 2.7) mediante la observación de preparados en fresco, obtenidos a partir de los cultivos previamente evaluados en 3.2.1. Para ello se utilizó microscopio óptico Binocular Daza Xsp44sm.

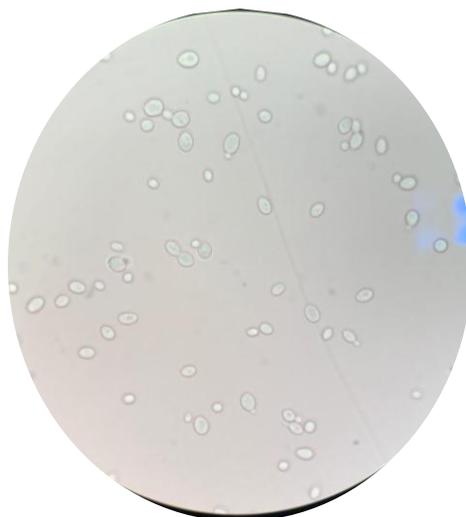


Figura 2.7. Observación microscópica en fresco de células de levaduras con el lente objetivo 100X.

3.3. Diferenciación de los aislados entre *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* en agar lisina:

Esta estrategia permite la diferenciación entre levaduras del género *Saccharomyces* (las cuales no crecen en este medio) de las no-*Saccharomyces* (donde la mayoría de los géneros si crece) (Fleet, 2011). Para ello, las levaduras se sembraron en tres medios diferentes:

- Medio basal (Yeast Carbon Base –YCB): glucosa, 20 g; fosfato de potasio, 1 g; sulfato de magnesio heptahidratado 0,5 g; agar, 20 g; agua destilada, 1000 mL. Se disuelve y fracciona en tubos con 25 mL. Se esteriliza 15 min. a 121° C. Se enfría el medio a 45°C y se agrega la solución madre de la fuente de nitrógeno (L- lisina, 0,56 g/L) y plaquear.
- Se utiliza un control negativo: medio basal sin el agregado de ninguna fuente de nitrógeno, con el objeto de observar un crecimiento menor de la cepa.
- Control positivo: medio basal con sulfato de amonio 5 g/L; con el objeto de observar los resultados positivos debido a que todas las levaduras utilizan el amonio.

Se incubaron las 3 placas durante 48 h a 28°C (Figura 2.8).



Figura 2.8. Siembras para evaluación de uso de lisina como fuente de nitrógeno: Control positivo, agar lisina y control negativo, de izquierda a derecha.

4. Tipificación molecular de *S. cerevisiae*

La extracción total de ADN de las levaduras autóctonas aisladas se realizó de acuerdo con el protocolo de Hoffman y Winston (1987) (Figura 2.9), mientras que la tipificación molecular de las cepas de *S. cerevisiae* se llevó a cabo mediante PCR-Interdelta optimizada (Legras y Karst, 2003). Los elementos delta son secuencias largas de repetición (LTRs por su nombre en inglés *Long Terminal Repeats*) de 0,3 kb que están repetidas de forma aislada o como parte integrante de los retrotransposones Ty1 al menos 100 veces en el genoma de *S. cerevisiae* (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Esta técnica utiliza un par de *primers* que hibridan dentro de los elementos delta (δ_{12} , 5' TCA ACA ATG GAA TCC CAA C 3' y δ_{21} , 5' CAT CTT AAC GTA TAT GA 3'), y dado que cada cepa de *S. cerevisiae* posee distinto número y distribución de estas secuencias en su genoma, la amplificación del ADN entre dos elementos delta puede variar de una cepa a otra, tanto en número como en longitud de los fragmentos amplificados, generando patrones moleculares con diferente número y peso de bandas (Fernández-Espinar et al., 2006; Ribéreau-Gayon et al., 2006; Legras y Karst, 2003). Además, La generación de patrones PCR-Interdelta para cada aislado, se consideró evidencia confirmatoria para la asignación del mismo a la especie *S. cerevisiae* de acuerdo con el criterio de Legras y Karst (2003), quienes indicaron que el método es especie específico y otras especies del género *Saccharomyces* no amplifican a pesar de que presentan secuencias homólogas a los retrotrasposones Ty de *S. cerevisiae*.

Las reacciones de amplificación se hicieron en un termociclador con tapa caliente Eppendorf AG 22331 (Hamburgo, Alemania) y las condiciones de los ciclos se detallan a continuación en la Tabla 2.1. El programa completo de PCR-Interdelta tiene una duración aproximada de 2 horas. Una vez finalizado, los tubos con los productos de la PCR pueden conservarse por 24 horas a 4°C o bien, a – 20°C por varios meses.

Tabla 2.1. Programa de PCR-Interdelta utilizado.

PASO		TEMPERATURA (°C)	TIEMPO
1	Desnaturalización inicial	95	4 minutos
2a	Desnaturalización	95	30 segundos
3a	Annealing	46	30 segundos
4a	Extensión	72	90 segundos
5	Extensión final	72	10 minutos

^a Los pasos 2, 3 y 4 se repiten 35 CICLOS.

Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,2% (p/v) sometidos a 90 V durante 70 min en buffer TBE 1X, usando el marcador de peso molecular 100 bp (Invitrogen; Vilnius, Lituania).

Finalmente, los geles se tiñeron con bromuro de etidio ($0,5 \mu\text{g. mL}^{-1}$) y se registraron con un fotodocumentador (Bio-Rad Universal Hood II S.N 76S / 03696).

Los patrones de bandas de cada aislado se compararon entre sí para definir diferentes perfiles de amplificación Interdelta que fueron considerados como cepas distintas.

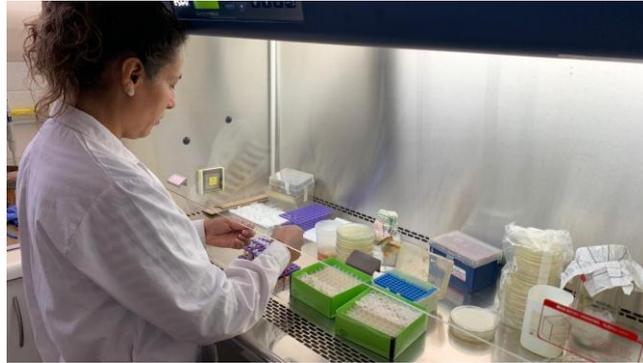


Figura 2.9. Ejemplo de trabajo de procesamiento para tipificación molecular de *S. cerevisiae*.

5. Caracterización enológica de las levaduras autóctonas aisladas

5.1. Preparación de inóculos y medio de cultivo:

Para los diferentes ensayos se procedió a inocular las levaduras autóctonas en fase exponencial (cultivo de 24 h en caldo YPD) en una concentración de 1×10^6 células/mL. El recuento de las levaduras se realizó en cámara de Neubauer (Figura 2.10).

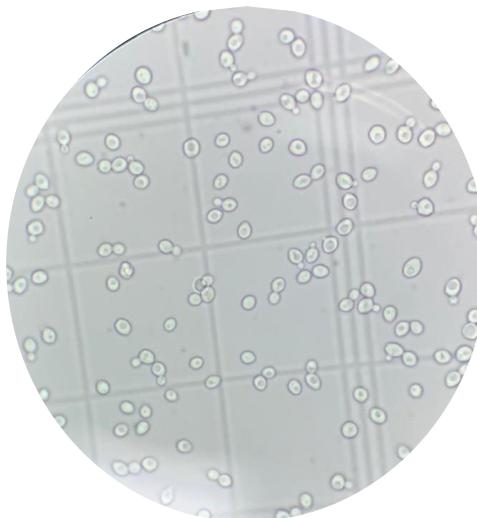


Figura 2.10. Recuento de levaduras en cámara de Neubauer.

5.1.1. Medio de cultivo: Cada determinación fue realizada por duplicado utilizando mosto de la variedad Malbec pasteurizado a 60 °C durante 15 minutos.

5.1.1.1 Al mosto de uva Malbec utilizado para realizar los ensayos se le realizaron los siguientes análisis fisicoquímicos (Figuras 2.11 a, b y c), mediante métodos oficiales (Nazrala et al., 2009):

- Grados Brix: Por Refractometría
- pH: Por potenciometría
- Acidez total: Por titulación ácido -base
- Densidad



a- Medición de pH de mosto

b- Análisis de acidez total de mosto

c- Medición de densidad en mosto

Figura 2.11. Analisis fisico químico de mosto.

5.2. Evaluación Inicial

Evaluación de la producción de ácido sulfídrico (SH_2)

Para una primera selección de las levaduras aisladas se las evaluó en su capacidad para producir ácido sulfhídrico (Nikolaou et al., 2004). Esta determinación resultó esencial para reducir el número de aislados y continuar con la caracterización enológica de aquellas que produjeran poco o nulo de este compuesto considerado un defecto en los vinos.

Se sembraron las levaduras en agar Biggy (Diffco Co.). Se incubaron en estufa a 28°C durante 48 h. Las colonias se desarrollan de color chocolate a beige, de intensidad proporcional a la producción del sulfuro. La intensidad de coloración en este

medio es una indicación de la máxima actividad de la enzima sulfito reductasa de una cepa dada determinada genéticamente. Los resultados se analizaron con criterio cualitativo en función de la coloración observada:

- ++++ chocolate/alta formación de SH₂
- +++ beige-marrón/media formación de SH₂
- ++ beige/baja formación de SH₂
- +/- beige claro/trazas de SH₂

5.3 Caracterización tecnológica de las levaduras autóctonas

Las levaduras que pasaron la primera prueba de producción de SH₂ fueron 45 aislados. A partir de ellos, posteriormente se preseleccionaron 19 cepas de levaduras representativas de cada viñedo muestreado (AM1, AM7, AM10, AM12, AM14, AM18, AM21, AM25, AM28, AM31, AM32, AM34, AM35, AM37, AM38, AM40, AM42, AM45 y AM46). Esta selección, aunque limitada a 19 cepas por restricciones de tiempo y recursos, garantiza un balance entre la representatividad y viabilidad experimental en el proyecto. Las levaduras fueron sometidas a las siguientes pruebas de caracterización enológica: Resistencia al etanol, poder de fermentación y demanda de Nitrógeno, cinética de fermentación, resistencia al anhídrido sulfuroso, actividad β-glucosidasa, formación de ácido acético a partir de glucosa.

5.3.1. Resistencia al etanol

Este ensayo se realizó a las 19 levaduras preseleccionadas en el ítem anterior. Cada levadura se sembró en una serie de tres tubos con diferentes concentraciones de mosto alcoholizado (12-13-14% v/v). Luego se sellaron con tapón vas-par (vaselina-parafina 50:50) y se incubaron en estufa a 28°C durante 7 días (Figura 2.12). La presencia de turbidez en el medio y el desplazamiento del tapón VasPar hacia arriba se consideró como indicador de que la levadura fue capaz de fermentar los azúcares del medio produciendo CO₂ y resistiendo la concentración de etanol presente en el medio (Abad Arranz, 2006). El inóculo y el mosto para el ensayo se preparó de acuerdo a lo descrito en los ítems 5.1 y 5.1.1.



Figura 2.12. Tolerancia al etanol, 12, 13 y 14 % v/v.

5.3.2. Evaluación del desempeño fermentativo

5.3.2.1. Evaluación del poder fermentativo en diferentes condiciones de nutrición

Se realizaron dos fermentaciones con 150 mL de mosto de uva Malbec a 25 °C, a una de ellas se le agregó 300 mg/L de sulfato de amonio para determinar la producción de etanol en esta condición, como una forma de evaluar de forma indirecta la demanda de nitrógeno fácilmente asimilable (Figura 2.13). El inóculo y el mosto para el ensayo se prepararon de acuerdo con lo descrito en los ítems 5.1 y 5.1.1. La fermentación fue monitoreada mediante pérdida de peso, la cual se registró diariamente y permitió construir las curvas de fermentación para cada levadura. El poder fermentativo estimado (%v/v en etanol) en ambas condiciones de nutrición evaluada se calculó utilizando (el peso inicial y el peso final de la fermentación y el valor 1,35), según la siguiente fórmula (Rodríguez Alonso, 2021): $PF (\%v/v \text{ en etanol}) = [P \text{ inicial (g)} - P \text{ final (g)}] * 1,35$.



Figura 2.13. Fermentaciones inoculadas con las levaduras autóctonas preseleccionadas a 25° C.

5.3.2.2 Dinámica de fermentación

La dinámica de fermentación se evaluó mediante la obtención para cada aislado de la curva de fermentación obtenida tomando los datos inversos de pérdida de peso, producidos por la liberación de $\text{CO}_2 = [\text{P final (g)} - \text{P inicial (g)}]$ referidos a 100 mL de mosto. Se calculó la velocidad fermentativa (pérdida acumulada de CO_2 (g) durante las primeras 48h) (Rodríguez Alonso, 2021).

5.3.2.3. Análisis físico-químico de las fermentaciones

A las fermentaciones elaboradas para determinar el poder y dinámica fermentativa se le realizaron los siguientes análisis físicos y químicos: azúcares reductores residuales, concentración de etanol, pH, acidez total y acidez volátil mediante espectrometría de infrarrojo con un equipo Wine FOSS.

Se tomaron como referencia los siguientes parámetros establecidos para vino según la OIV: pH: 3,3-3,5, acidez total 4,5-7 g de ácido tartárico/L, acidez volátil 0,2-0,6 g de ácido acético/L; Grado alcohólico $\geq 8,5$ % v/v y azúcares reductores: ≤ 4 g/L.

5.3.3. Resistencia al dióxido de azufre

Cada levadura se sembró en una serie de tres tubos con mosto estéril adicionado con diferentes concentraciones de dióxido de azufre (50-100-300 ppm). Los tubos se sellaron con tapón de vas-par para poner en evidencia el crecimiento y la producción de gas por parte de la levadura (Figura 2.14). Se consideró aumento de turbidez y producción de gas como crecimiento positivo (Mestre et al., 2017). El inóculo y el mosto para el ensayo se prepararon de acuerdo a lo descrito en los ítems 5.1 y 5.1.1.



Figura 2.14. Tolerancia al dióxido de azufre a 50, 100 y 300 ppm.

5.4. Otras características de impacto enológico de las levaduras autóctonas aisladas

5.4.1. Actividad β -glucosidasa

Se sembraron 5 μ L de las levaduras en el medio propuesto (Extracto de levadura 1%; peptona 2%, glucosa 2%; citrato de Hierro Amonio 0,02%; esculina 0,5%; agar 2%). La actividad β -glucosidasa se evidenció por la presencia de un halo negro que se forma alrededor de la colonia por la reacción entre la esculina hidrolizada, que se transforma en esculetina por la actividad enzimática de la β -glucosidasa, y la sal férrica soluble (Hernández et al., 2003).

5.4.2. Formación de ácido acético a partir de glucosa

Se sembraron 5 μ L de las levaduras en el medio de cultivo formulado para esta evaluación (Extracto de levadura 0,5%; glucosa 2%; carbonato de calcio 1%; agar 2,5%). La producción de ácido acético a partir de glucosa se evidenció por la formación de un halo transparente alrededor de la colonia (Figura 2.15 a y b), debido a la disolución del carbonato de calcio, por la producción de ácido (Kurtzman y Robnett, 1998), la cual se cuantifica de la siguiente manera:

++++ halo de disolución mayor a 3 mm /alta formación de ácido.

+++ halo de disolución entre 2-3 mm /baja formación de ácido.

++ halo de disolución mayor entre 1 y 2 mm /leve formación de ácido.

+ halo de disolución menor a 1 mm /trazas de ácido.

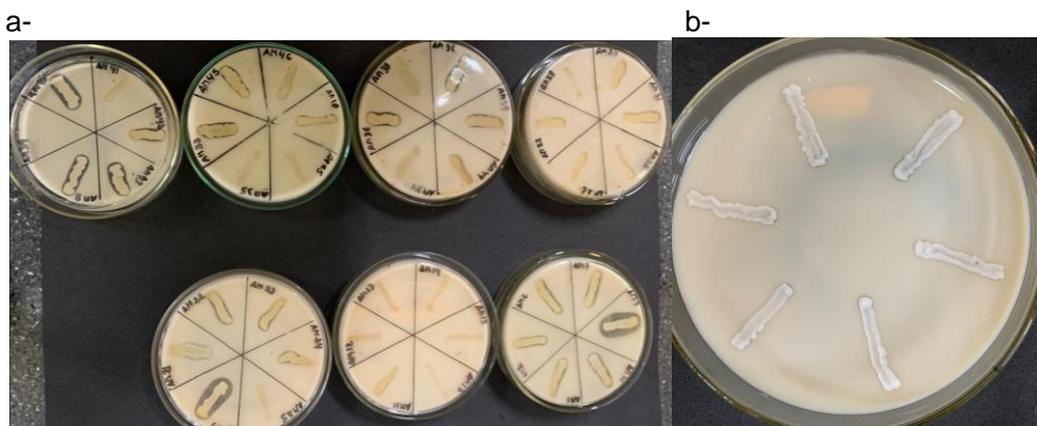


Figura 2.15. a y b Producción de ácido acético.

6. Análisis estadístico

Los patrones moleculares se procesaron utilizando el software PyElph 1.3, se cuantificaron los tamaños de las bandas en comparación con el marcador molecular utilizado y se obtuvo luego la correspondiente matriz de presencia-ausencia; posteriormente utilizando la plataforma FIGTREE 1.4.4 se obtuvo la matriz de similitud utilizando como coeficiente de similitud el índice de Dice y mediante UPGMA se generó un dendrograma.

Con el fin de agrupar las cepas según la semejanza de sus características tecnológicas, cualitativas y de diferenciación, para poder facilitar el análisis de los resultados se realizó un análisis de conglomerados con el Software InfoStat versión 2017 (Di Rienzo et al., 2017).

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Origen de los mostos y características físico-químicas

Se tomaron muestras de uvas de la variedad Malbec de 14 viñedos ubicados en Tumbaya, Tilcara y Humahuaca pertenecientes a la región de la Quebrada de Humahuaca, provincia de Jujuy. Los mostos obtenidos del estrujado de las muestras presentaron valores con un promedio de $21,8 \pm 1,75$ grados Brix; $6,1 \pm 0,9$ g/L de acidez total; $3,6 \pm 0,1$ de pH y $1,099 \pm 0,01$ g/mL de densidad (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Composición físico-química de mostos obtenidos y recuentos de levaduras viables (UFC/mL) durante la etapa final de la fermentación espontánea.

Fincas	Origen	Parametros fisico-quimico				Recuento en FE
		pH	acidez total (g/L)	densidad (g/mL)	grados Brix	UFC/mL
Finca A	Tilcara (Maimara)	$3,43 \pm 0,07$	$6,80 \pm 0,37$	$1,090 \pm 0,00$	$19 \pm 1,38$	$7,9 \cdot 10^7$
Finca B	Tumbaya (Purmamarca)	$3,60 \pm 0,02$	$7,60 \pm 0,77$	$1,092 \pm 0,00$	$22 \pm 0,13$	$8,7 \cdot 10^7$
Finca C	Tumbaya (Tumbaya Grande)	$3,50 \pm 0,03$	$7,50 \pm 0,72$	$1,090 \pm 0,00$	$21,5 \pm 0,13$	$7,7 \cdot 10^7$
Finca D	Tilcara (El Perchel)	$3,62 \pm 0,03$	$6,10 \pm 0,02$	$1,140 \pm 0,02$	$24 \pm 1,13$	$1,6 \cdot 10^8$
Finca E	Tilcara (Maimara)	$3,75 \pm 0,09$	$5,30 \pm 0,38$	$1,096 \pm 0,00$	$22 \pm 0,13$	$8,0 \cdot 10^7$
Finca F	Tilcara (Yacoraite)	$3,47 \pm 0,05$	$5,10 \pm 0,48$	$1,100 \pm 0,00$	$23 \pm 0,63$	$1,6 \cdot 10^8$
Finca G	Tilcara	$3,54 \pm 0,01$	$5,90 \pm 0,08$	$1,098 \pm 0,00$	$23,5 \pm 0,88$	$4,0 \cdot 10^7$
Finca H	Tumbaya (Purmamarca)	$3,52 \pm 0,02$	$5,30 \pm 0,38$	$1,091 \pm 0,00$	$22 \pm 0,13$	$1,2 \cdot 10^8$
Finca I	Tilcara (Maimara)	$3,51 \pm 0,03$	$5,40 \pm 0,33$	$1,091 \pm 0,00$	$22 \pm 0,13$	$1,2 \cdot 10^8$
Finca J	Tilcara (Maimara)	$3,51 \pm 0,03$	$5,50 \pm 0,28$	$1,097 \pm 0,00$	$23 \pm 0,63$	$2,8 \cdot 10^8$
Finca K	Tilcara	$3,53 \pm 0,02$	$5,25 \pm 0,41$	$1,130 \pm 0,02$	$24 \pm 1,13$	$6,0 \cdot 10^7$
Finca L	Tilcara (El Perchel)	$3,60 \pm 0,02$	$7,70 \pm 0,82$	$1,090 \pm 0,00$	$18 \pm 1,88$	$3,2 \cdot 10^7$
Finca M	Tilcara (El Perchel)	$3,73 \pm 0,08$	$5,30 \pm 0,38$	$1,090 \pm 0,00$	$20,5 \pm 0,63$	$8,0 \cdot 10^6$
Finca N	Humahuaca	$3,65 \pm 0,04$	$6,10 \pm 0,02$	$1,090 \pm 0,00$	$20 \pm 0,88$	-
Promedio		$3,6 \pm 0,1$	$6,1 \pm 0,9$	$1,099 \pm 0,01$	$21,8 \pm 1,75$	

FE: Fermentación espontánea. (-): no pudo determinarse. UFC: unidades formadoras de colonias.

2. Monitoreo de las fermentaciones espontáneas

Las fermentaciones espontáneas se controlaron diariamente midiendo los grados brix (Regodón Mateos, 2004; Walker et al., 2021) (Figura 3.1). Las fermentaciones se completaron a los 10 días.

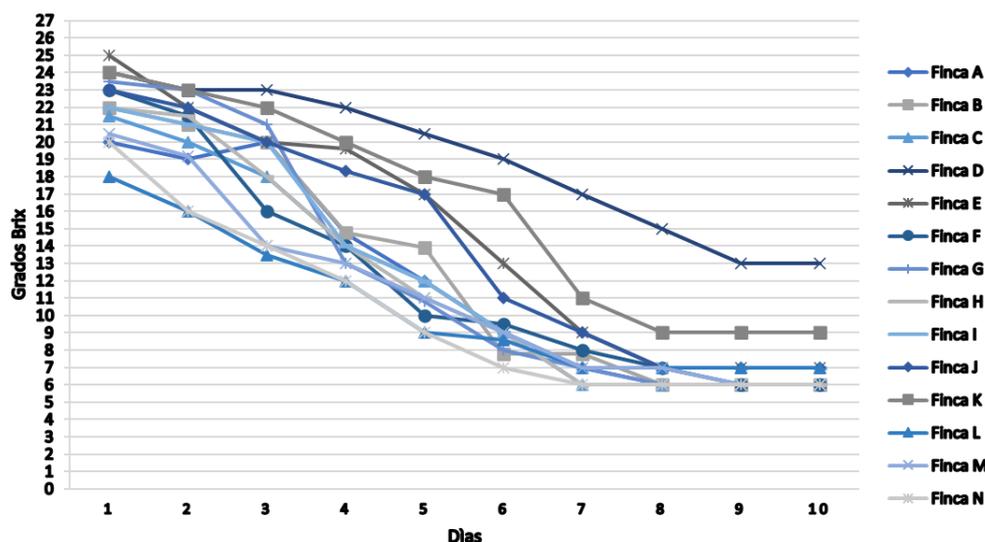


Figura 3.1. Evolución de las fermentaciones espontaneas expresadas en grados Brix

3. Identificación presuntiva de levaduras *Saccharomyces*

3.1. Recuento, caracterización morfológica y diferenciación de las levaduras autóctonas aisladas

En la etapa final de las fermentaciones espontáneas, comprendida entre los 9 y 10 días, se realizaron los recuentos y aislamientos de las levaduras. Los recuentos obtenidos en esta etapa estuvieron en un rango de 10^6 a 10^8 UFC/mL (Tabla 3.1). Se aislaron un total de 57 levaduras, las cuales presentaron características culturales morfológicas típicas del género *Saccharomyces*, como colonias blancas, mantecosas, lisas, circulares, convexas, además de células ovoides con gemación multipolar (Kurtzman et al., 1998; Barnett et al., 2000) (Ver Anexo II). Coincidentemente a esta asignación presuntiva de género, las levaduras estudiadas no crecieron en agar lisina (Ribéreau-Gayon, 2003; Santamaría, 2007).

Los recuentos obtenidos en las etapas finales de las fermentaciones concuerdan con los hallados por otros autores que estudiaron fermentaciones espontaneas (Capece et al., 2010; Garofalo et al., 2018; Rodríguez Alonso, 2021; Chen et al., 2022; Berbegal et al., 2023). De acuerdo a lo reportado por Durcanská et al (2019) las levaduras del género *Sacharomyces* son aisladas con más frecuencia en la etapa final de la fermentación espontánea. En su trabajo aislaron 231 levaduras que identificaron como *Saccharomyces*, esto coincide con un trabajo realizado en Republica de Checa por Suranska et al (2016), en el que aislaron un total de 120 cepas *S. cerevisiae*. Esteve Zarzoso et al (2000), demostraron que los principales agentes de la fermentación

alcohólica son cepas de la especie *S. cerevisiae*, ellas están adaptadas a las características del mosto y pueden crecer bajo esas condiciones, transformándose en la especie dominante y completando la fermentación alcohólica (Papodopoulous et al., 2023; Fleet y Heard, 1993).

4. Diferenciación intraespecífica de las levaduras aisladas

Todas las levaduras aisladas correspondieron al género *Saccharomyces*. De las 57 levaduras aisladas en la vendimia 2024 se identificaron 10 perfiles moleculares diferentes (Figura 3.2 y Tabla 3.2). El método molecular utilizado, PCR interdelta (Legras y Karst 2003), es altamente polimórfico y discriminativo (Capece et al., 2012; Garofalo et al., 2018) y permite inferir que aquellos aislados que presentan perfiles diferentes corresponden a cepas diferentes. El **patrón I** correspondió a las cepas AM1, 2, 6, 7 y 8 (Finca A de Tilcara -Maimara), AM12 y 13, 47, 48, 49, 50 y 51 (Finca C de Tumbaya - Tumbaya Grande), AM22, 23, 24 y 42 (Finca F de Tilcara-Yacoraite), AM26, 27, 28 y 29 (Finca H de Tumbaya-Purmamarca), AM31, 58, 59 y 61 (Finca I de Tilcara-Maimara), AM32, 62, 63, 64, 65 y 66 (Finca J de Tilcara -Maimara), AM43 y 45 (Finca K de Tilcara). El **patrón II** correspondió a las cepas AM9 y 11 (Finca B de Tumbaya-Purmamarca). El **patrón III** correspondió a la cepa AM10 (Finca B de Tumbaya-Purmamarca). El **patrón IV** correspondió a la cepa AM14 (Finca D de Tilcara-El Perchel). El **patrón V** correspondió a las cepas AM17, 18 y 52 (Finca E de Tilcara-Maimara), AM25 (Finca G de Tilcara), AM21 (Finca F de Tilcara-Yacoraite), AM33 y 34 (Finca K de Tilcara), AM35, 36 y 37 (Finca L de Tilcara-El Perchel), AM38 (Finca M de Tilcara-El Perchel), AM53, 54, 55 y 56 (Finca E de Tilcara-Maimara). El **patrón VI** correspondió a la cepa AM19 (Finca B de Tumbaya-Purmamarca). El **patrón VII** correspondió a la cepa AM39 (Finca N de Humahuaca). El **patrón VIII** correspondió a la cepa AM40 (Finca N de Humahuaca), AM41 (Finca B de Tumbaya-Purmamarca). El **patrón IX** correspondió a la cepa AM57 (Finca E de Tilcara-Maimara). El **patrón X** correspondió a la cepa AM60 (Finca I de Tilcara-Maimara).

Tabla 3.2. Código, origen y patrón molecular de 10 levaduras autóctonas, elegidas como ejemplo de cada perfil molecular obtenido

Levaduras	Fincas	Origen	Patrón molecular
AM1	Finca A	Tilcara (Maimara)	I
AM9	Finca B	Tumbaya (Purmamarca)	II
AM10	Finca B	Tumbaya (Purmamarca)	III
AM14	Finca D	Tilcara (El Perchel)	IV
AM18	Finca E	Tilcara (Maimara)	V
AM19	Finca B	Tumbaya (Purmamarca)	VI
AM39	Finca N	Humahuaca	VII
AM40	Finca N	Humahuaca	VIII
AM57	Finca E	Tilcara (Maimara)	IX
AM60	Finca I	Tilcara (Maimara)	X

Los resultados muestran una biodiversidad más baja de lo esperado. Esto puede deberse a diversos factores inherentes al entorno de muestreo y a las condiciones del proceso (Vaudano et al., 2019). En primer lugar, la mayoría de los productores implantaron en sus fincas el mismo material vegetal, debido a que realizan compras comunitarias de plantas o realizan esquejes (Asociación de Vitivinicultores de la Quebrada de Humahuaca). En segundo lugar, las condiciones ambientales de la Quebrada de Humahuaca, como la altura (1.500-3.000 m.s.n.m.), clima seco, radiación solar intensa, y temperaturas extremas (-5°C a 30°C) y humedad relativa baja (40-60%), podría favorecer una preselección de levaduras mejor adaptadas a este entorno (Vallone et al., 2024). Esto lleva a la selección natural de levaduras resistentes y adaptadas. La identificación y caracterización de levaduras autóctonas que hayan desarrollado estas adaptaciones específicas puede mejorar significativamente la eficiencia y calidad de la producción vinícola en la región, preservando la biodiversidad microbiana local y promoviendo la identidad de los vinos de la Quebrada de Humahuaca.

Otra razón de la baja diversidad genética encontrada en el presente estudio, en concordancia con lo planteado por Clavijo et al (2010) en un estudio realizado en España, podría atribuirse a la antigüedad de los viñedos, siendo una realidad la reciente implantación en la Quebrada de Humahuaca. Autores como, Sipiczki (2016) y Vaudano et al (2019) reportaron que, en los viñedos con poca antigüedad, el grado de biodiversidad no se ha visto influido por aspectos que afectan a la edad, como la colonización de las levaduras del viñedo a través del suelo, insectos o residuos de uvas no cosechadas después de vendimias sucesivas que podrían aumentar la biodiversidad.

Así mismo, de acuerdo a Chen et al (2022) la utilización de cepas industriales seleccionadas, como es frecuente en procesos de fermentación controlada, tiende a dominar sobre el microbiota natural, disminuyendo la variabilidad de los perfiles detectados. Por otro lado, la presión selectiva del medio ambiente fermentativo, caracterizado por una disponibilidad particular de nutrientes y la presencia de inhibidores como etanol, SO₂, pH, favorecen la proliferación de ciertos perfiles genéticos adaptados a estas condiciones.

Nuestros resultados no concuerdan con los hallados por Mercado et al (2011) en un estudio realizado en Argentina, donde se informó un aislamiento de 590 levaduras de uvas Malbec, las cuales correspondían a 190 patrones diferentes, lo que demuestra una gran diversidad, estos autores atribuyeron la gran diversidad a las características propias de la región estudiada, Zona Alta del río Mendoza, con diferentes microrregiones. Asimismo, lo encontrado por Capece et al (2010) y Vaudano et al (2019) también habla de una gran diversidad de levaduras *Saccharomyces* en una misma hilera de un viñedo. Chen et al (2022) aislaron 290 levaduras *Saccharomyces* y en la evolución de su diversidad genética se obtuvieron un total de 33 genotipos distintos de *S. cerevisiae*.

En la mayoría de las investigaciones sobre selección de levaduras autóctonas, se centran en realizar un análisis de las propiedades enológicas a varias réplicas de cada perfil genético, sin tener en cuenta todas las levaduras de manera independiente. Sin embargo, en nuestro estudio, se observó que las levaduras pertenecientes a un mismo perfil genético, pueden presentar distintos comportamientos enológicos como la tolerancia al etanol o producción de SH₂, aspectos que serán referidos más adelante. En este contexto, Johnston et al (2000), caracterizaron hasta 100 levaduras (genéticamente idénticas) de una misma cepa comercial de levadura, en la que, en función del tamaño de las colonias, se producían distintos perfiles de consumo de hidratos de carbono. Además, se ha visto que algunos análisis genéticos, como el análisis molecular de polimorfismos mediante AFLP y RAPD-PCR ampliamente utilizados para discriminar entre cepas no son lo suficientemente específicos para diferenciar cepas altamente emparentadas (Salinas et al., 2010). Por lo cual se recomienda la combinación de 2 o más marcadores moleculares en esos casos (Mercado et al., 2010).

Por ello, se considera importante no ajustarse a realizar una selección únicamente empleando una cepa en función del perfil genético, ya que el número de copias de un gen o cromosómicas, así como el estado fisiológico, metabólico o de

envejecimiento del cultivo puede influir en su comportamiento enotecnológico (Kasavi et al., 2014). Por otro lado, Chen et al (2022) determinaron que los resultados obtenidos en la identificación molecular fueron idénticos a los obtenidos luego de la siembra en agar WLN, lo que destaca la confiabilidad de las técnicas tradicionales, como herramienta para una diferenciación preliminar.

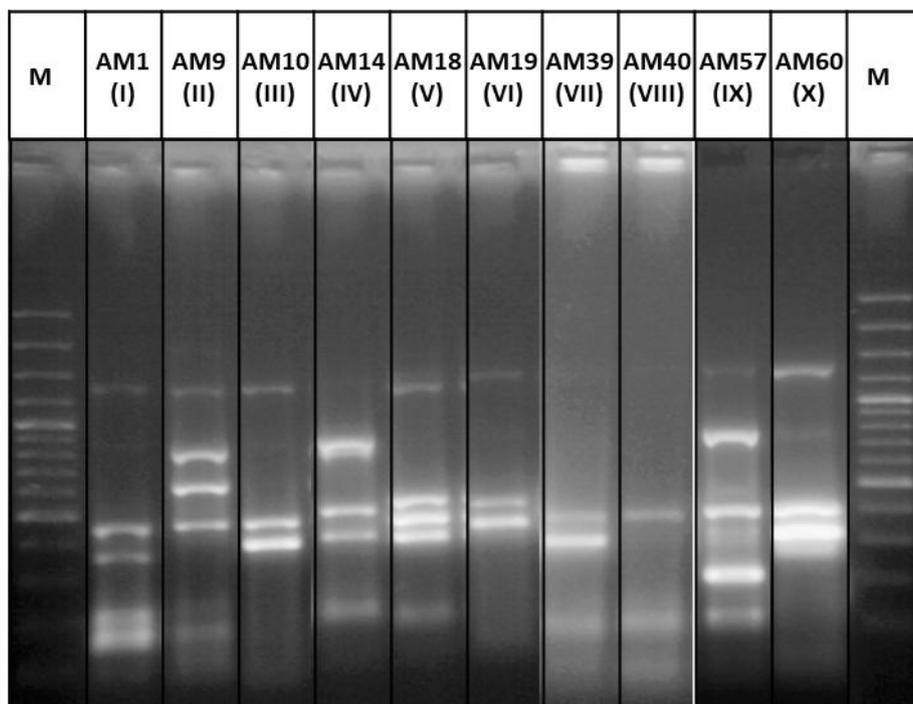


Figura 3.2. Ejemplo de imagen obtenida de un gel de electroforesis mostrando 10 patrones moleculares PCR interdelta de levaduras autóctonas. Los números romanos indican la identidad de los diferentes patrones y el código AM la identidad del aislamiento utilizado para la amplificación. El carril M corresponde al marcador de peso molecular 100 bp.

5. Caracterización enológica de las levaduras autóctonas aisladas

5.1. Evaluación inicial

Para realizar una evaluación inicial que permita reducir el número de levaduras y seleccionar aquellas con mayor potencial enológico para las siguientes pruebas de caracterización se utilizó la prueba de producción de ácido sulfhídrico.

Las levaduras sintetizan ácido sulfhídrico cuando la fuente de nitrógeno asimilable es mínima. La presencia de moléculas con grupos de azufre en el mosto-vino en condiciones anaeróbicas es la causa de los aromas típicos de vinos reducidos, como olor a huevos podridos, cebollas podridas, plásticos, neumáticos, por esta razón, se

espera que las levaduras autóctonas seleccionadas tengan una producción baja o mínima de sulfuro de hidrógeno, ya que tienen un umbral de percepción bajo (Morata et al., 2005; Mas et al., 2006; Swiegers y Pretorius, 2007; Suarez Lepe et al., 2012).

Las 57 levaduras aisladas fueron evaluadas en su capacidad para producir compuestos volátiles sulfurados. Los resultados mostraron que 22 levaduras (39%) presentaron niveles traza y baja producción de compuestos sulfurados, mientras que 24 levaduras (42%) mostraron niveles medio. Las 11 levaduras restantes (19%) mostraron una producción alta de ácido sulfhídrico (Figura 3.3).

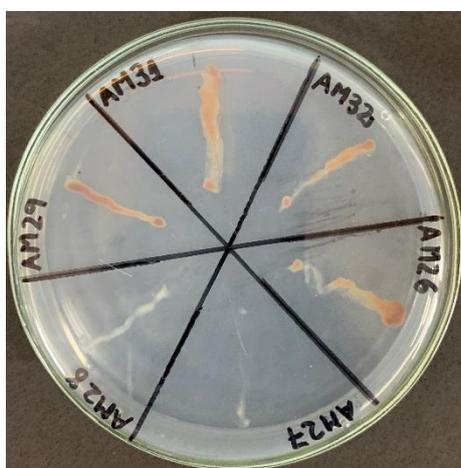


Figura 3.3. Producción de SH₂ por las levaduras aisladas en agar biggy. Clasificación: AM7 y 28 = Traza; AM26 y 31 = Media y AM29 = Alta.

Estos resultados coinciden con otros autores que encontraron que la mayoría de las levaduras estudiadas producen niveles traza y bajo de SH₂. Entre ellos, Suranska et al (2016) en una investigación realizada en la región vinícola de Moravia del Sur, República Checa, donde se aislaron 120 levaduras autóctonas *S. cerevisiae* de uvas de las variedades Sauvignon blanc y Pinot noir en fermentaciones espontáneas. Estos autores seleccionaron 45 levaduras para su caracterización enológica, de las cuales 34 mostraron baja producción de SH₂, 15 sintetizaron niveles medios y una levadura no produjo SH₂; sin embargo, esta cepa no fue adecuada para su aplicación como cultivo iniciador debido a sus fuertes propiedades de floculación. Por otro lado, Garofalo et al (2018) en un primer estudio realizado con vinos espumosos en la zona de Apulia, Italia, seleccionaron 16 levaduras para su caracterización tecnológica, de 240 levaduras autóctonas *S. cerevisiae* aisladas. También encontraron que la mayoría de las cepas estudiadas producían concentraciones bajas de estos compuestos de azufre y no

encontraron cepas no productoras. En el trabajo de Capozzi et al (2019) realizado en la zona DOP/DOC “Brindisi”, Apulia, Italia, con uva Negroamaro, aislaron 1200 levaduras, a las cuales se las sometió a una evaluación inicial mediante la prueba de producción de SH₂. Se preseleccionaron 145 levaduras *S. cerevisiae*, con baja o nula producción de SH₂.

Como se puede observar en la Figuras 3.4, de las 57 levaduras estudiadas, se descartaron 11 debido a su elevada producción de SH₂.

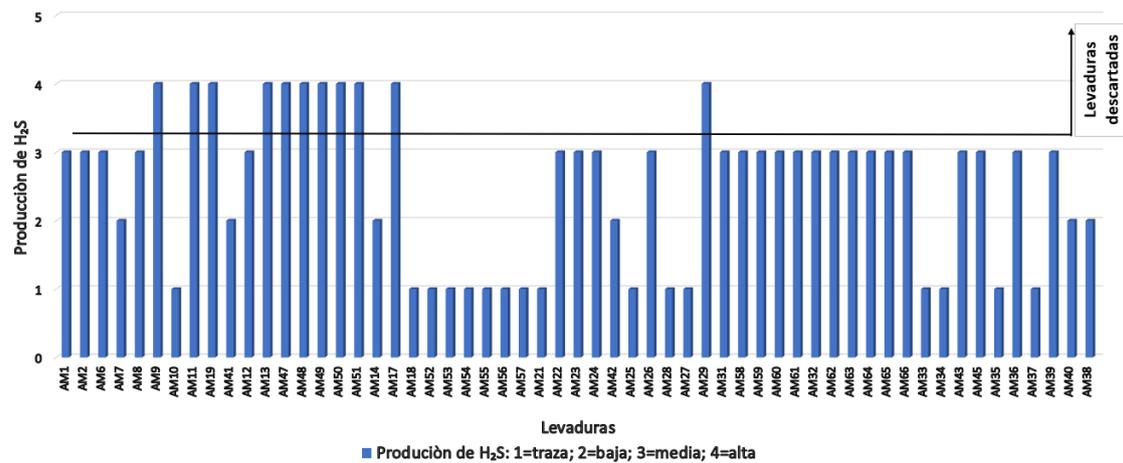


Figura 3.4. Producción de SH₂ por las levaduras aisladas. Clasificación: 1= (+): Traza; 2 = (++) : bajo; 3 = (+++) : Media y 4 = (++++): Alta.

5.2. Caracterización tecnológica de las levaduras autóctonas

Las levaduras que pasaron la primera prueba de producción de SH₂ fueron 45 aislados. Posteriormente, a partir de este grupo, se preseleccionaron 19 cepas de levaduras representativas de cada viñedo muestreado (AM1, AM7, AM10, AM12, AM14, AM18, AM21, AM25, AM28, AM31, AM32, AM34, AM35, AM37, AM38, AM40, AM42, AM45 y AM46). Esta selección, aunque limitada a 19 cepas por restricciones de tiempo y recursos, garantiza un balance entre la representatividad y viabilidad experimental en el proyecto. Las levaduras fueron sometidas a las siguientes pruebas de caracterización enológica: Resistencia al etanol, poder de fermentación y demanda de Nitrógeno, cinética de fermentación, resistencia al anhídrido sulfuroso, actividad β-glucosidasa, formación de ácido acético a partir de glucosa (Tabla 3.3).

5.2.1. Resistencia al etanol

Las levaduras estudiadas presentaron capacidad para tolerar altas concentraciones de etanol, las 19 levaduras fueron capaces de resistir 13% v/v de etanol, mientras que el 47,4% de las cepas toleraron además 14% v/v (Tabla 3.3).

La importancia de este parámetro radica en que el etanol es un compuesto tóxico para las levaduras, y su acumulación durante la fermentación puede inhibir su actividad metabólica, provocando fermentaciones detenidas. Esto se debe a que la acumulación de etanol altera la permeabilidad de la membrana celular y afecta a diversos procesos metabólicos esenciales, como la respiración y la fermentación (Suranska et al., 2016). Por lo tanto, las cepas que pueden tolerar concentraciones elevadas de etanol tienen una ventaja competitiva, ya que son capaces de completar la fermentación y producir un vino con el grado alcohólico deseado (Ribereau-Gayon, 2008; Bokulich et al., 2016; Wei et al., 2022).

5.2.2. Poder Fermentativo en dos condiciones de nutrición, con y sin la adición de nitrógeno

5.2.2.1. Poder fermentativo sin el agregado de una fuente de nitrógeno

El poder de fermentación es la capacidad de una levadura para producir alcohol (Ribereau -Gayon, 2008), y es un indicador directo, de la graduación alcohólica que se alcanzará en el vino elaborado (Abad Arranz et al., 2006). Por lo tanto, este parámetro es esencial para seleccionar cepas enológicas que aseguren una fermentación exitosa.

De las 19 levaduras evaluadas, dieciocho de ellas tuvieron la capacidad de producir alcohol estimado en un rango del 14 al 15% v/v en etanol, y la levadura AM28 alcanzó 16% v/v en etanol potencial (Figuras 3.5 a y b). El porcentaje es mayor al reportado por Tufariello et al (2019), donde las levaduras estudiadas produjeron un promedio de 13,11% v/v de alcohol, y al de Garofalo et al (2018) informaron que las levaduras produjeron entre 10 y 12 % v/v.

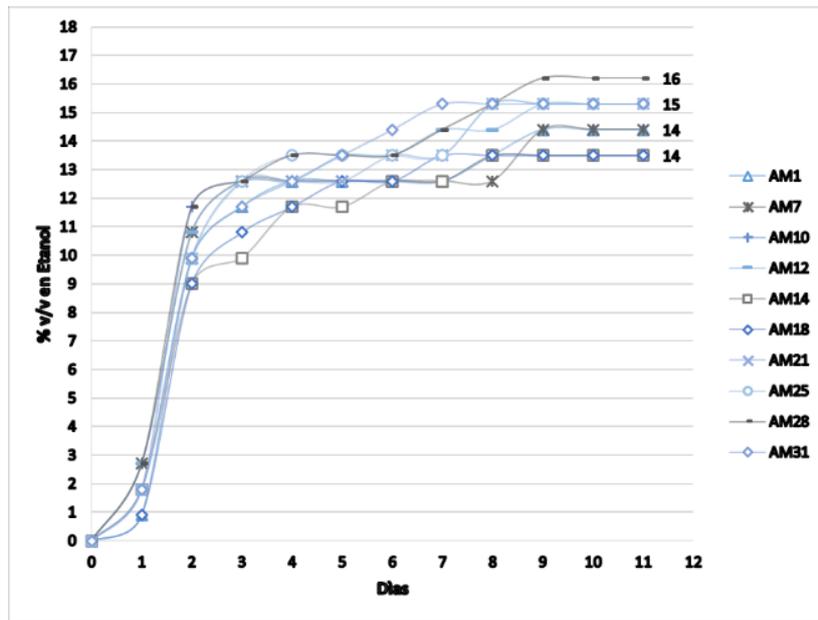
Las levaduras autóctonas aisladas en nuestro estudio, en función de estos resultados, podrían tener un gran potencial enológico, especialmente en regiones como la Quebrada de Humahuaca donde se busca producir vinos tintos, con una graduación de al menos 12,5% v/v para garantizar vinos secos, con un buen equilibrio sensorial y estructural (INV, 2022).

Tabla 3.3. Caracterización tecnológica de las levaduras preseleccionadas

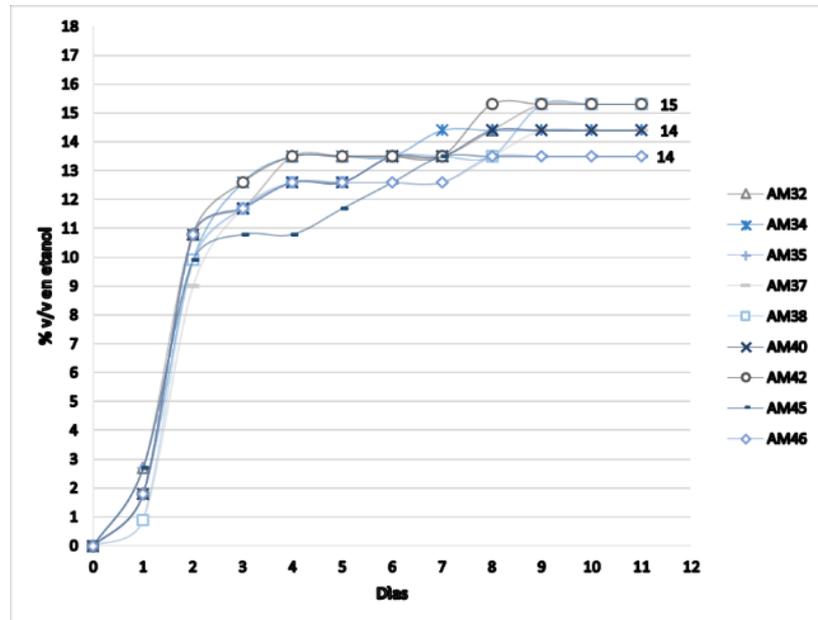
Levaduras	Características tecnológicas											
	Resistencia al alcohol (% v/v)			Poder de fermentación	Demanda de Nitrógeno	Cinética de Fermentación g CO ₂ /100mL	Resistencia al SO ₂ (ppm)			β-glucosidasa	Formación de ácido a partir de glucosa	SH ₂
	10	13	14				50	100	300			
AM1	+	+	-	14	14	10,7	+	+	+	-	+	+++
AM7	+	+	-	14	14	10,7	+	+	+	-	+	++
AM10	+	+	-	14	14	10,0	+	+	+	-	+	+/-
AM12	+	+	+	15	14	11,3	+	+	+	-	+	+++
AM14	+	+	-	14	14	10,0	+	+	+	-	+	++
AM18	+	+	-	14	14	10,0	+	+	+	-	+	+/-
AM21	+	+	+	15	15	11,3	+	+	+	-	+	+/-
AM25	+	+	+	15	14	11,3	+	+	+	-	+	+/-
AM28	+	+	+	16	14	12,0	+	+	+	-	+	+/-
AM31	+	+	+	15	14	11,3	+	+	+	-	+	+++
AM32	+	+	+	15	14	11,3	+	+	+	-	+	+++
AM34	+	+	-	14	14	10,7	+	+	+	-	+	+/-
AM35	+	+	+	15	14	11,3	+	+	+	-	+	+/-
AM37	+	+	-	14	14	10,7	+	+	+	-	+	+/-
AM38	+	+	+	15	15	11,3	+	+	+	-	+	++
AM40	+	+	-	14	14	10,7	+	+	+	-	+	++
AM42	+	+	+	14	14	11,3	+	+	+	-	+	++
AM45	+	+	-	14	14	10,0	+	+	+	-	+	+++
AM46	+	+	-	14	14	10,0	+	+	+	-	+	+++

Actividad β-glucosidasas: negativa (-); formación de ácido: producción traza (+); SH₂: producción traza (+/-), producción baja (++) , producción media (+++).

a)



b)



Figuras 3.5 a y b Evolución de la concentración de etanol producido por las levaduras autóctonas, en fermentaciones con uvas Malbec a 25° C. El etanol (% v/v) se calculó indirectamente mediante la producción de CO₂. Las curvas que no se logran ver se encuentran solapadas.

5.2.2.2. Poder fermentativo con el agregado de una fuente de nitrógeno

La adición de nitrógeno asimilable es un factor conocido por mejorar el rendimiento fermentativo, especialmente en las etapas iniciales del proceso, ya que este nutriente es importante para el crecimiento y actividad metabólica de las levaduras (Varela et al., 2004).

Para este estudio se realizaron fermentaciones con agregado de sulfato de amonio. El poder fermentativo de las levaduras estudiadas en estas condiciones de nutrición fue similar al encontrado en las fermentaciones sin nitrógeno (Figura 3.6), esto podría indicar que para las levaduras autóctonas estudiadas la disponibilidad de nitrógeno no es un factor limitante, al menos en las condiciones experimentales establecidas, podrían tener una capacidad intrínseca para adaptarse a condiciones bajas en nitrógeno o utilizar otras fuentes de nutrientes disponibles en el mosto. Una excesiva demanda de recursos nitrogenados puede llegar a ser un inconveniente en fermentaciones con mostos pobres en nutrientes obligando al suministro de elevadas cantidades de complementos nutricionales. Por ello, en los procesos de selección se destacan aquellas cepas cuyos consumos de nitrógeno en fermentación son moderados (Belda et al., 2014; Tesnière et al., 2015).

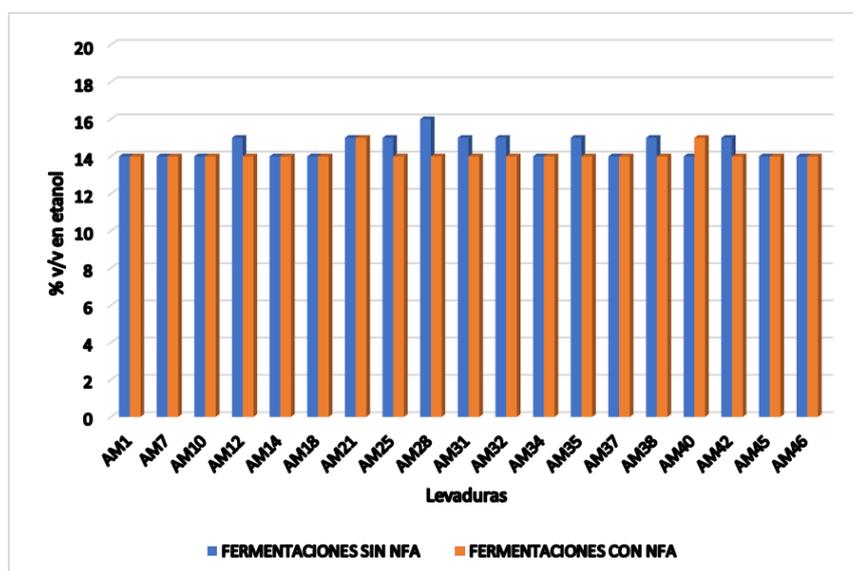


Figura 3.6. Poder fermentativo de las levaduras autóctonas con y sin la adición de una fuente de nitrógeno. El poder fermentativo se expresa como etanol (% v/v), y se calculó indirectamente mediante la producción de CO₂.

Sin embargo, como se puede observar en la Figura 3.7, el 53% de las levaduras estudiadas presentaron una mayor capacidad para iniciar la fermentación en los mostos que fueron adicionados con nitrógeno, presentando, por lo tanto, un poder de

fermentación mayor a las 48 horas de fermentación. De acuerdo a Tesnière et al (2015), es posible que el impacto de la limitación de este nutriente se manifieste de manera más notoria durante las etapas iniciales de la fermentación.

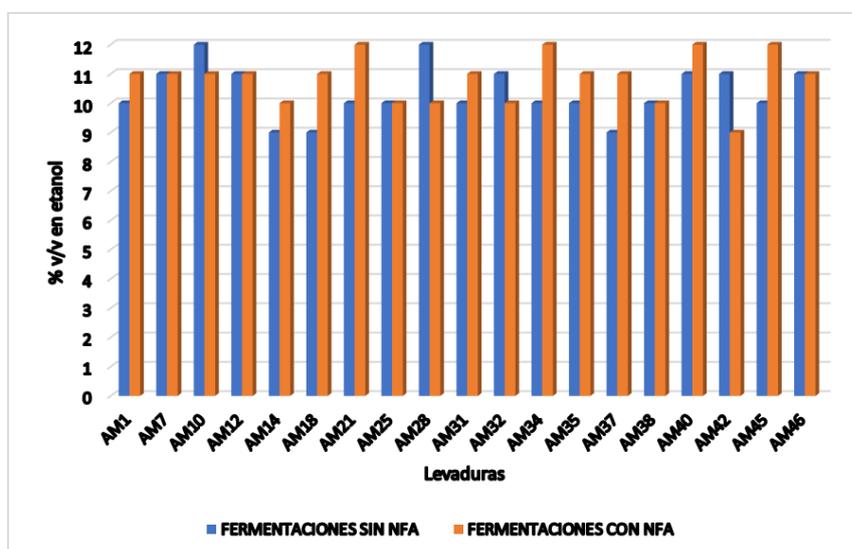


Figura 3.7. Poder fermentativo de levaduras autóctonas con y sin la adición de una fuente de nitrógeno a las 48 h de fermentación. El poder fermentativo se expresa como etanol (% v/v) se calculó indirectamente mediante la producción de CO₂.

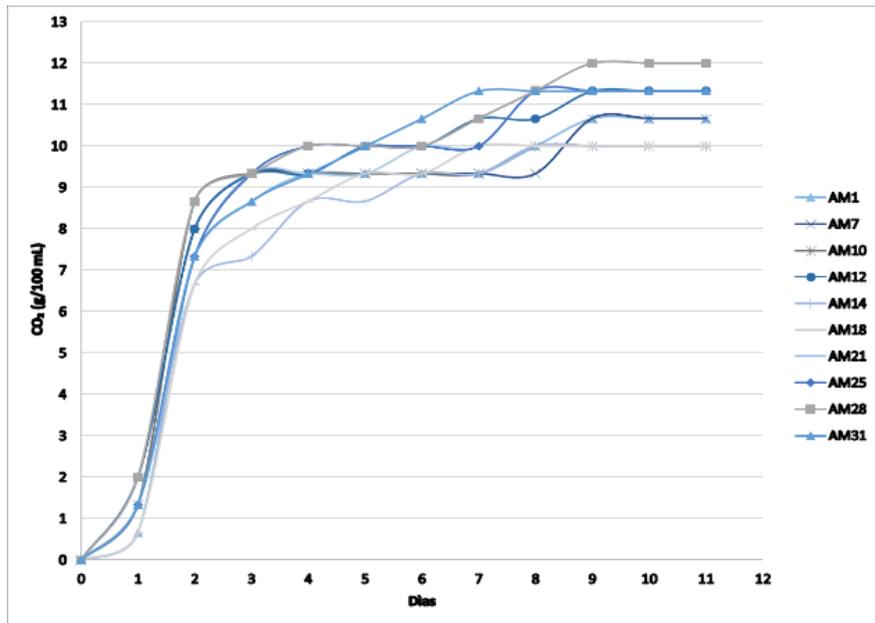
5.2.2.3. Dinámica de Fermentación

Durante los 11 días de fermentación, todas las levaduras mostraron una dinámica fermentativa similar, con valores comprendidos entre 10 a 11,3 g de CO₂/100 mL. Se estableció una liberación mínima de 10 g CO₂/100 mL como referencia, lo que asegura un valor potencial de etanol de 12,5% v/v (Rodríguez Alonso, 2021). Este umbral es importante en vinificación, ya que la producción de alcohol es uno de los parámetros más críticos para la calidad y estabilidad del vino.

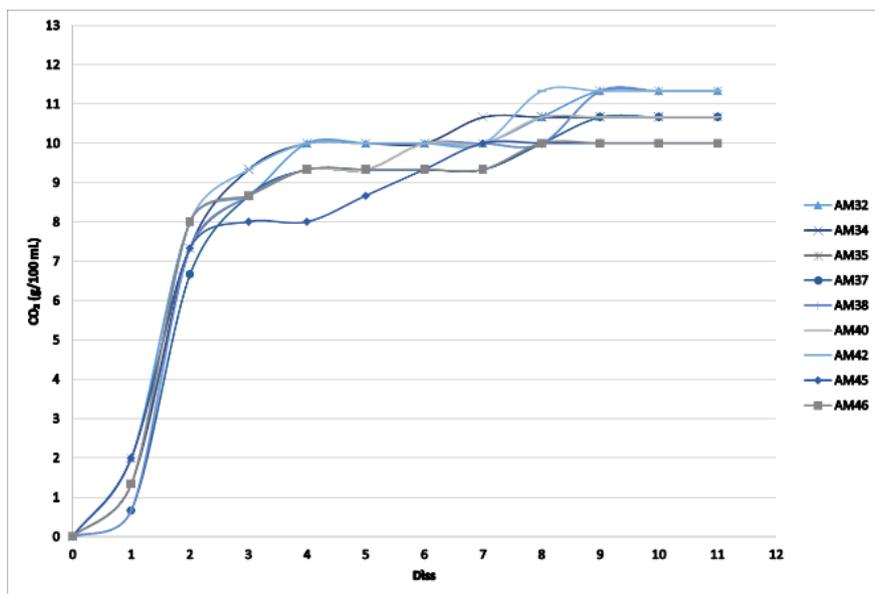
En las Figuras 3.8 a y b, se puede observar que la dinámica fermentativa se caracterizó por una liberación constante y controlada de CO₂, lo cual, garantiza varios aspectos esenciales para el éxito del proceso fermentativo (Comitini et al., 2011; Picazo et al., 2021). En primer lugar, garantiza la ausencia de desprendimientos calóricos repentinos, evita aumentos excesivos de temperatura que pueden causar pérdidas aromáticas y disminución de la calidad del vino e incluso paradas o una fermentación incompleta debido a la muerte térmica de las levaduras, minimizando el riesgo de altas concentraciones de azúcares residuales en el vino (Abad Arranz, 2006). La presencia de azúcares residuales no deseados no solo puede afectar el equilibrio aromático del vino, sino que también puede favorecer la proliferación de microorganismos indeseables durante la etapa de conservación, comprometiendo la estabilidad microbiológica del

producto final (Vicente et al., 2023). Además, permite reducir los costos energéticos asociados con la refrigeración, un factor particularmente relevante en bodegas con altos volúmenes de producción. En este sentido, la correcta dinámica fermentativa observada en las cepas podría ofrecer una ventaja competitiva en términos de ahorro energético, al reducir la necesidad de intervención externa para controlar la temperatura del mosto (Abad Arranz, 2006).

a)



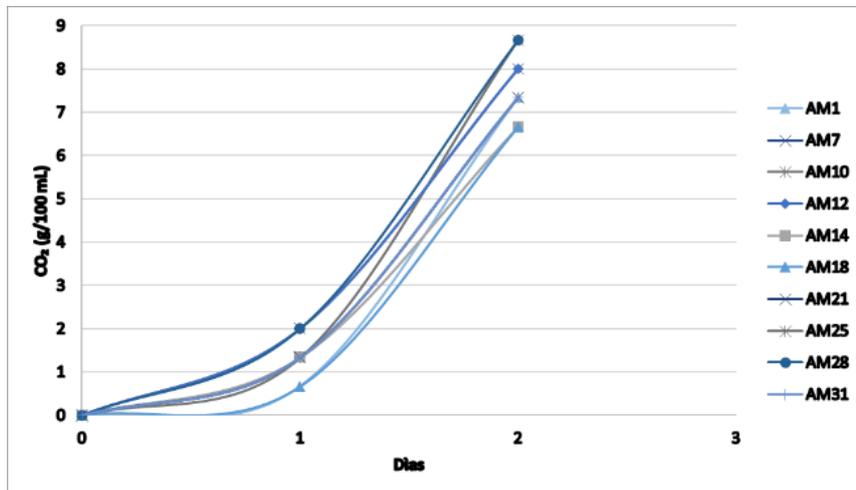
b)



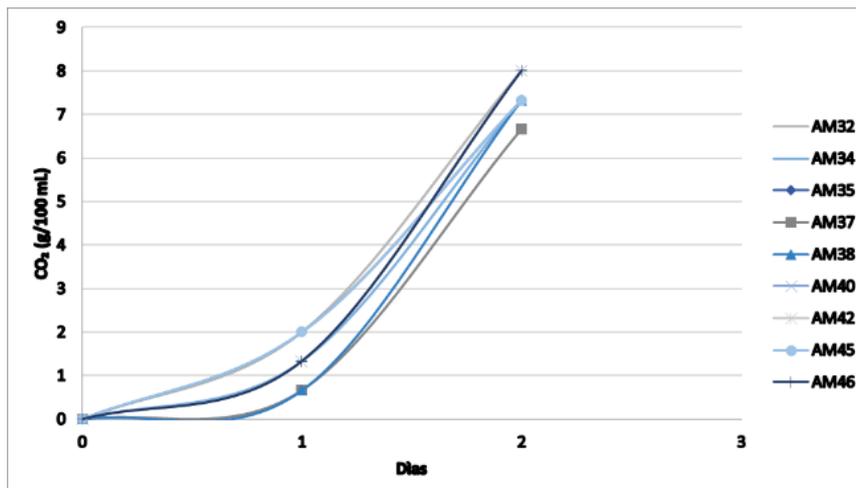
Figuras 3.8 a y b. Dinámica Fermentativa obtenida en las fermentaciones a 25° C. Pérdida de peso (g CO₂ /100 mL). Las curvas que no se logran ver se encuentran solapadas.

Como se puede observar en las Figuras 3.9 a y b, las levaduras estudiadas se adaptaron rápidamente a las condiciones estresantes y competitivas del mosto-vino, y comenzaron con el crecimiento exponencial apenas transcurrido un día desde la inoculación. Autores como, Suranska et al (2016) y Vicente et al (2023) reportaron que, si las levaduras autóctonas tienen una rápida adaptación, mayor será su capacidad para competir con otras levaduras y otros contaminantes. De acuerdo a diversos autores, como Papadopoulou et al (2023), Molinet y Cubillos et al (2020), Suranska et al (2016) y Garofalo et al (2016) se sabe que las levaduras autóctonas seleccionadas en la misma zona de producción, podrían poseer las características para ajustarse a las condiciones geo-botánico-climatológicas de la misma y la composición del vino.

a)



b)



Figuras 3.9 a y b. Pérdida de peso (g CO₂/100 mL) durante las fermentaciones a las 48 horas. Las curvas que no se logran ver se encuentran solapadas.

5.2.2.5. Análisis fisicoquímico de las fermentaciones utilizadas para estudiar el poder y dinámica de fermentación

En la Tabla 3.4 se muestran los resultados de los análisis físico-químicos realizados a las fermentaciones en mosto elaboradas con las levaduras autóctonas preseleccionadas.

Tabla 3.4. Análisis fisicoquímico de las fermentaciones utilizadas para estudiar el poder y dinámica de fermentación en mostos con y sin adición de nutriente nitrogenado.

Vinos	% V/V	AV	pH	Ac. Máfico	Glucosa	Fructosa	Densidad	IPT
1	11,98	0,38	3,67	3,99	0,64	0,00	0,9940	42,10
1N	10,86	0,42	3,66	3,93	0,63	0,00	0,9948	46,54
7	11,30	0,37	3,72	4,36	0,10	0,09	0,9949	47,13
7N	11,15	0,36	3,63	4,14	0,35	0,19	0,9954	46,89
10	11,54	0,39	3,67	4,17	0,08	0,01	0,9947	45,97
10N	11,31	0,38	3,61	3,92	0,28	0,06	0,9949	45,05
12	11,03	0,40	3,67	4,25	0,02	0,11	0,9947	44,83
12N	11,12	0,39	3,62	4,02	0,27	0,06	0,9954	45,81
14	10,48	0,41	3,64	3,72	0,57	0,00	0,9952	47,47
14N	10,77	0,40	3,69	3,94	0,29	0,00	0,9947	44,46
18	10,80	0,44	3,73	4,17	0,36	0,00	0,9951	43,31
18N	11,03	0,37	3,64	3,97	0,45	0,00	0,9950	44,86
21	10,90	0,46	3,75	4,3	0,57	0,00	0,9951	42,54
21N	10,65	0,43	3,67	4,05	0,68	0,00	0,9956	46,78
25	10,82	0,40	3,69	4,54	0,03	0,00	0,9954	47,69
25N	10,85	0,35	3,62	4,28	0,3	0,00	0,9959	47,31
28	10,95	0,39	3,76	4,58	0,00	0,00	0,9956	50,24
28N	10,73	0,37	3,70	4,47	0,11	0,00	0,9963	52,08
31	10,79	0,40	3,67	3,88	0,16	0,00	0,9942	42,02
31N	10,78	0,37	3,59	3,84	0,61	0,00	0,9948	44,27
32	11,02	0,38	3,68	4,31	0,04	0,00	0,9950	47,38
32N	11,09	0,36	3,61	4,14	0,31	0,17	0,9955	48,01
34	10,63	0,40	3,70	4,52	0,00	0,00	0,9958	48,55
34N	10,82	0,36	3,63	4,20	0,28	0,00	0,9959	50,00
35	10,46	0,43	3,70	4,62	0,09	0,00	0,9958	47,51
35N	10,96	0,35	3,63	4,23	0,31	0,00	0,9958	49,82
37	10,78	0,39	3,71	4,44	0,00	0,01	0,9952	43,10
37N	10,91	0,35	3,63	4,25	0,15	0,00	0,9958	48,99
38	10,96	0,45	3,65	4,25	0,32	0,00	0,9948	46,03
38N	11,10	0,41	3,58	3,90	0,61	0,00	0,9944	44,96
40	10,58	0,39	3,68	4,23	0,19	0,02	0,9954	49,86
40N	10,92	0,37	3,63	4,02	0,25	0,00	0,9954	48,53
42	11,15	0,39	3,68	4,10	0,20	0,00	0,9946	44,06
42N	12,02	0,38	3,60	3,67	0,47	0,00	0,9938	39,94
45	11,55	0,42	3,70	4,06	0,57	0,00	0,9945	44,48
45N	11,18	0,40	3,64	3,82	0,63	0,00	0,9947	44,21
46	11,45	0,37	3,58	3,93	0,18	0,03	0,9945	47,84
46N	11,03	0,38	3,61	3,56	0,03	0,14	0,9946	45,23
Promedio	11,01± 0,35	0,39 ± 0,03	3,66 ± 0,04	4,13 ± 0,25	0,29 ± 0,22	0,02 ± 0,05	0,995 ± 0,00	46,21 ± 2,60

Vinos: vino fermentado con cepas autóctonas sin N: AM1, 7, 10, 12, 14, 18, 21, 25, 28, 31, 32, 34, 35, 37, 38, 40, 42, 45 y 46. Vino fermentado con cepas autóctonas con N: AM 1N, 7N, 10N, 12N, 14N, 18N, 21N, 25N, 28N, 31N, 32N, 34N, 35N, 37N, 38N, 40N, 42N, 45N y 46N; %v/v: etanol; AV: acidez volátil (g/L ácido acético); Ac. Máfico: ácido Máfico (g/L); Glucosa: (g/L); Fructosa (g/L); Densidad: (g/mL); IPT: Índice de Polifenoles Totales a 280 nm.

Las fermentaciones presentaron resultados óptimos, con valores dentro de lo establecido por el OIV. Con un pH promedio de $3,66 \pm 0,04$; valores óptimos de acidez volátil $0,39 \pm 0,04$ g/L y ácido málico $4,13 \pm 0,25$ g/L comparables a los reportados por Vignatelli et al (2016), Garofalo et al (2018) y Chen et al (2023). La fermentación alcohólica se completó en todos los ensayos, alcanzándose un promedio de etanol $11\% \pm 0,35$ v/v, estos resultados concuerdan con los encontrados por Tufariello et al (2019) y Garofalo et al (2018). Las fermentaciones presentaron una densidad promedio de $0,9951$ g/mL ($\pm 0,00$) y una concentración de glucosa de $0,29 \pm 0,22$ g/L.

Los vinos obtenidos con las levaduras preseleccionadas en general mostraron un nivel de índice de polifenoles totales (IPT) entre 42 y 52 mg/L. El promedio fue de $46 \pm 2,60$ mg/L. Un bajo pH y grado alcohólico favorece el fenómeno de copigmentación en los vinos, eliminando antocianos en forma libre y brindando una mayor estabilidad en el tiempo (Boulton, 2001). Estos resultados concuerdan con los encontrados por Berbegal et al (2023) y Pozo-Bayón et al (2003) para vinos tintos de calidad. Los vinos con contenidos más altos de polifenoles pueden presentar un sabor más intenso y complejo, así como un potencial de envejecimiento mayor.

En el trabajo realizado por Berbegal et al (2023) determinaron que las levaduras estudiadas tuvieron un fuerte efecto sobre los polifenoles, no solo en su contenido, sino en su estabilidad. Esto concuerda con trabajos realizados por Bautista-Ortín et al (2007) y Minnaar et al (2017). Caridi et al (2004) encontraron una correlación entre la cepa de levadura utilizada para la elaboración del vino y la composición fenólica del mismo. Destacaron la capacidad de la cepa utilizada para modificar el color, el poder antioxidante y el perfil de compuestos fenólicos del vino.

5.2.3. Tolerancia al Dióxido de Azufre

Se observó que todas las levaduras lograron crecer en presencia de la concentración más alta de dióxido de azufre (SO₂) estudiada (Tabla 3.3) (Figura 3.10). Este resultado concuerda con los encontrados por Vaudano et al (2019) y Garofalo et al (2018). La actividad del SO₂ en los microorganismos es muy diferente, y varía desde casi inofensiva para algunos hasta producir una toxicidad grave en otros. La tolerancia de las levaduras al SO₂ depende de la especie, y en general se ve disminuida por la presencia de etanol (Aubert et al., 2012).



Figura 3.10. Desprendimiento del tapón de vaspar, como consecuencia de poder crecer en mosto con concentraciones de 300 ppm de SO₂.

Las levaduras de los géneros *Saccharomyces*, *Torulaspóra* y *Zygosaccharomyces* soportan concentraciones de SO₂ muy altas (Pretorius et al., 2000). Debido a su efecto antimicrobiano, la capacidad de crecimiento en presencia de SO₂ se convierte en un criterio importante para la selección de cepas de levadura con aplicaciones enológicas (Fleet et al., 2003). En investigaciones previas realizadas en China por Chen et al (2022) y Grecia por Papodopoulou et al (2023), se realizaron fermentaciones con y sin el agregado de sulfitos y se observó que se redujo la mitad de la población de levaduras, principalmente al inicio de la fermentación.

En la industria del vino, no siendo una excepción las bodegas de la provincia de Jujuy, el aditivo más usado, es el SO₂. Este químico es considerado una herramienta esencial para los enólogos, debido a su bajo costo y sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas frente a un amplio espectro de microorganismos (Roullier-Gallet et al., 2017). Por lo tanto, es de gran utilidad durante la fermentación, como en el almacenamiento del vino para evitar su deterioro. Sin embargo, a pesar de las ventajas, dosis altas de SO₂ son tóxicas para las células de levaduras (Aubert, et al., 2012; Guerrero y Cantos-Villar, 2015), lo cual puede provocar fermentaciones detenidas.

La ingesta excesiva de alimentos que contienen SO₂, también puede causar problemas de salud al consumidor, ya que es responsable de reacciones adversas, que incluyen broncoespasmo, bradicardia, síntomas gastrointestinales, dolores de cabeza, así como erupciones cutáneas, hipotensión y, con menos frecuencia, reacciones anafilácticas. En este contexto, en la actualidad existe una creciente preocupación de las personas por comer y beber alimentos más saludables, con menos conservantes

químicos y respetuosa con el medio ambiente (Peres et al., 2018; Abraham et al., 2022), es por esto, que la Organización Mundial de la Salud (OMS) fomenta métodos alternativos para reducir, o incluso eliminar, el uso del SO₂ en la producción de alimentos, en consecuencia, se proponen varias tecnologías alternativas capaces de controlar los microorganismos en los mismos. Estos incluyen ultrasonido, radiación ultravioleta, campo eléctrico pulsado, agua electrolizada, tratamientos de alta presión hidrostática o la adición de lizozima, ácido sórbico, dimetil dicarbonato y quitosano (Guerrero y Cantos- Villar, 2015). Sin embargo, aún no se ha encontrado un sustituto definitivo para el SO₂, especialmente para los vinos sometidos a almacenamiento prolongado (Giacosa et al., 2019). Otra alternativa es, mediante la utilización de levaduras con capacidad bioprotectora (Simonin et al., 2018; Simonin et al., 2020; Windholtz et al., 2021; Di Gianvito et al., 2022).

Un aspecto a destacar en esta prueba, es que la cantidad evaluada de dióxido de azufre total (300 ppm) excede lo que está legislado, 130 mg/L para vinos tintos secos, 180 mg/L para vino blanco, rosados y seco, y rosados dulces (INV, Resolución 135/2018). Para vino orgánico, de acuerdo con el reglamento de la UE (N° 203/2012) la concentración total de sulfitos no debe exceder los 100 mg/L y 150 mg/L para vino tinto y blanco, respectivamente.

Aunque no hay publicaciones al respecto, podría haber una relación entre la tolerancia de las cepas a concentraciones altas de SO₂ con una posible capacidad de producir este compuesto en cantidades iguales (característica indeseable en la selección de levaduras para la vinificación). Teniendo en cuenta los aspectos antes mencionados, se decidió no eliminar ninguna de las levaduras según los criterios establecidos por esta prueba y ver el rendimiento conjunto en los ensayos restantes.

6. Evaluación de otras características de impacto enológico

6.1. Actividad β -glucosidasa

La β -glucosidasa actúa sobre los precursores claves de aromas en la fermentación de vinos, ya que hidroliza los glucósidos y libera compuestos aromáticos como terpenos y fenólicos. También desempeña un papel fundamental en la formación de ésteres y aldehídos que contribuyen al aroma, intensidad, complejidad y sabor del vino (Suranska et al., 2016).

En cuanto a las actividades enzimáticas, ninguna de las levaduras estudiadas fue capaz de producir β -glucosidasas (Figuras 3.11 a y b). Este es un comportamiento

típico en cepas de *S. cerevisiae*, ya que esta enzima se reprime por la presencia de glucosa y valores bajos de pH, los valores de pH del mosto de uva y el vino oscilan entre 2,8 y 3,5; la actividad enzimática disminuye aproximadamente un 33% en el rango mencionado anteriormente (Suranska et al., 2016). En consecuencia, se espera que esta actividad disminuya durante la vinificación (Hernández, 2003). Estos resultados concuerdan con los encontrados por Suranska et al (2016).

Por otro lado, en el trabajo de Massera et al (2012) realizado en Mendoza, Argentina, se confirmó la producción de la enzima β -glucosidasas en 15 de 34 levaduras *Saccharomyces* aisladas de fermentaciones espontaneas de uvas de las variedades Malbec, Cabernet Sauvignon, Tempranillo, Bonarda y Syrah.

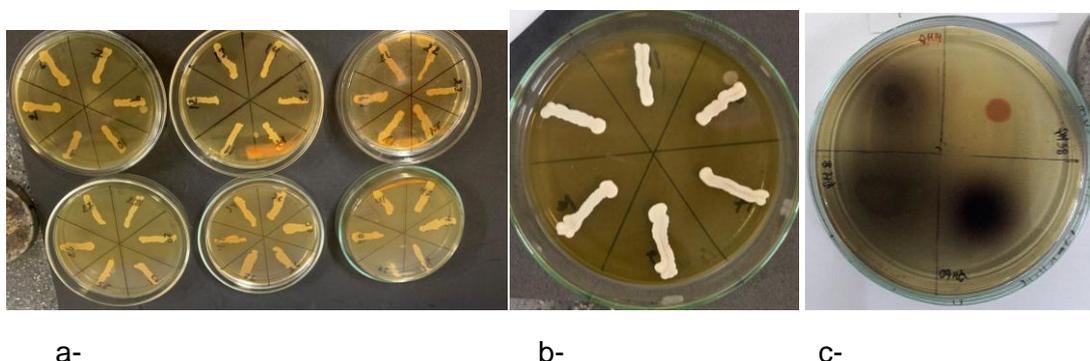


Figura 3.11 a y b. Resultado negativo para producción de actividad β -glucosidasa. c- Ejemplo de un control positivo para la metodología utilizada

6.2. Producción de ácido acético a partir de glucosa

El 100% de las levaduras evaluadas produjeron bajas concentraciones de ácido acético (Figuras 3.12 a y b). Este resultado concuerda con Suranska et al (2016) quienes determinaron que, durante la fermentación, las cepas de *Saccharomyces* producen cantidades relativamente bajas de este ácido.

La producción de ácido acético, puede variar de acuerdo a la levadura, las concentraciones de azúcar en el mosto, la temperatura de fermentación, por lo que es importante elegir una levadura con baja producción de este compuesto, por lo contrario, podría afectar las características sensoriales del vino (Rodríguez Alonso, 2021). La producción excesiva de este compuesto podría tener consecuencias en la comercialización, ya que es un componente de la acidez volátil que tiene límites legales de 1,5 g /L expresados en ácido acético (INV, Resol 46/2024).

Algunos autores como, Vaudano et al (2019), Suranska et al (2016) y Rodríguez Alonso (2021) han relacionado la producción de ácido acético con una mayor síntesis

de glicerol, el principal osmolito en *S. cerevisiae*, lo que confiere al vino una propiedad organoléptica deseable.



Figuras 3.12. a- Producción de ácido acético para levaduras en estudio. b- Ejemplo de control positivo

En la Tabla 3.3, presentada más arriba, se resumen los resultados obtenidos de los ensayos realizados a cada una de las levaduras autóctonas.

7. Evaluación de los patrones moleculares

Se realizó un análisis de similitud entre los patrones moleculares correspondientes a las 19 levaduras que fueron caracterizadas (ver apartados 5.2 y 6), para este grupo correspondieron 5 patrones moleculares (Figura 5.13). Se identificó un total de 2 clusters en función de su similitud, el cluster 1 está constituido por tres patrones (I, IV y VIII) y el cluster 2 por (III y V). El dendrograma mostró que la agrupación de los genotipos no estaba influenciada por la ubicación geográfica de las fincas. Además, los patrones que incluyeron a más levaduras (I y V) fueron agrupados en clusters separados, indicando que un mismo cluster puede agrupar a poblaciones diferentes de levaduras *S. cerevisiae* de la región estudiada. Se requiere más investigación para determinar si estos genotipos pueden considerarse como firmas microbianas potenciales de los vinos locales Malbec (Figura 3.13).

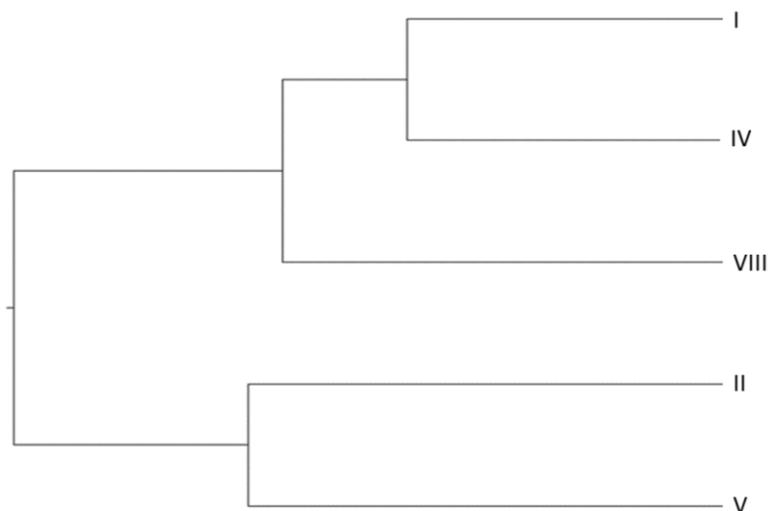


Figura 3.13. Dendrograma de relaciones moleculares entre patrones obtenidos por PCR interdelta a partir de cepas seleccionadas en fermentaciones espontáneas de mostos Malbec de viñedos de la Quebrada de Humahuaca, Jujuy. Coeficiente de correlación cofenética (CP) = 0,72.

7. Selección final de levaduras autóctonas

Para agrupar las cepas de acuerdo a sus características enológicas con el fin de facilitar el análisis de los resultados, se desarrolló una matriz de similitud a partir de la cual se obtuvo un dendrograma en el que se aplicó una distancia de corte de 1,95. Mediante el análisis de conglomerados para un nivel de similitud del 94% con la distancia euclidiana y el promedio (Average linkage), fue posible agrupar las cepas en cuatro grupos. Las cepas AM21, 25, 28, 35 y 38 se unen a una distancia menor que el resto de las cepas, formadas en el cluster 1. Las cepas AM12, 31 y 32 forman el cluster 2. La cepa AM42 forma el cluster 3. El resto de las cepas forman el cluster 4 (Figura 3.14).

El grupo 1, reúne las levaduras que tienen las características enológicas más eficientes, las cepas tienen un buen poder de fermentación y se adaptan de forma correcta a las condiciones estresantes del mosto y el vino, sin la necesidad de la adición de una fuente de nitrógeno. Producen alcohol potencial por encima del 14% v/v. Además, estas levaduras resistieron la concentración más alta de alcohol y SO₂ probadas, por lo que podrían seleccionarse para cosechas con concentraciones elevadas de azúcar. Producen concentraciones traza de ácido acético y ácido sulfhídrico. Además, todos los integrantes de este cluster mostraron el mismo patrón molecular, indicando la alta homogeneidad del mismo.

Las levaduras presentes en los otros grupos, algunas presentan entre baja y alta producción de ácido sulfhídrico y otras no toleran concentraciones del 14% v/v de etanol.

La caracterización de levaduras autóctonas es un proceso esencial para enólogos que buscan implementar un control microbiológico preciso en la elaboración del vino y maximizar el potencial enológico distintivo de su territorio.

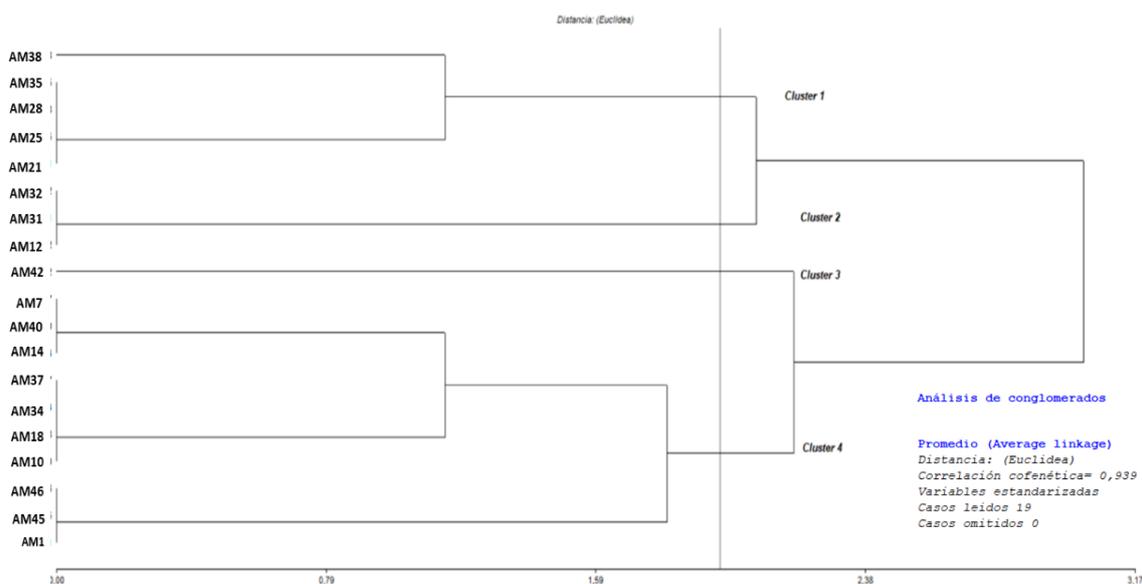


Figura 3.14. Dendrograma de caracterización enológica de levaduras autóctonas seleccionadas en fermentaciones espontáneas de mostos Malbec de viñedos de la Quebrada de Humahuaca, Jujuy. Coeficiente de correlación cofenética (CP) = 0,94.

En la Figura 3.15, se reúnen todas las características estudiadas y se muestran las levaduras autóctonas seleccionadas por presentar la mejor combinación de sus características enológicas, como producción traza de SH₂, ácido acético, actividad β-glucosidasa, tolerancia a 300 ppm de SO₂, y 14% v/v de etanol, con una buena capacidad de producción de etanol con y sin el agregado de una fuente de nitrógeno y una correcta dinámica fermentativa.

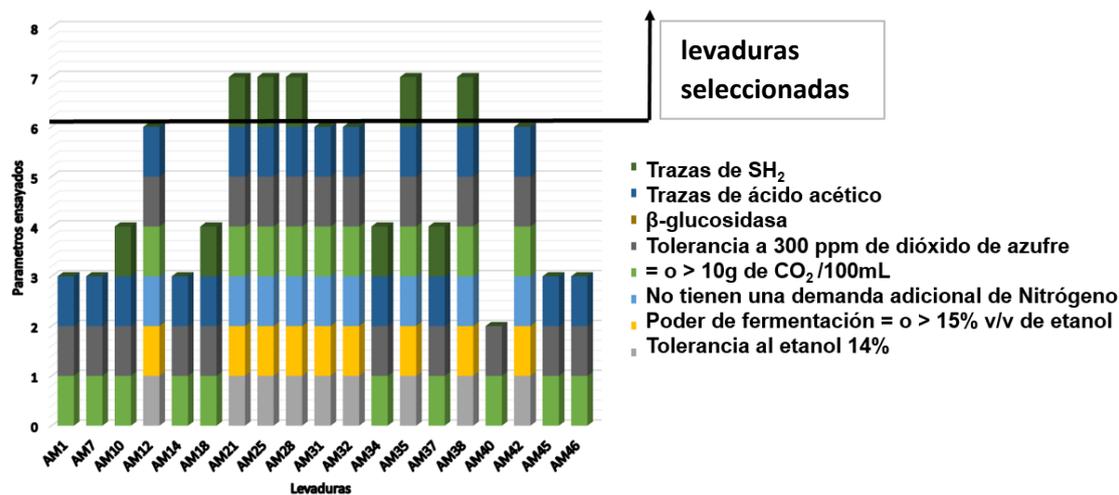


Figura 3.15. Selección de levaduras autóctonas con mejores características enológicas. Parámetros ensayados y criterio de selección deseado: 14%: capacidad de lograr un poder fermentativo de 14 % al iniciar la fermentación. Poder de fermentación= o > a 15%: capacidad de producir igual o más de 15% v/v de etanol. Demanda de nitrógeno = o < a 15%: capacidad de producir 15% (v/v) de etanol sin el agregado de nitrógeno. = o > a 10 g de CO₂: capacidad de liberar igual o más de 10 g CO₂/100 mL, lo que asegura un vino con 12,5% v/v de etanol. 300 ppm: capacidad de iniciar la fermentación a 300 mg de SO₂ L⁻¹. β-glucosidasa: producción de actividad β-glucosidasa. Traza de ácido acético: capacidad de producir niveles traza de ácido acético a partir de la glucosa. Trazas de SH₂: capacidad de producir niveles traza de SH₂.

Se pueden encontrar numerosos trabajos de investigación realizados en regiones con tradición vinícolas, como el de Berbegal et al (2023) donde aislaron y caracterizaron cepas autóctonas de *S. cerevisiae* de uvas Cabernet Sauvignon de Requena, España. Once de las cepas aisladas presentaron características enológicas eficientes, con las cuales se elaboraron vino con bajo contenido de ácido acético, etanol moderado y mayor concentración de glicerol; así como altas concentraciones de antocianinas, taninos y compuestos aromáticos, como ésteres y alcoholes, especialmente 2-feniletanol y butirolactona, que contribuyeron en la calidad del aroma. En Italia, Tufariello et al (2019), aislaron, identificaron y caracterizaron 15 levaduras *S. cerevisiae* autóctonas. Los vinos elaborados con uva "Primitivo" cultivada en Apulia, se caracterizaron por altos niveles de ésteres, asociados a matices frutales, así como de alcoholes responsables de notas vinosas, dulces y florales. Además, desde el punto de vista sensorial, todos los vinos fueron valorados positivamente, caracterizándose por su persistencia e intensidad, buen equilibrio y cuerpo. En la misma región, Garofalo et al (2018) seleccionaron cepas de *S. cerevisiae* que presentaron potencial biotecnológico adecuados para mejorar la calidad de los vinos espumosos de la región y proporcionar un motor de innovación/segmentación en el mercado. Vaudano et al (2019) caracterizaron levaduras aisladas de uvas Grignolino de Piamonte, Italia. Se aisló una

levadura *S. paradoxus* y diez cepas diferentes de *S. cerevisiae*, todas presentaron potencial enológico.

Los resultados obtenidos en este trabajo representan para la Quebrada de Humahuaca, un avance significativo en la caracterización y selección de cepas autóctonas *Saccharomyces* con potencial enológico. Futuras investigaciones podrían centrarse en el estudio de la capacidad de estas levaduras como cultivos iniciadores en fermentaciones realizadas a escala de laboratorio y en condiciones de bodega, así también su influencia sobre la calidad sensorial de los vinos elaborados.

En este contexto, la provincia de Jujuy, particularmente la Quebrada de Humahuaca, se destaca como un entorno excepcional para la vitivinicultura, debido a una combinación única de factores. Su potencial climático, luminosidad y radiación, pureza del aire, altitud, condiciones edafológicas, calidad de las uvas y prácticas culturales (Buitrago, 2000), convergen para crear un escenario propicio para la producción de vinos con levaduras autóctonas, de calidad y con un *terroir* distintivo.

IV. CONCLUSIONES

El trabajo desarrollado durante esta tesis permitió la selección de las levaduras AM21, 25, 28, 35 y 38, identificadas molecularmente como *S. cerevisiae* y caracterizadas por un perfil molecular único, las cuales presentaron características enológicas deseables como, un buen poder de fermentación, una producción de alcohol potencial por arriba de 14% v/v. Mostraron un correcto inicio de fermentación (10 a 11,3 g de CO₂/mL desprendidos en las primeras 48 h), sin la necesidad de la adición de una fuente externa de nitrógeno. Además, estas levaduras resistieron las concentraciones más altas de alcohol y SO₂ probadas, por lo que podrían seleccionarse para cosechas con concentraciones altas de azúcar. Tienen bajo potencial genético para producir ácido acético, ácido sulfhídrico.

Una vez que se completó la caracterización enológica de las cepas autóctonas estudiadas, estas se integraron al banco de recursos genéticos conservados en el cepario del Laboratorio de Microbiología Enológica y otras Bebidas Fermentadas de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Jujuy, garantizando su preservación y disponibilidad. La elección de una levadura u otra dependerá de las particularidades de las uvas y vinos de cada bodega, adaptándose a las características que cada enólogo y productor desee resaltar, aportando un sello distintivo al producto final.

En la actualidad, las levaduras autóctonas son claves en la preservación tanto de la tipicidad como de la complejidad aromática de los vinos. Por esta razón, y a medida que aumenta el interés por la producción de alimentos y bebidas locales y saludables, la selección de levaduras autóctonas podría representar un enfoque equilibrado, entre lo innovador y lo auténtico para la vitivinicultura de nuestra región.

La combinación de los avances tecnológicos, como los presentados en este trabajo, con las prácticas artesanales de producción típicas de la Quebrada de Humahuaca, ofrece una excelente oportunidad para innovar con valor agregado en un mercado tan competitivo como el actual. Además, fomenta el arraigo territorial y permite la producción de vino genuino de forma rentable y sostenible.

Futuras investigaciones podrían centrarse en el estudio de estas levaduras en fermentaciones realizadas en bodegas y evaluar las características sensoriales durante este proceso y una vez finalizado el mismo. Para fines comerciales, además de lo citado anteriormente, es importante estudiar los procesos de multiplicación

masiva y desecación, ya que este proceso es un punto crítico para la utilización efectiva de levaduras seleccionadas.

V. BIBLIOGRAFIA

- Abad Arranz, E. (2006). Selección de levaduras autóctonas para la elaboración de vinos tintos para bodegas y viñedos de Trujillo S.L. *Universidad Politécnica de Madrid. Escuela Superior de Fermentación. International Journal of Food Microbiology*, 144(2), 187–192.
- Abraham, L., Roby, O., Ceresa, A., Fonzar, A., Hidalgo, V. (2022). *Sostenibilidad Vitivinícola Argentina*. Guía COVIAR.
- Alfaro, L. (2022). Crece la vitivinicultura y apuestan a una ruta turística. *Diario El Tribuno de Jujuy*, San Salvador, provincia de Jujuy.
- Almeida, P., Barbosa, R., Zalar, P., Imanishi, Y., Shimizu, K., Turchetti, B., Legras, J.-L., Serra, M., Dequin, S., Couloux, A., Guy, J., Bensasson, D., Gonçalves, P., & Sampaio, J. P. (2015). A population genomics insight into the Mediterranean origins of wine yeast domestication. *Molecular Ecology*, 24(21), 5412-5427.
- Alperstein, L., Gardner, J. M., Sundstrom, J. F., Sumbly, K. M., & Jiranek, V. (2020). Yeast: Which is better for innovative beverages. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 104, 1939–1953.
- Aubert, I. (2012). Disinution des intrants en œnologie. Réduire les doses de SO₂: des marges de manœuvres. *Viti: De la Vigne au Vin*, 36(383), 26-27.
- Barnett, J. A., Payne, R. W., & Yarrow, D. (2000). *Yeast: Characteristics and identification* (3rd ed.). Cambridge University Press.
- Barroso, R., Carbajal, H., Ortiz, H., Malaniuk, M., Quérol, H., Murgo, M. & Aruani, C. (2019). Vinos de altura del noroeste Argentino—Características físico-químicas y sensoriales. In *BIO Web of Conferences* (Vol. 15, p. 01002). EDP Sciences.
- Bautista-Ortín, A. B., Romero-Cascales, I., Fernández-Fernández, J. I., López-Roca, J. M., & Gómez-Plaza, E. (2007). Influence of the yeast strain on Monastrell wine colour. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(4), 322–328.
- Belda, I., Nevasquez, E., Alonso, A., Marquina, D., Santos, A. (2014). Microbiología del proceso de vinificación: Selección de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* autóctonas con óptimas propiedades enológicas. Departamento de Microbiología-III, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid.
- Belda, I., Zarraonaindia, I., Perisin, M., Palacios, A., & Acedo, A. (2017). From vineyard soil to wine fermentation: Microbiome approximations to explain the “terroir” concept. *Frontiers in Microbiology*, 8, 821.
- Berbegal, C., Ferrer, S., Polo, L., Pardo, I., García-Esparza, M. J., Andrés, L., Álvarez, I., & Lizama, V. (2023). Diversity of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains in Cabernet Sauvignon fermentations from Utiel-

- Requena region (Spain) as a resource to improve wine distinctiveness. *Fermentation*, 9(654).
- Braticevic, S. (2022). Desarrollo de la producción vitivinícola en Jujuy, Argentina. Promoción de la “ruta del vino” de extrema altura y viñedos de los valles templados. *Geofronter, Campo Grade*, 8, 1- 21.
- Caridi, A., Cufari, A., Lovino, R., Palumbo, R., & Tedesco, I. (2004). Influence of yeast on polyphenols composition of wine. *Food Technology & Biotechnology*, 42(1), 37–40.
- Casassa, F. (2007). Caracterización cromática de algunos vinos tintos argentinos de la cosecha. Mendoza, Argentina.
- Bokulich, N. A., Collins, T. S., Masarweh, C., Allen, G., Heymann, H., Ebeler, S. E., & Mills, D. A. (2016). Associations among wine grape microbiome, metabolome, and fermentation behavior suggest microbial contribution to regional wine characteristics. *MBio, - American Society for Microbiology*, 7(3), 10-1128.
- Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(2), 67-87.
- Bruner, J. & Fox, G. (2020). Novel Non-Cerevisiae *Saccharomyces* Yeast Species Used in Beer and Alcoholic Beverage Fermentations. *Fermentation*, 6(1), 116.
- Buitrago, L. (2000). *El clima de la provincia de Jujuy* (2nd ed.). Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Jujuy.
- Burgos, C. R., Ortega, A. M. A., Rodríguez, C. I., & Agüero, A. A. (2019). Selección de levaduras enológicas no-*Saccharomyces* nativas de viñedos de la localidad de Humahuaca, Jujuy. *Revista Agraria*, 12(19). Facultad de Ciencias Agrarias.
- Cadez, N., Bellora, N., Ulloa, R., Hittinger, C. T., & Libkind, D. (2019). Genomic content of a novel yeast species *Hanseniaspora gamundiae* sp. nov. from fungal stromata (Cyttaria) associated with a unique fermented beverage in Andean Patagonia, Argentina. *PLoS One*, 14(1), e0210792.
- Capece, A., Romaniello, R., Siesto, G., Pietrafesa, R., Massari, C., Poeta, C., & Romano, P. (2010). Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for Nero d'Avola wine and evaluation of selected starter implantation in pilot fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 187-192.
- Capece, A., Romaniello, R., Siesto, G., & Romano, P. (2012). Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts associated to spontaneously fermenting grapes from an Italian “heroic vine-growing area.” *Food Microbiology*, 31, 159-166.

- Capece, A., Romaniello, R., Pietrafesa, R., & Romano, P. (2014). Indigenous *Saccharomyces cerevisiae* yeasts as a source of biodiversity for the selection of starters for specific fermentations. *BIO Web of Conferences*, 3, 1-9.
- Carmona Torres, H. (2020). Jujuy tiene el segundo viñedo más alto del mundo y una cava en una mina a 4.000 m. <https://enolife.com.ar/es/jujuy-tiene-el-segundo-vinedo-mas-alto-del-mundo-y-una-cava-en-una-mina-a-4-000-m/>
- Catania, C., Avagnina, S. (2010). Los vinos varietales y espumantes. En *La interpretación sensorial del vino* (pp. 230-239). Caviar Bleu (Ed): Mendoza, Argentina. 230-249.
- Capozzi, V., Berbegala, C., Tufariello, M., Grieco, F., Spano, G., & Grieco, F. (2019). Impact of co-inoculation of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, and *Oenococcus oeni* autochthonous strains in controlled multi-starter grape must fermentations. *LWT - Food Science and Technology*, 109, 241–249.
- Cesari, C. (2015). Caracterización morfológica y molecular de aislamientos de *Botryosphaeriaceae* de Argentina y estudios de tolerancia de *Vitis spp.* frente a su ataque. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Cuyo- Mendoza.
- Chen, Y., Jiang, J., Song, Y., Zang, X., Wang, G., Pei, Y., Song, Y., Qin, Y., & Liu, Y. (2022). Yeast diversity during spontaneous fermentations and oenological characterisation of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* for potential as wine starter cultures. *Microorganisms*, 10(8), 1455.
- Chen, Y., Lei, X., Jiang, J., Qin, Y., Jiang, L., & Liu, Y. (2023). Microbial diversity on grape epidermis and wine volatile aroma in spontaneous fermentation comprehensively driven by geography, subregion, and variety. *International Journal of Food Microbiology*, 404, 110315.
- Ciani, M., Canonico, L., Oro, L., & Comitini, F. (2020). Footprint of nonconventional yeasts and their contribution in alcoholic fermentations. In *Biotechnological progress and beverage consumption*. Academic Press. 435-465
- Ciani, M., & Comitini, F. (2019). Yeast ecology of wine production. En *Yeast: Molecular and Applied Biology* (pp. 1–42). Springer.
- Clavijo, A., Calderón, I. L., & Paneque, P. (2010). Diversity of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts in three red grape varieties cultured in the Serranía de Ronda (Spain) vine-growing region. *International Journal of Food Microbiology*, 143(3), 241-245.
- Código Alimentario Argentino (CAA). (2024). Capítulo VIII, Artículo 1098. <https://www.argentina.gob.ar/anmat/codigoalimentario>
- Comitini, F., Gobbi, M., & Domizio, P. (2011). Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multi-starter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*, 28(6), 873–882.
- Conacher, C. G., Rossouw, D., & Bauer, F. F. (2019). Peer pressure: Evolutionary responses to biotic pressures in wine yeasts. *FEMS Yeast Research*, 19, foz072.

- Corona, O., Bambina, P., De Filippi, D., & Cinquanta, L. (2021). Influence of pre-fermentative addition of aqueous solution tannins extracted from oak wood (*Quercus petraea*) on the composition of Grillo wines. *European Food Research and Technology*, 247(7), 1595-1608.
- Di Gianvito, P., Vasileios, E., Kalliopi, R., & Luca, C. (2022). Bioprotection strategies in winemaking. *International Journal of Food Microbiology*, 364, 109532.
- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tolaba, M., & Robledo, C. (2017). *InfoStat versión 2017*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Recuperado de <http://www.infostat.com.ar>
- Duan, S., Han, P.-J., Wang, Q.-M., Liu, W.-Q., Shi, J.-Y., Li, K., Zhang, X.-L., & Bai, F.-Y. (2018). The origin and adaptive evolution of domesticated populations of yeast from Far East Asia. *Nature Communications*, 9, 2690.
- Durcanská, K., Muchová, L., Drtiřlová, T., Olejníková, P., Zenisová, K., & Furdíková, K. (2019). Characterization and selection of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from traditional and newly-bred vine varieties of Czech Republic and Slovakia. *Journal of Food and Nutrition Research*, 58(1), 9–20.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., & Querol, A. (2000). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 329–337.
- Fernández Espinar, M. T., Martorell, P., De Llanos, R., & Querol, A. (2006). Molecular methods to identify and characterize yeasts in foods and beverages. En A. Querol & G. Fleet (Eds.), *The Yeast Handbook Volume 2: Yeasts in Food and Beverages* (pp. 55–82). Springer-Verlag.
- Fleet, G., & Heard, G. (1993). Yeast: Growth during fermentation. En G. H. Fleet (Ed.), *Wine microbiology and biotechnology* (pp. 27-54). Harwood Academic Publishers.
- Fleet, G. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 11–22.
- Fleet, G. H. (2008). Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Research*, 8, 979–995.
- Fleet, G. H. (2011). Yeast spoilage of foods and beverages. In *The yeasts* (pp. 53-63). Elsevier.
- Gallone, B., Stensells, J., Prah, T., Soriaga, L., Saels, V., Herrera-Malaver, B., Merlevede, A., Roncoroni, M., Voordeckers, K., Miraglia, L., Teiling, C., Steffy, B., Taylor, M., Schwartz, A., Richardson, T., White, C., Baele, G., Maere, S., & Verstrepen, J. (2016). Domestication and divergence of *Saccharomyces cerevisiae* beer yeasts. *Cell*, 166(6), 1397–1410.
- Gallone, B., Mertens, S., Gordon, J. L., Maere, S., Verstrepen, K. J., & Steensels, J. (2018). Origins, evolution, domestication and diversity of *Saccharomyces* beer yeasts. *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 148–155.

- Garofalo, C., Russo, P., Beneduce, L., Massa, S., Spano, G., & Capozzi, V. (2016). Non-*Saccharomyces* biodiversity in wine and the 'microbial terroir': A survey on Nero di Troia wine from the Apulian region, Italy. *Annals of microbiology*, 66, 143-150.
- Garofalo, C., Berbegal, C., Grieco, F., Tufariello, M., Spano, G., & Capozzi, V. (2018). Selection of indigenous yeast strains for the production of sparkling wines from native Apulian grape varieties. *International Journal of Food Microbiology*, 285, 7–17.
- Giacosa, S., Río Segade, S., Cagnasso, E., Caudana, A., Rolle, L., & Gerbi, V. (2019). SO₂ in wines: Rational use and possible alternatives. En A. Morata (Ed.), *Red Wine Technology* (pp. 309–321). Academic Press.
- Goddard, M. R., & Greig, D. (2015). *Saccharomyces cerevisiae*: a nomadic yeast with no niche?. *FEMS Yeast Research*, 15(3), fov009.
- González, M. L., Sturm, M. E., Lerena, M. C., Rojo, M. C., Chimenó, S. V., Combina, M., & Mercado, L. A. (2020). Persistence and reservoirs of *Saccharomyces cerevisiae* biodiversity in different vineyard niches. *Food microbiology*, 86, 103328.
- Guerrero, R. F., & Cantos-Villar, E. (2015). Demonstrating the efficiency of sulfur dioxide replacements in wine: A parameter review. *Trends in Food Science & Technology*, 42(1), 27–43.
- Hernández, L. F., Espinosa, J. C., Fernández-González, M., & Briones, A. (2003). β-Glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *International Journal of Food Microbiology*, 80, 171–176.
- Hidalgo Tógores, J. (2003). *Tratado de enología* (Vol. 1). Mundi Prensa, Madrid.
- Hoffman, C. S., & Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, 57, 267–272.
- Homma, T., Iwahashi, H., & Komatsu, Y. (2003). Yeast gene expression during growth at low temperature. *Cryobiology*, 46(3), 230–237.
- Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV). (2015). *Resolución 39/2015*. Consulta: https://pinot.inv.gov.ar/web_inv/pdf/ResolucionesC/2015/ResolucionC39-2015.pdf
- Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV). (2018). *Regiones vitivinícolas argentinas noroeste (Provincias: La Rioja, Salta, Catamarca, Tucumán y Jujuy)*. Consulta: https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/region_noroeste_18.pdf
- Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV). (2022). *Anuario estadístico de la vid y el vino*. Consulta: <https://www.argentina.gob.ar/buscar/estadisticas> (consulta 09/01/2024)

- Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV). (2023). Informe anual de superficie. Consulta: <https://www.argentina.gob.ar/inv/vinos/estadisticas/superficie/anuarios>
- Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV). (2024). *Informe anual de cosecha y elaboración*. Consulta: <https://www.argentina.gob.ar/inv/estadisticas-vitivincolas/cosecha/anuarios>
- Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV). (2024) Resolución 46/2024_RESOL-2024-46-APNINV#MEC. <https://www.boletinoficial.gob.ar/detalleAviso/primera/314555/20240925>
- Jiranek, V., Langridge, P., & Heschke, P. A. (1995). Validation of bismuth-containing indicator media for predicting H₂S-producing potential of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts under enological conditions. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46(2), 269–273.
- Jolly, N. P., Varela, C., & Pretorius, I. S. (2014). Not your ordinary yeast: Non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Research*, 14, 215–237.
- Johnston, J. R., Baccari, C., & Mortimer, R. K. (2000). Genotypic characterization of strains of commercial wine yeasts by tetrad analysis. *Research in Microbiology*, 151(7), 583–590.
- Kasavi, C., Eraslan, S., Arga, K. Y., Oner, E. T., & Kirdar, B. (2014). A system-based network approach to ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Systems Biology*, 8, 90.
- Kurtzman, C. P., & Robnett, C. J. (1998). Identification and phylogeny of Ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 73, 331–371.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., & Boekhout, T. (2011). *The yeasts: A taxonomic study* (5th ed.). Elsevier.
- Legras, J. L., & Karst, F. (2003). Optimisation of interdelta for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterization. *FEMS Microbiology Letters*, 221, 249–255.
- Li, R., Lin, M., Guo, S., Yang, S., Han, X., Ren, M., Song, Y., Du, L., You, Y., Zhan, J., & Huang, W. (2021). A fundamental landscape of fungal biogeographical patterns across the main Chinese wine-producing regions and the dominating shaping factors. *Food Research International*, 150, 110736.
- Lopes, C., Lavalle, T., Querol, A., & Caballero, A. (2005). Combined use of killer biotype and mtDNA-RFLP patterns in a Patagonian wine *Saccharomyces cerevisiae* diversity study. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 89, 147–156.
- Madden, A. A., Epps, M. J., Fukami, T., Irwin, R. E., Sheppard, J., Sorger, D. M., & Dunn, R. R. (2018). The ecology of insect-yeast relationships and its relevance to human industry. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1875), 20172733.

- Mas, A., Torija, M.J., Beltran, G., Novo, M., Hierro, N., Poblet, M... y Guillamón, J. (2006). Selección de levaduras. *Tecnología del vino*, (2), 39-44.
- Mas, A., Padilla, B., Esteve-Zarzoso, B., et al. (2016). Taking advantage of natural biodiversity for wine making: The WILDWINE project. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 8, 4–9.
- Mestre Furlani, M., Maturano, Y., Combina, M., Mercado, L., Toro, M., & Vázquez, F. (2017). Selection of non-*Saccharomyces* yeasts to be used in grape musts with high alcoholic potential: A strategy to obtain wines with reduced ethanol content. *FEMS Yeast Research*, 17 17(2), fox010.
- Massera, A., Assof, M., Sturm, M. E., Sari, S., Jofré, V., Cordero-Otero, R., & Combina, M. (2012). Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains to ferment red musts at low temperature. *Annals of microbiology*, 62, 367-380.
- Mercado, L., Combina, M. (2010). Exploring the biodiversity of a wine region: *Saccharomyces* yeasts associated with wineries and vineyards. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. (2) 1042 – 105.
- Mercado, L., Sturm, M. E., Rojo, M. C., Ciklic, I., Martínez, C., & Combina, M. (2011). Biodiversity of *Saccharomyces cerevisiae* populations in Malbec vineyards from the "Zona Alta Del Río Mendoza" region in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 151, 319–326.
- Minnaar, P. P., du Plessis, H. W., Paulsen, V., Ntushelo, N., Jolly, N. P., & du Toit, M. (2017). *Saccharomyces cerevisiae*, non-*Saccharomyces* yeasts, and lactic acid bacteria in sequential fermentations: Effect on phenolics and sensory attributes of South African Syrah wines. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 38, 237–244.
- Molinet, J., & Cubillos, F. A. (2020). Wild yeast for the future: Exploring the use of wild strains for wine and beer fermentation. *Frontiers in Genetics*, 11, 589350.
- Montalvetti, M. (2005). El vino y las bodegas en Jujuy. En: *Una larga historia, Jujuy, su gente* (pp. 307–326). Editorial Milor.
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M. C., Colomo, B., & Suárez, J. A. (2005). Cell wall anthocyanin adsorption by different *Saccharomyces* strains during the fermentation of *Vitis vinifera* L. cv Graciano grapes. *European Food Research and Technology*, 220, 341-346.
- Morgan, C. A., Herman, N., White, P. A., & Vesey, G. (2006). Preservation of microorganisms by drying: A review. *Journal of Microbiological Methods*, 66(2), 183–193.
- Morgan, H. H., du Toit, M., & Setati, M. E. (2017). The grapevine and wine microbiome: Insights from high-throughput amplicon sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 8, 820.

- Nazrala, J. J. B., Paladino, S. C., Vila, H. F., & Lucero, C. C. (2009). *Manual de técnicas analíticas para mostos y vinos*. Ediciones INTA. ISBN 978-987-1623-41-9.
- Nikolaou, E., Soufleros, E. H., Bouloumpasi, E., & Tzanetakis, N. (2004). Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains according to their oenological characteristics and vinification results. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 205–211.
- Ortega, A. M. A., Huarachi, S., Rodríguez, C., Bitancor, M., Torres, A., & Castro, C. (2017). Aislamiento de levaduras autóctonas de diferentes variedades de uvas usadas en bodegas artesanales de la Quebrada de Humahuaca, Jujuy. *XVI Congreso CYTAL, Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. ISBN 978-987-22165-8-0.
- Organización Internacional de la Viña y el Vino (O.I.V.). (2014). Compendium of international methods of spirituous beverages of vitivinicultural. Consulta: <http://www.oiv.int/public/medias/2628/compendium-bs-2014-en-file-completpdfpdf.pdf>
- Pacheco, A. R., Osborne, M. L., & Segrè, D. (2021). Non-additive microbial community responses to environmental complexity. *Nature Communications*, 12, 2365.
- Papadopoulou, E., Fotios, B., Sotirios, V., Afroditi, K., Theodora, R., Aristidis, S. V., Demetrios, K., & Dimitrios, G. K. (2023). Vineyard-mediated factors are still operative in spontaneous and commercial fermentations shaping the vinification microbial community and affecting the antioxidant and anticancer properties of wines. *Food Research International*, 173, 113359.
- Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A. S., & Hatziloukas, E. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiology*, 6(1), 1–31.
- Peres, S., Raineau, Y., Tempere, S., Pons, A., & Giraud-Heraud, E. (2018). Vins bio, vins sans sulfites ajoutés, vins nature: Quelles demandes réelles des consommateurs? *Revue Droit et Patrimoine*, 281.
- Pallmann, C., Brown, J. A., Olineka, T. L., Cocolin, L., Mills, D., & Bisson, L. (2001). Use of WL medium to profile native flora fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 198–203.
- Pandolfi, C. (2000). El Malbec en cifras. Una realidad para reflexionar. *Jornadas Encuentro con el Malbec 2000*. Estación Experimental Agropecuaria Mendoza, INTA, 6 y 7 de abril. Mendoza, Argentina.
- Pérez, A., Rodríguez, B., Gómez, C. (2023). El impacto de las técnicas moleculares en la biotecnología enológica. *Revista de Biotecnología y Vino*, 35(4), 123-135.
- Pérez-Torrado, R., Barrio, E., & Querol, A. (2018). Alternative yeasts for winemaking: *Saccharomyces non-cerevisiae* and its hybrids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58, 1780–1790.

- Picazo, C., Garrigós, V., Matallana, E., Aranda, A. (2021). Levaduras genéticamente modificadas en la biotecnología del vino. *IntechAbierto*.
- Portillo, M. del C., Franquès, J., Araque, I., Reguant, C., & Bordons, A. (2016). Bacterial diversity of Grenache and Carignan grape surface from different vineyards at Priorat wine region (Catalonia, Spain). *International Journal of Food Microbiology*, 219, 56–63.
- Pozo-Bayón, M. Á., Hernández, M. T., Martín-Álvarez, P. J., & Polo, M. C. (2003). Study of low molecular weight phenolic compounds during the aging of sparkling wines manufactured with red and white grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2089.
- Pretorius, I. S. (2000). Tailoring Wine Yeast for the New Millennium: Novel Approaches to the Ancient Art of Winemaking. *Yeast*, 15, 675-629.
- Pretorius, I. S. (2020). Tasting the terroir of wine yeast innovation. *FEMS Yeast Research*, 20(1), foz084.
- Querol, A., Fernández-Espinar, M. T., del Olmo, M. L., & Barrio, E. (2003). Adaptive evolution of wine yeast. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1-2), 3-10.
- Querol, A., Pérez-Torrado, R., Alonso-del-Real, J., Minebois, R., Stribny, J., Oliveira, B. M., & Barrio, E. (2018). New trends in the uses of yeasts in oenology. *Advances in food and nutrition research*, 85, 177-210.
- Rainieri, S., & Pretorius, I. S. (2000). Selection and improvement of wine yeasts. *Annales de Microbiologie*, 50, 15–31.
- Regodón Mateos, J. (2004). Obtención y caracterización de cepas autóctonas de levaduras para la elaboración estandarizada de vinos de calidad. *Universidad de Extremadura*. p, 20-26.
- Riberéau Gayon, P. (1998). *Tratado de enología. Tomo 1 Microbiología del vino. Vinificaciones*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España.
- Ribéreau-Gayon, P., et al. (2003). *Tratado de enología. Tomo 1 Microbiología del vino. Vinificaciones*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. pp 655.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2006). *Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications* (Vols. 1-2, 2nd ed.). John Wiley & Sons.
- Ribéreau-Gayón, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2008). *Tratado de Enología. Química del vino. Estabilización y tratamientos* (1st ed.). Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina.
- Rodríguez Alonso, A. (2021). *Selección de levaduras autóctonas para su uso como cultivos iniciadores en bebidas fermentadas*. Tesis Doctoral. Universidad de Vigo, Escola Internacional de Doutoramento. <https://drive.google.com/file/d/1e9SFHIXosgyYN8Ps0c1CLVjneke5elmS/view?usp=sharing>

- Rodríguez Vázquez, F. (2011). Los procesos de cambio técnico en la viticultura de Mendoza, Argentina: de la imitación extranjera a la adaptación local, 1890-1920. *Naveg@américa. Revista electrónica de la Asociación Española de Americanistas*. <https://revistas.um.es/navegamerica/article/view/138611>
- Roudil, L., Russo, P., Berbegal, C., Albertin, W., Spano, G., & Capozzi, V. (2020). Non-*Saccharomyces* commercial starter cultures: Scientific trends, recent patents and innovation in the wine sector. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 11(1), 27-39.
- Roullier-Gallet, C., Hemmler, D., Gonsior, M., Li, Y., Nikolantonaki, M., Aron, A., Coelho, C., Gougeon, R. D., & Schmitt-Kopplin, P. (2017). Sulfites and the wine metabolome. *Food Chemistry*, 237, 106–113.
- Salinas, F., Mandaković, D., Urzua, U., Massera, A., Miras, S., Combina, M., Ganga, M. A., & Martínez, C. (2010). Genomic and phenotypic comparison between similar wine yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae* from different geographic origins. *Journal of Applied Microbiology*, 108(5), 1850-1858.
- Santamaría, P., Garijo, P., Tenorio, C., López, R., Gutiérrez, A. *Presencia de levaduras autóctonas en bodegas que practican la inoculación reiterada con levaduras secas activas*. http://www.oiv2007.hu/documents/viniculture/130_comunicacion_pilar_santamar_a.pdf
- Shi, D., Wang, C., & Wang, K. (2009). Genome shuffling to improve thermotolerance, ethanol tolerance and ethanol productivity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36, 139-147.
- Simonin, S., Alexandre, H., Nikolantonaki, M., Coelho, C., & Tourdot-Marechal, R. (2018). Inoculation of *Torulasporea delbrueckii* as a bio-protection agent in winemaking. *Food Research International*, 107, 451–461.
- Simonin, S., Roullier-Gallet, C., Ballester, J., Schmitt-Kopplin, P., Quintanilla-Casas, B., Vichi, S., Peyron, D., Alexandre, H., & Tourdot-Marechal, R. (2020). Bio-Protection as an alternative to sulphites: Impact on chemical and microbial characteristics of red wines. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1308.
- Sipiczki, M. (2006). Metschnikowia strains isolated from botrytized grapes antagonize fungal and bacterial growth by iron depletion. *Applied and environmental microbiology*, 72(10), 6716-6724.
- Stefanini, I., Dapporto, I., Berná, I., Polsinelli, M., Turillazzi, S., & Cavalieri, D. (2016). Social wasps are a *Saccharomyces* mating nest. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113, 2247-2251.
- Strauss, M., Jolly, N., Lambrechts, M., & van Rensburg, P. (2001). Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 182–190.
- Suárez-Lepe, J. A., & Íñigo Leal, B. (2004). *Microbiología Enológica, Fundamentos de Vinificación* (3rd ed.). Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. 716 p.

- Suárez-Lepe, J. A. (2007). Control Biológico en la fermentación de vinos tintos. *Jornada técnica dedicada a analizar el crecimiento y reproducción de levaduras en vinos tintos y a la actividad fermentativa simultánea*. Monforte, Galicia.
- Suárez-Lepe, J. A., & Morata, A. (2012). New trends in yeast selection for winemaking. *Trends in Food Science & Technology*, 23, 39-50.
- Suranská, H., Vránová, D., & Omelková, J. (2016). Isolation, identification and characterization of regional indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 181–190.
- Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. A., & Pretorius, I. S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 139–173.
- Swiegers, J. H., & Pretorius, I. S. (2007). Modulation of volatile sulfur compounds by wine yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 954–960.
- Tesnière, C., Brice, C., & Blondin, B. (2015). Responses of *Saccharomyces cerevisiae* to nitrogen starvation in wine alcoholic fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 7025-7034.
- Torija Martínez, M. (2002). *Ecología de levaduras: selección y adaptación a fermentaciones vínicas*. Tesis Doctoral. Tarragona, España, Departamento de Bioquímica y Biotecnología, Facultat D'enologia, Universitat Rovira I Virgili, pp. 7-8-206.
- Tufariello, M., Maiorano, G., Rampino, P., Spano, G., Grieco, F., Perrotta, C., & Capozzi, V. (2019). Selection of an autochthonous yeast starter culture for industrial production of Primitivo “Gioia del Colle” PDO/DOC in Apulia (Southern Italy). *LWT - Food Science and Technology*, 99, 188-196.
- Tristezza, M., Vetrano, C., Bleve, G., Grieco, F., Tufariello, M., Quarta, A., Mita, G., Spano, G., & Grieco, F. (2012). Autochthonous fermentation starters for the industrial production of Negroamaro wines. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 39, 81–92.
- Vallone, R., Visich, M., Cavagnaro, M., & Pappalardo, C. (2024). *Caracterización edafológica de las regiones vitivinícolas de la Argentina. Provincia de Jujuy*. COVIAR. Mendoza, Argentina.
- Varela, C., Pizarro, F., & Agosin, E. (2004). Biomass content governs fermentation rate in nitrogen-deficient wine musts. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 3392–3400.
- Vaudano, E., Quintero, G., Costantini, A., Pulcini, L., Pessione, E., & Garcia-Moruno, E. (2019). Yeast distribution in Grignolino grapes growing in a new vineyard in Piedmont and the technological characterization of indigenous *Saccharomyces* spp. strains. *International Journal of Food Microbiology*, 289, 154-161.
- Vicente, J., Ruiz, J., Tomasi, S., Celis, M., Zamora, F., Santos, A., Marquina, D., Belda, I. (2023). Impact of rare yeasts in *Saccharomyces cerevisiae* wine

fermentation performance: Population prevalence and growth phenotype of *Saccharomyces*. *Food Microbiology*, 110, 104-181.

Vigentini, I., Maghradze, D., Petrozziello, M., Bonello, F., Mezzapelle, V., Valdetara, F., et al. (2016). Indigenous Georgian wine-associated yeasts and grape cultivars to edit the wine quality in a precision oenology perspective. *Frontiers in Microbiology*, 7, 352.

Vila, H. (2002). Efecto del tiempo de maceración sobre el color, la composición tánica y la astringencia de vinos Cabernet Sauvignon y Malbec. Mendoza, Argentina.

Walker, G. A., Nelson, J., Halligan, T., Lima, M. M., Knoesen, A., & Runnebaum, R. C. (2021). Monitoring site-specific fermentation outcomes via oxidation reduction potential and uv-vis spectroscopy to characterize "hidden" parameters of pinot noir wine fermentations. *Molecules*, 26(16), 4748.

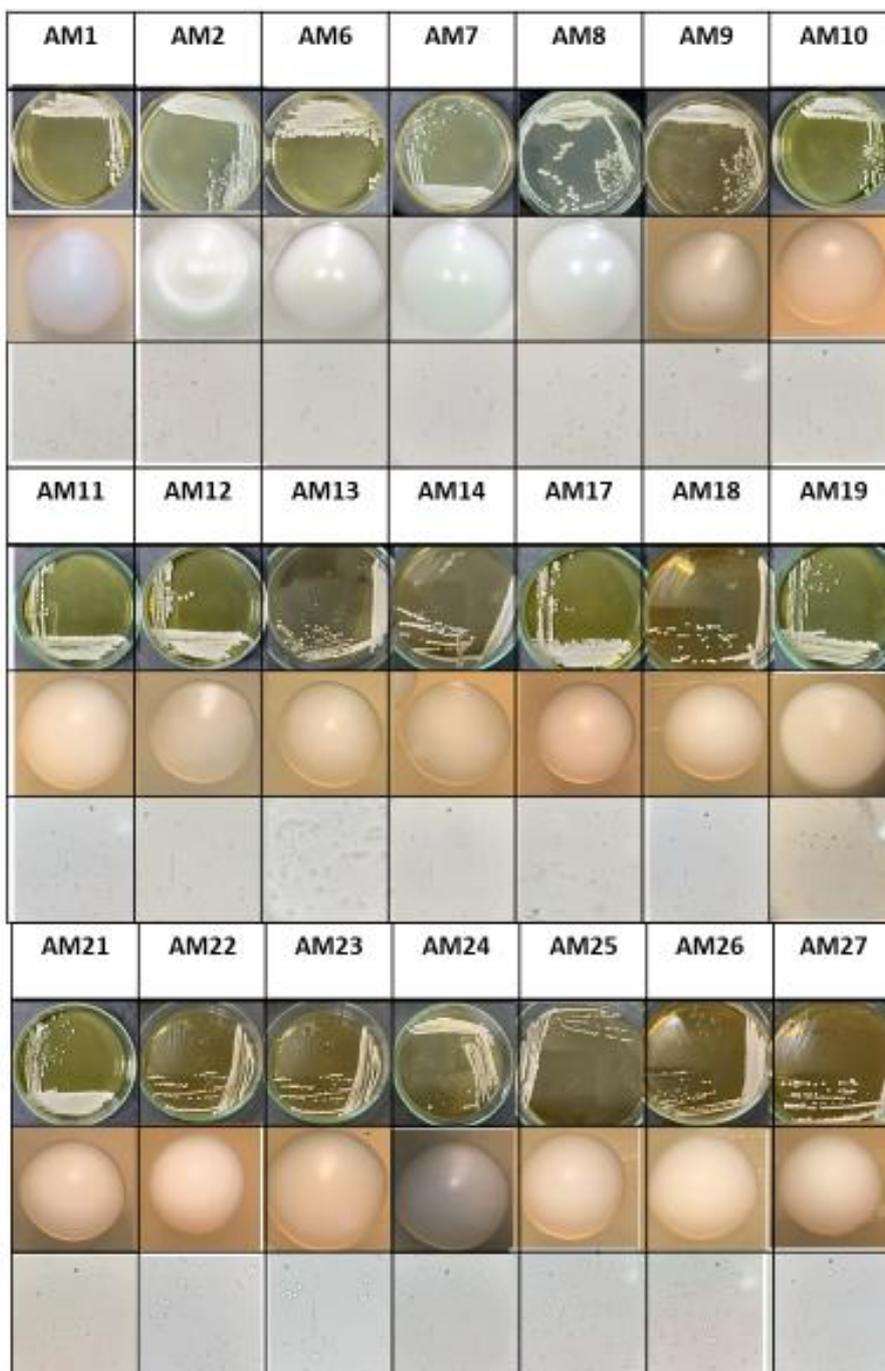
Wang, C., Mas, A., & Esteve-Zarzoso, B. (2015). Interaction between *Hanseniaspora uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 206, 67-74.

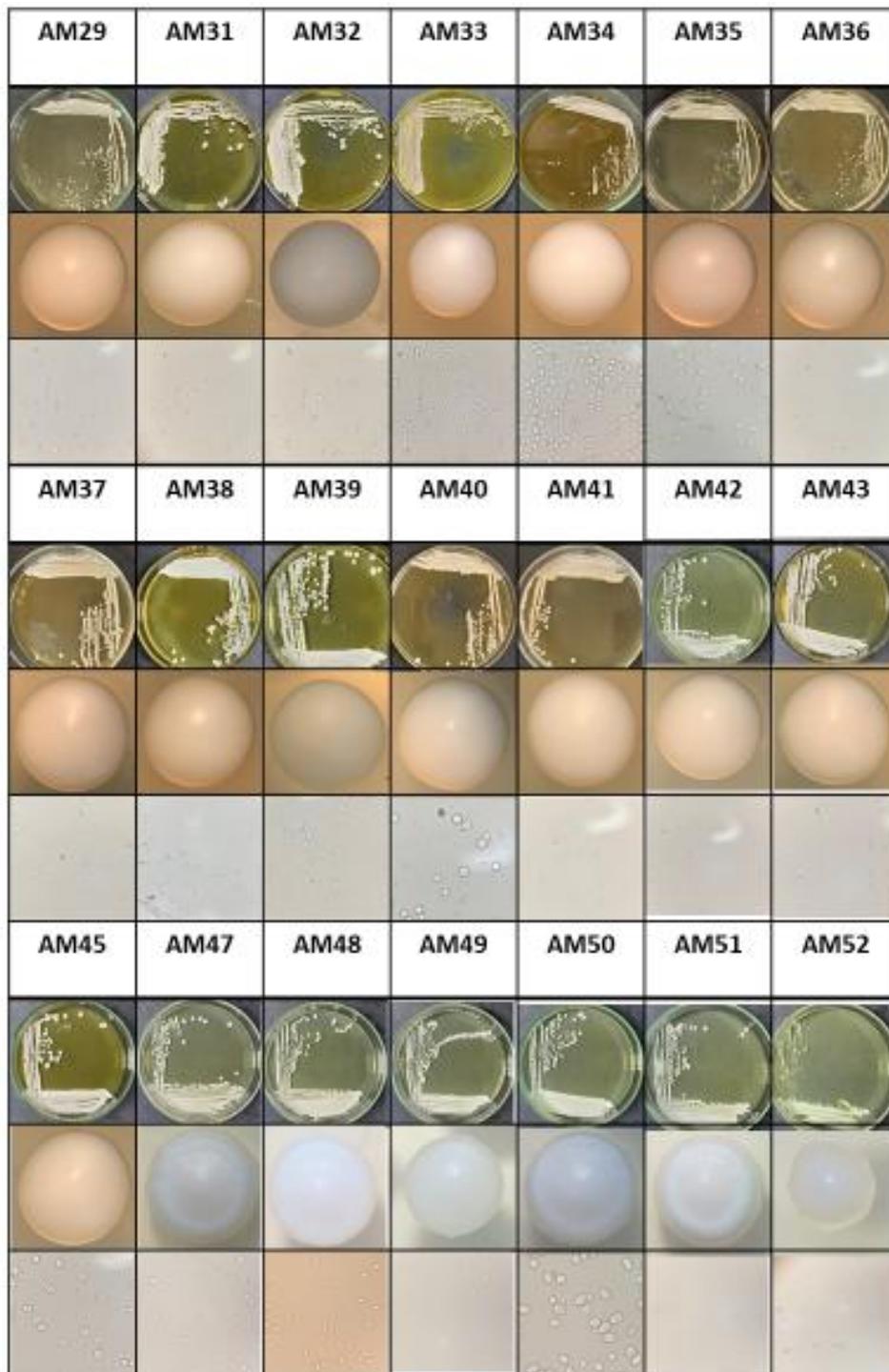
Wei, R. T., Chen, N., Ding, Y. T., Wang, L., Liu, Y. H., Gao, F. F., Zhang, L., Li, H., & Wang, H. (2022). Correlations between microbiota with physicochemical properties and volatile compounds during the spontaneous fermentation of Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) wine. *LWT - Food Science and Technology*, 163, 113529.3

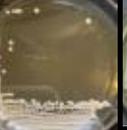
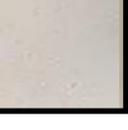
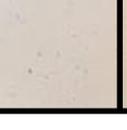
Windholtz, S., Dutilh, L., Lucas, M., Maupeu, J., Vallet-Courbin, A., Farris, L., Coulon, J., & Masneuf-Pomarède, I. (2021). Population dynamics and yeast diversity in early winemaking stages without sulfites revealed by three complementary approaches. *Applied Sciences*, 11(6), 2494.

World Health Organization. (2022). Evaluation of certain food additives and contaminants: ninety-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. World Health Organization.

Anexo I. Morfología macroscópica y microscópica de las levaduras autóctonas aisladas





AM53	AM54	AM55	AM56	AM57	AM58	AM59
						
						
						
AM60	AM61	AM62	AM63	AM64	AM65	AM66
						
						
						
AM28						
						
						
						

Anexo II. Caracterización morfológica de las levaduras autóctonas aisladas (macroscópica y microscópicas) y diferenciación en agar lisina.

Origen	Levaduras	Morfología macroscópica						Morfología microscópica		Diferenciación
		Color	Altura	Borde	Textura	Forma	Tamaño (mm)	Forma	Gemación	Lisina
Finca A-Tilcara (Maimara)	AM1	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	3	ovoide	multipolar	negativo
Finca A-Tilcara (Maimara)	AM2	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	4	ovoide	multipolar	negativo
Finca A-Tilcara (Maimara)	AM6	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	3	ovoide	multipolar	negativo
Finca A-Tilcara (Maimara)	AM7	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	1	ovoide	multipolar	negativo
Finca A-Tilcara (Maimara)	AM8	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	4	ovoide	multipolar	negativo
Finca B-Tumbaya (Purmamarca)	AM9	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	4	ovoide	multipolar	negativo
Finca B-Tumbaya (Purmamarca)	AM10	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	2	ovoide	multipolar	negativo
Finca B-Tumbaya (Purmamarca)	AM11	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	2	ovoide	multipolar	negativo
Finca B-Tumbaya (Purmamarca)	AM19	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	4	ovoide	multipolar	negativo
Finca B-Tumbaya (Purmamarca)	AM41	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	3,5	ovoide	multipolar	negativo
Finca C-Tumbaya Grande	AM12	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	3	ovoide	multipolar	negativo
Finca C-Tumbaya Grande	AM13	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	2	ovoide	multipolar	negativo
Finca C-Tumbaya Grande	AM47	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	2	ovoide	multipolar	negativo
Finca C-Tumbaya Grande	AM48	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	2	ovoide	multipolar	negativo
Finca C-Tumbaya Grande	AM49	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	2	ovoide	multipolar	negativo
Finca C-Tumbaya Grande	AM50	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	4	ovoide	multipolar	negativo
Finca C-Tumbaya Grande	AM51	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	4	ovoide	multipolar	negativo
Finca D-Tilcara (El Perchel)	AM14	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	3,5	ovoide	multipolar	negativo
Finca E-Tilcara (Maimara)	AM17	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	4	ovoide	multipolar	negativo
Finca E-Tilcara (Maimara)	AM18	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	1	ovoide	multipolar	negativo
Finca E-Tilcara (Maimara)	AM52	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	1	ovoide	multipolar	negativo
Finca E-Tilcara (Maimara)	AM53	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	1,5	ovoide	multipolar	negativo
Finca E-Tilcara (Maimara)	AM54	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	1	ovoide	multipolar	negativo
Finca E-Tilcara (Maimara)	AM55	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	1,5	ovoide	multipolar	negativo
Finca E-Tilcara (Maimara)	AM56	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	1	ovoide	multipolar	negativo
Finca E-Tilcara (Maimara)	AM57	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	1	ovoide	multipolar	negativo
Finca F-Tilcara (Yacoraite)	AM21	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	1	ovoide	multipolar	negativo
Finca F-Tilcara (Yacoraite)	AM22	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	3	ovoide	multipolar	negativo
Finca F-Tilcara (Yacoraite)	AM23	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	2	ovoide	multipolar	negativo
Finca F-Tilcara (Yacoraite)	AM24	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	4,5	ovoide	multipolar	negativo
Finca F-Tilcara (Yacoraite)	AM42	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	3	ovoide	multipolar	negativo
Finca G-Tilcara	AM25	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	1	ovoide	multipolar	negativo
Finca H-Tumbaya (Purmamarca)	AM26	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	2	ovoide	multipolar	negativo
Finca H-Tumbaya (Purmamarca)	AM27	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	3	ovoide	multipolar	negativo
Finca H-Tumbaya (Purmamarca)	AM28	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	3	ovoide	multipolar	negativo
Finca H-Tumbaya (Purmamarca)	AM29	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	1,5	ovoide	multipolar	negativo
Finca I-Tilcara (Maimara)	AM31	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	2	ovoide	multipolar	negativo
Finca I-Tilcara (Maimara)	AM58	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	2	ovoide	multipolar	negativo
Finca I-Tilcara (Maimara)	AM59	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	2,5	ovoide	multipolar	negativo
Finca I-Tilcara (Maimara)	AM60	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	2	ovoide	multipolar	negativo
Finca I-Tilcara (Maimara)	AM61	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	2	ovoide	multipolar	negativo
Finca J-Tilcara (Maimara)	AM32	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	2	ovoide	multipolar	negativo
Finca J-Tilcara (Maimara)	AM62	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	3	ovoide	multipolar	negativo
Finca J-Tilcara (Maimara)	AM63	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	3	ovoide	multipolar	negativo
Finca J-Tilcara (Maimara)	AM64	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	1,5	ovoide	multipolar	negativo
Finca J-Tilcara (Maimara)	AM65	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	2	ovoide	multipolar	negativo
Finca J-Tilcara (Maimara)	AM66	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	2	ovoide	multipolar	negativo
Finca K-Tilcara	AM33	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	1,5	ovoide	multipolar	negativo
Finca K-Tilcara	AM34	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	2	ovoide	multipolar	negativo
Finca K-Tilcara	AM43	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	3	ovoide	multipolar	negativo
Finca K-Tilcara	AM45	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	3,5	ovoide	multipolar	negativo
Finca L-Tilcara (El Perchel)	AM35	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	1,5	ovoide	multipolar	negativo
Finca L-Tilcara (El Perchel)	AM36	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	2	ovoide	multipolar	negativo
Finca L-Tilcara (El Perchel)	AM37	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	4	ovoide	multipolar	negativo
Finca M-Tilcara (El Perchel)	AM38	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	1,5	ovoide	multipolar	negativo
Finca N-Humahuaca	AM39	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	3	ovoide	multipolar	negativo
Finca N-Humahuaca	AM40	Blanca	convexa	entero	cremosa	circuar	2	ovoide	multipolar	negativo