

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LEVADURAS AISLADAS DE FERMENTACIONES ESPONTÁNEAS Y DE UVAS NATIVAS DE PURMAMARCA, JUJUY, ARGENTINA

MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF ISOLATED YEASTS OF SPONTANEOUS FERMENTATIONS AND NATIVE GRAPES FROM PURMAMARCA, JUJUY, ARGENTINA

Julieta Macarena Peynado¹, Amalia María Ortega^{1*}, Celeste Ivone Rodríguez¹, Cristian Gonzalo Benitez¹, Alfredo Angel Agüero¹

¹Facultad de Ciencias Agrarias, UNJu. Alberdi 47 San Salvador de Jujuy, Jujuy, Argentina. C.P. 4600

***Autor para correspondencia:**
ortegamariadelosangeles@
hotmail.com

Licencia:
[Licencia Creative Commons](#)
[Atribución-NoComercial-](#)
[CompartirIgual 4.0 Internacional](#)

Período de Publicación:
Julio 2020

Historial:
Recibido: 02/07/2019
Aceptado: 10/04/2020

RESUMEN

El objetivo fue diferenciar y caracterizar morfológicamente levaduras aisladas de uvas y fermentaciones espontáneas. Se colectaron uvas de distintas variedades, durante la vendimia 2019, pertenecientes a dos bodegas de Purmamarca, Jujuy. Se realizaron análisis de grados Brix y microbiológicos. La diferenciación entre *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* se realizó en base a sus características morfológicas, crecimiento en agar lisina y esporulación en agar acetato. Se aislaron 20 levaduras, seis presentaron características morfológicas típicas del género *Saccharomyces*, no crecieron en agar lisina y formaron esporas típicas, con estos resultados preliminares se pudo diferenciar a estas levaduras como *Saccharomyces*. Las otras levaduras presentaron distintas morfologías, crecieron en agar lisina y una formó esporas, de acuerdo a las pruebas empleadas, estas levaduras pertenecen al grupo no-*Saccharomyces*. Las uvas registraron los grados Brix óptimos para la elaboración de vinos. Los porcentajes aislados para *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* resultaron consistentes con los obtenidos por otros autores, quienes encontraron en la uva una mayor proporción de no-*Saccharomyces*, las poblaciones de *Saccharomyces* son de (10-100 UFC/cm²) lo cual dificulta su aislamiento, siendo éstas predominantes en las bodegas. El estudio permitió obtener información preliminar sobre la biodiversidad presente en las uvas, clave en la preservación de la tipicidad y complejidad de los vinos locales.

Palabras clave: levaduras en uvas, Purmamarca, diversidad de levaduras, *Saccharomyces*, no -*Saccharomyces*.

SUMMARY

The objective was to differentiate and to morphologically characterize isolated yeasts from grapes and spontaneous fermentations. Grapes of different varieties were collected, during the 2019 grape harvest, belonging to two wineries in Purmamarca, Jujuy. Microbiological and Brix grades analysis were performed. The differentiation between *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces*, was based on its morphological characteristics,

growth in lysine agar and sporulation in acetate agar. Twenty yeasts were isolated, six presented morphological characteristics typical of the *Saccharomyces* genus, they did not grow on lysine agar and formed typical spores, with these preliminary results these yeasts could be differentiated as *Saccharomyces*. The other yeasts showed different morphologies, grew in lysine agar and one formed spores, according to the tests used, these yeasts belong to the non-*Saccharomyces* group. Grapes showed optimum Brix grades for wine making. The isolated percentages for *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* were consistent with the ones obtained by other authors, who found in grapes a higher proportion of non-*Saccharomyces*, *Saccharomyces* populations are of (10-100UFC/cm²) which diffculted its isolation, being these predominant in the cellars. The study enabled to obtain preliminary information of biodiversity present grapes, key in the preservation of typicality and complexity of local wines.

Keywords: non-*Saccharomyces*, Purmamarca, yeasts diversity, yeasts in grapes, *Saccharomyces*.

INTRODUCCIÓN

La fermentación del mosto de uva es un complejo proceso bioquímico que implica la participación de diferentes microorganismos, siendo las levaduras las principales responsables (Fleet, 2003; Swieger y otros, 2005; Jolly y otros, 2006), capaces de influir de forma decisiva sobre la calidad general del vino (Pretorius y otros, 2000) y en particular sobre sus características aromáticas relacionadas con la génesis de productos volátiles (Swiegers y otros, 2007; Maturano y otros, 2012; Alvares- Pérez y otros, 2012).

Es por esta razón que resulta imprescindible conocer la microbiota autóctona presente en la uva, ya que ésta puede ser beneficiosa o causar deterioro en la calidad del vino. La densidad de la población y biodiversidad de levaduras autóctonas en las uvas están estrechamente relacionadas con numerosos factores, entre ellos podemos mencionar 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 (Combina y otros, 2005).

Existen numerosos estudios sobre la biodiversidad de levaduras en diferentes regiones productoras de vino, en los que se muestrearon uvas y fermentaciones espontaneas, por ejemplo, en Italia, Vaudano y otros (2019) aislaron

Hanseniaspora uvarum, *Candida zemplinina*, *Pichia kluyveri*, *Candida californica*, *Curvibasidium cygneicollum*, *Meyerozyma caribbica*, *Rhodotorula babjevae*, *Metschnikowia pulcherrima* y *Cryptococcus flavescens*. En China, Liu y otros (2016) encontraron en mayor proporción especies como, *Hanseniaspora uvarum*, *Candida stella*, *Pichia fermentans*, *Issatchenkia orientalis*, *Metschnikowia pulcherrima* y *Saccharomyces cerevisiae*. En Italia, Capozzi y otros (2015) identificaron los géneros de levaduras, *Dekkera spp.*, *Pichia spp*, *Candida spp*, *Metschnikowia spp*, *Debaromyces spp*, *Kluyveromyces spp*, *Aureobasidium spp*, *Rhodotorula spp*, *Zygosaccharomyces spp*, *Issatchenkia spp*, *Saccharomyces spp*, *Zygoascus spp*, *Torulaspora spp* y *Hanseniaspora spp*, las mismas especies fueron aisladas en Argentina por Combina y otros (2005); en España por Ocón y otros (2010); en España por Clavijo y otros (2010); en Italia por Tristezza y otros (2013); en Italia por Garofalo y otros (2015).

De acuerdo a diversas publicaciones se sabe que el género *Sacharomyces* no es frecuente en las uvas frescas, según Durcanská y otros (2019) aislaron 1634 colonias de levaduras, de las cuales 231 fueron identificadas como levaduras *Saccharomyces*, esto coincide con un trabajo realizado en Italia por Garofalo y otros (2018) donde se aislaron un total de 240 colonias con características morfológicas similares a las *Saccharomyces*, de las cuales 164 se identificaron pertenecientes al género. También en Republica de Checa, Suranska y otros (2016), aislaron un total de 524 levaduras autóctonas y se

identificaron 120 como *Saccharomyces cerevisiae*. Hoy en día existe toda una industria dedicada a la búsqueda, caracterización, producción y comercialización de cultivos de levaduras seleccionadas como inóculos para procesos controlados de fermentación (Suranká y otros, 2016), existen en el mercado cientos de estas cepas, la inoculación sistemática con levaduras secas activas (LSA) que se encuentran en el comercio, es una práctica enológica comúnmente utilizada en muchas bodegas. Sin embargo, esta práctica puede determinar un efecto negativo sobre la biodiversidad de las levaduras naturales, y como consecuencia una pérdida de la tipicidad de los vinos de una región determinada (Combina y otros, 2005; Romancino y otros, 2008).

La localidad de Purmamarca, ubicada en la provincia de Jujuy, es lugar excepcional para la vitivinicultura, debido a las condiciones agroecológicas y ambientales que presenta, permiten producir vinos tintos, con alto contenido de alcohol y estabilidad de color y notas frutales, de buena calidad. Es por esto, que en los últimos años aumentaron los productores que desean incluir, dentro de sus sistemas productivos, la actividad vitivinícola para la elaboración de vinos artesanales como una alternativa socio-económica viable (Asociación de Vitivinicultores de la Quebrada de Humahuaca).

Por lo tanto en aquellas regiones que son conocidas por su vinos típicos, numerosos autores coinciden en que es más efectivo el uso de cultivos seleccionados puros de levaduras autóctonas, ya que no solo esto permitiría potenciar el carácter de los *terroirs* jujeños, sino, también controlar el proceso de fermentación, ya que estas levaduras están mejor adaptadas a la región, clima, suelo, a sus variedades de uva, a sus prácticas de viticultura y a sus técnicas de elaboración del vino (Suárez Lepe y otros, 1997; Mercado y otros, 2007; Capece y otros, 2011; Formento y otros, 2011; Capozzi y otros, 2015; Garofalo y otros, 2016; Suranká y otros, 2016).

Sin embargo, hasta la fecha no se encontraron publicaciones sobre la diversidad de levaduras presentes en uvas de los ecosistemas locales, este estudio es un primer paso hacia la preservación y el estudio del potencial de las levaduras autóctonas en Purmamarca. Por lo tanto, este estudio tiene un significado relevante para los productores vitivinícolas locales. Frente a esta situación, en el presente trabajo se diferenciaron y caracterizaron morfológicamente levaduras

aisladas de fermentaciones espontáneas y uvas nativas de la localidad de Purmamarca, Jujuy. Para que en un futuro se puedan seleccionar levaduras con características enológicas eficientes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de muestras

Las muestras se recolectaron de viñedos pertenecientes a dos bodegas de la localidad de Purmamarca, Jujuy durante la vendimia 2019. Se muestrearon en horas de la mañana racimos de uva (de aproximadamente un kilogramo) sanos y tomados al azar, de las variedades Cabernet Sauvignon, Bonarda, Malbec y Torrontés, se colocaron en bolsas de nylon y se transportaron a temperaturas de refrigeración al laboratorio de la Facultad de Ciencias Agrarias-UNJu para ser analizadas dentro de las 24 horas. Se recolectaron racimos del interior de los viñedos para eliminar efecto de bordura.

Las levaduras se aislaron en dos momentos, en el primero, del mosto producido por la molienda de los granos de uva y en el segundo, del mosto en etapa tumultuosa de la fermentación espontánea. Se midieron los grados Brix del mosto con un refractómetro óptico.

Técnicas de aislamiento y conservación de las levaduras:

Se realizaron diluciones de 10^{-1} a 10^{-6} con agua peptonada estéril. A partir de cada dilución de las muestras, se sembraron 0,1 mL en placas de Petri con medio YPD- agar y se incubaron de 3 a 7 días a 28°C, transcurridos los cuales se procedió a su aislamiento en placas con el mismo medio. A cada cultivo puro se le asignó un número y el prefijo (MP). Se procedió a su conservación (en tubos eppendorf con glicerol al 15% a -0°C). Este procedimiento permite que las levaduras permanezcan viables durante un año.

Para la conservación de las cepas durante periodo de tiempo de hasta dos semanas y para su uso inmediato, las levaduras se mantuvieron en tubo de ensayo (pico de flauta) a 4°C.

Caracterización morfológica y diferenciación de las levaduras aisladas: (Barnett, et al., 2000).

- Características morfológicas macroscópicas: las levaduras fueron aisladas en placas de Petri con agar YPD, e incubadas durante 48 hs en estufa a 28°C. Se evaluaron las siguientes características: forma de la colonia, bordes, altura, tamaño y textura.

- Características morfológicas microscópicas: se observaron al microscopio óptico mediante preparados en fresco, con objetivo de inmersión (100x) utilizando aceite de cedro. Se evaluó la pureza del cultivo y la morfología de las células: forma y tipo de gemación.

- Crecimiento sobre lisina: las levaduras se sembraron en tres medios diferentes:

- 1- Medio con lisina como fuente de nitrógeno.
- 2- Control positivo: medio basal con agregado de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno.
- 3- Control negativo: medio basal sin el agregado de ninguna fuente de nitrógeno, en este medio se puede ver el crecimiento residual de las levaduras.

Las levaduras *Saccharomyces* no son capaces de utilizar la lisina como fuente de nitrógeno; para la diferenciación de género se aplicaron los siguientes criterios: levaduras *Saccharomyces* demuestran un crecimiento positivo en el medio número 2, con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno y negativo en los medios 1 y 3; mientras que las levaduras no-*Saccharomyces* presentan crecimiento positivo en el medio número 1 y 2 y negativo en el medio número 3. Se incubaron durante 48 hs. a 28°C.

- Esporulación: las levaduras se sembraron en picos de flauta con agar estresante de acetato. Este medio es específico, para inducir la esporulación de levaduras, debido a que presenta una fuente reducida en carbono; los tubos se incubaron en estufa a 28°C. El tiempo requerido para la esporulación varía con las especies y aún con las cepas de cada levadura. Por esta razón, las levaduras sembradas se estudiaron a intervalos frecuentes y regulares. Las esporas una vez formadas pueden germinar muy bien en ese mismo medio, por lo que se realizaron observaciones periódicas del material a los 7, 14, y 21 días aplicando la técnica de tinción de esporas. La esporulación es un método para diferenciar las especies de levaduras debido a que cada una de ellas presentan formas características.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se aislaron 20 levaduras, 9 del mosto producido por la molienda de los granos de uva y 11 del mosto en etapa tumultuosa de la fermentación espontánea. Del total de levaduras aisladas, 6 (30%) presentaron características morfológicas típicas del género *Saccharomyces*: colonias blancas, mantecosas, lisas, circulares, convexas, células ovoides o elipsoidales con gemación multipolar o monopolar (Kurtzman y otros, 1998; Barnett y otros, 2000). Este resultado concuerda con los porcentajes encontrados en trabajos previos realizados por Durcanská y otros, (2019); Garofalo y otros, (2018); Suranska y otros, (2016) y Combina y otros, (2005), donde informaron que la población del género *Sacharomyces* en la superficie de la uva, es menor a la 10^2 UFC/mL, lo cual dificulta su aislamiento, siendo predominantes en el ambiente de las bodegas.

Las 14 (70%) levaduras restantes formaron colonias con otras morfologías, detalladas en la tabla 1, junto a las demás levaduras aisladas. Los porcentajes de levaduras aisladas en la uva fresca, resultan consistentes con lo reportado por diversos autores, que encontraron en el fruto una mayor proporción de levaduras del género no-*Saccharomyces* (Ocón y otros, 2010; Clavijo y otros, 2010; Tristezza y otros, 2013; Capozzi y otros, 2015; Garofalo y otros, 2015; Suranska y otros, 2016; Durcanská y otros, 2019). Por ejemplo Durcanská y otros (2019) aislaron 1634 colonias de levaduras, de las cuales 231 fueron identificadas como levaduras *Saccharomyces*, esto coincide con un trabajo realizado en República de Checa, Suranska y otros (2016), que aislaron un total de 524 levaduras autóctonas y se identificaron 120 como *Saccharomyces cerevisiae*.

Si bien en este trabajo no se realizaron recuentos de levaduras, citar los siguientes autores nos ayuda a poder explicar los porcentajes encontrados de ambos grupos de levaduras estudiados, por ejemplo, Li y otros (2010) publicaron que la carga microbiana encontrada en uvas de la región de China, fue de 10^3 - 10^5 CFU/mL, conformada principalmente por las especies no-*Saccharomyces*. En Argentina, Combina y otros (2005 a) informaron una población de levadura no-*Saccharomyces* más alta, en orden de 10^5 - 10^6 UFC/g, aislada de uvas sanas y maduras de la variedad Malbec.

Tabla 1. Características macroscópicas de las levaduras en estudio

| Levadura | | Observaciones Macroscópicas | | | | | |
|---|-----------------------|-----------------------------|-------------|-----------|-----------|-----------|--------|
| Variedad y Origen | Cepa | Color | Altura | Bordes | Textura | Forma | Tamaño |
| Torrontés - viñedo 1 DM | MP2 | Beige | Planas | Enteros | Cerosa | Circular | 6 mm |
| Torrontés - viñedo 2 DM | MP3 | Blancas | Convexas | Enteros | Cremosa | Circular | 3 mm |
| Bonarda - viñedo 1 AA | MP5 | Beige | Convexas | Enteros | Cremosa | Circular | 2 mm |
| Malbec - viñedo 2 AA | MP7 | Beige | Umbilicadas | Enteros | Mantecosa | Circular | 4 mm |
| Malbec - viñedo 3 AA | MP8 | Blancas | Convexas | Enteros | Cremosa | Circular | 2 mm |
| Cabernet - viñedo 4 AA | MP9 | Beige | Planas | Enteros | Cremosa | Circular | 4,5 mm |
| Cabernet - viñedo 5 AA | MP10 | Beige | Planas | Enteros | Cremosa | Circular | 2,5 mm |
| Bonarda - viñedo 6 AA | MP15 | Blancas | Umbilicadas | Enteros | Mantecosa | Circular | 9 mm |
| Torrontés - viñedo 3 DM | MP16 | Blancas | Planas | Ondulados | Mantecosa | Irregular | 3 mm |
| Fermentación Torrontés - viñedo 1 DM | MP17 | Blancas | Planas | Enteros | Cremosa | Circular | 4 mm |
| Fermentación Malbec - viñedo 2 AA | MP18 | Grisáceas | Umbilicadas | Enteros | Cremosa | Circular | 6 mm |
| Fermentación Bonarda - viñedo 1 AA | MP19 | Blancas | Elevadas | Ondulados | Cremosa | Irregular | 7,5 mm |
| Fermentación Cabernet - viñedo 4 AA, viñedo 3 AA, viñedo 6 AA, viñedo 2 AA, viñedo 5 AA | MP20, 21, 22, 26 y 27 | Blancas | Convexas | Enteros | Cremosa | Circular | 3-6 mm |
| Fermentación Cabernet - viñedo 5 AA | MP23 | Beige | Umbilicadas | Enteros | Cremosa | Circular | 2 mm |
| Fermentación Torrontés - viñedo 2 DM y viñedo 2 AA | MP24 y 25 | Beige | Convexas | Ondulados | Mantecosa | Irregular | 5 mm |

Tabla 2. Características microscópicas de las levaduras en estudio

| Levadura | | Observaciones Microscópicas | | |
|---|-----------------------|-----------------------------|------------|--------------|
| Variedad y Origen | Cepa | Forma | Gemación | Esporulación |
| Torrontés - viñedo 1 DM | MP2 | Ovoides | Bipolar | - |
| Torrontés -viñedo 2 DM | MP3 | Ovoides | Multipolar | - |
| Bonarda - viñedo 1 AA | MP5 | Esfericas | Monopolar | - |
| Malbec - viñedo 2 AA | MP7 | Apiculadas | Bipolar | - |
| Malbec -viñedo 3 AA | MP8 | Ovoides | Multipolar | - |
| Cabernet - viñedo 4 AA | MP9 | Apiculadas | Bipolar | - |
| Cabernet -viñedo 5 AA | MP10 | Apiculadas | Bipolar | + |
| Bonarda -viñedo 6 AA | MP15 | Elipsoides | Monopolar | - |
| Torrontés - viñedo 3 DM | MP16 | Elipsoides | Monopolar | - |
| Fermentación Torrontés - viñedo 1 DM | MP17 | Apiculadas | Bipolar | - |
| Fermentación Malbec - viñedo 2 AA | MP18 | Apiculadas | Bipolar | - |
| Fermentación Bonarda - viñedo 1 AA | MP19 | Elipsoides | Multipolar | - |
| Fermentación Cabernet - viñedo 4 AA, viñedo 3 AA, viñedo 6 AA, viñedo 2 AA, viñedo 5 AA | MP20, 21, 22, 26 y 27 | Esféricas | Multipolar | + |
| Fermentación Cabernet - viñedo 5 AA | MP23 | Apiculadas | Bipolar | - |
| Fermentación Torrontés - viñedo 2 DM y viñedo 2 AA | MP24 y 25 | Elipsoides | Monopolar | - |

En la Figura 1, Tabla 1 y 2, se observan las características morfológicas de las levaduras estudiadas.

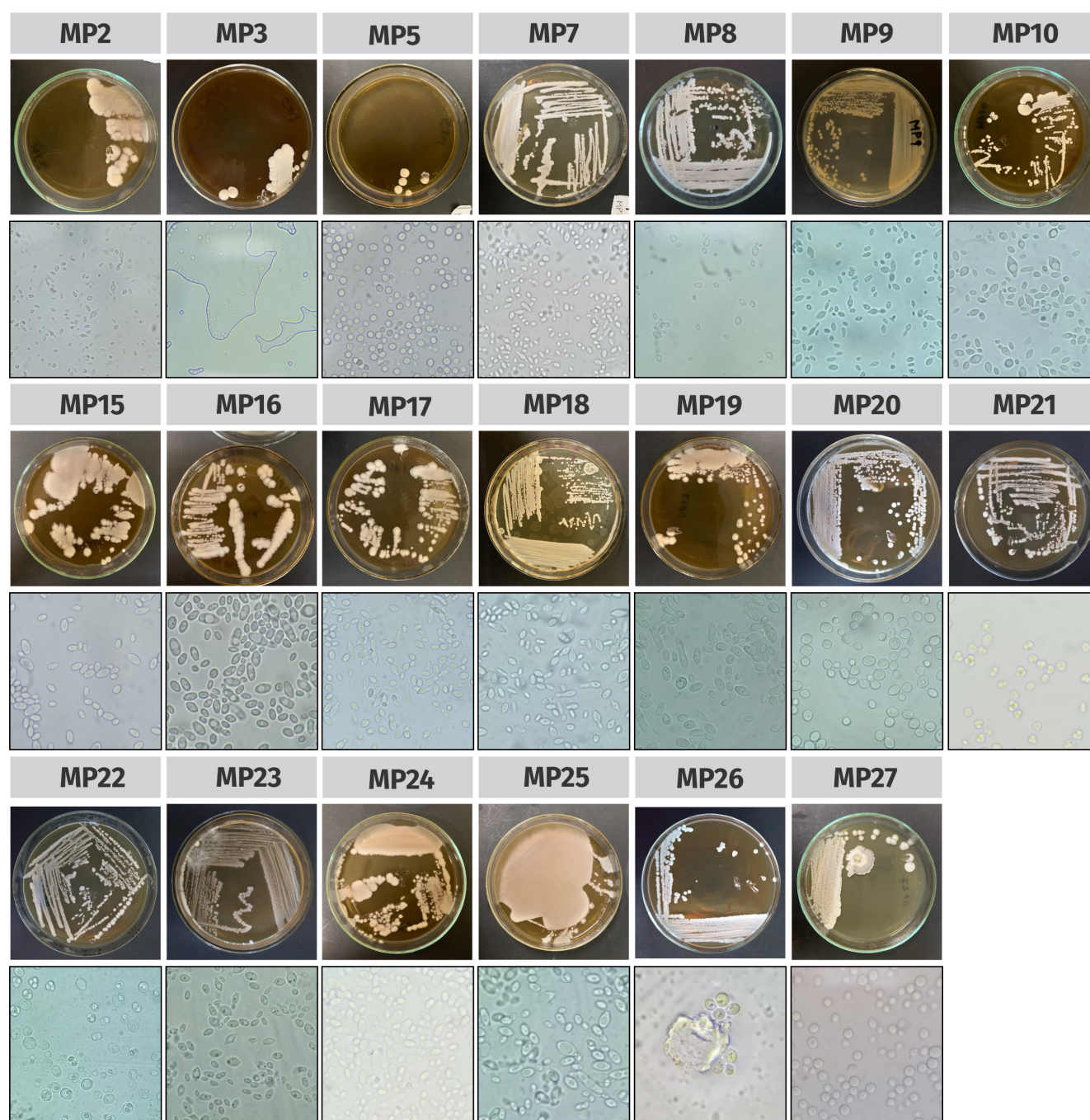


Figura 1. Morfología macroscópica y microscópica de las levaduras estudiadas

Del total de las levaduras aisladas, 6 levaduras se diferenciaron como *Saccharomyces* en agar lisina (Kurtzman y otros, 1998; Barnett y otros, 2000; Santamaría, 2007), también presentaron esporas globosas o elipsoidales, pared lisa y tétradas típicas, los resultados se pueden observar en la tabla 2 y Figura 2. Estos resultados coinciden con diversos autores (Kurtzman y otros, 1998; Barnett y otros, 2000; Esteve-Zarzoso y otros, 2000; Suarez Lepe y otros, 2004), que demostraron en sus investigaciones, que los principales agentes de la fermentación alcohólica son cepas de la especie

Saccharomyces, dado que tienen la facilidad de esporular para adaptarse a las características del mosto y poder crecer bajo esas condiciones, transformándose en la especie dominante y completando la fermentación alcohólica.

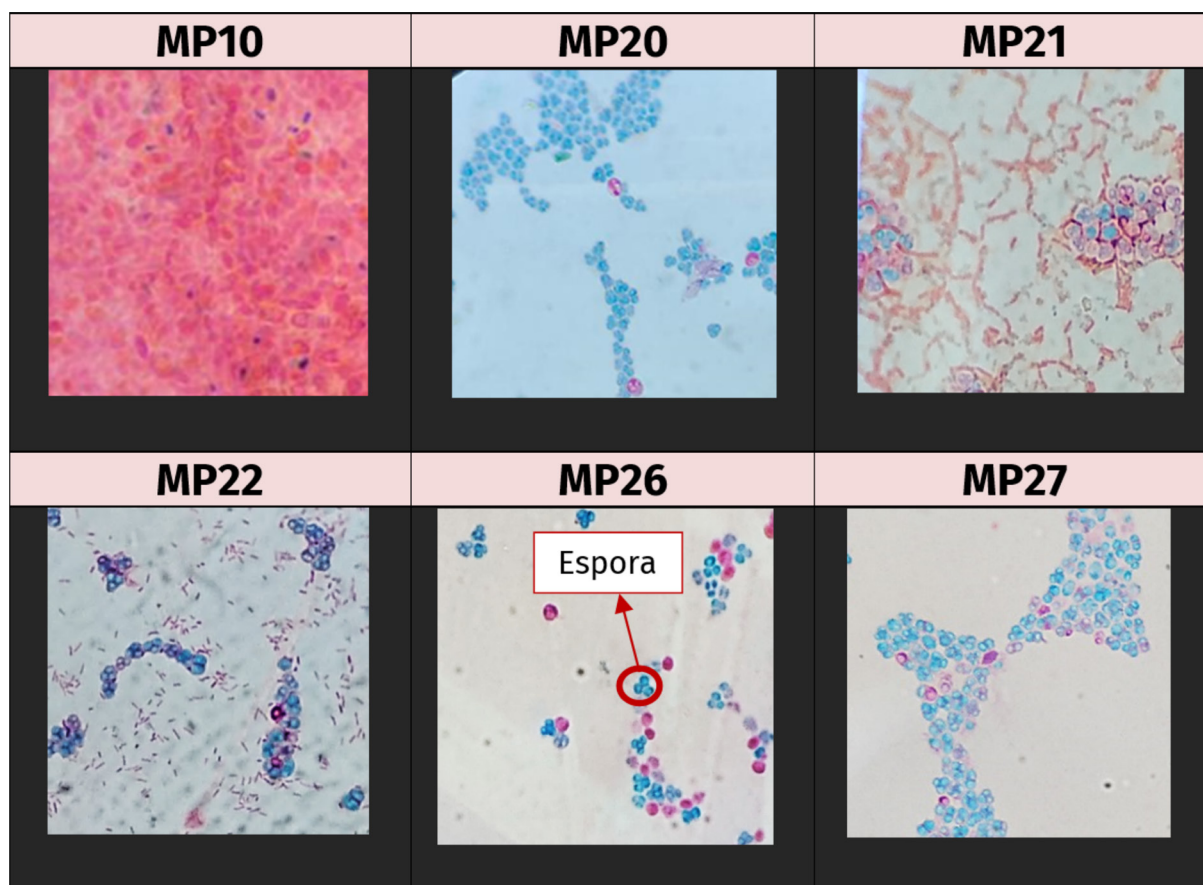


Figura 2. Esporulaci3n de las levaduras estudiadas

Los grados Brix que registraron las muestras de uva variaron entre 21,5 - 25,2. La concentraci3n de s3lidos solubles registrada es 3ptima para la elaboraci3n de vinos. En algunos trabajos se observ3 que el n3mero total y diversidad de especies en las uvas aumenta gradualmente a lo largo de las 3ltimas cuatro semanas antes de la vendimia. Esto es debido a que los az3cares que se producen en la uva durante la maduraci3n salen por roturas en la piel y sirven de nutrientes para las levaduras, que llegan hasta la uva procedentes de otros frutos y el suelo transportadas por el viento e insectos (Rib3reau-Gayon, 1989; Peynaud, 1993).

CONCLUSI3N

Este estudio proporcion3 informaci3n preliminar sobre las levaduras asociadas con las uvas en las regiones vit3colas de Purmamarca. Las uvas fueron fuente de levaduras principalmente del g3nero *no-Saccharomyces*. Los resultados obtenidos pueden ser 3tiles para promover el desarrollo de la industria vitivin3cola local.

Sin embargo son necesarios m3s estudios para obtener un mejor conocimiento

sobre la eficiencia enol3gica y participaci3n de estas poblaciones ind3genas de levaduras en la fermentaci3n espont3nea.

BIBLIOGRAF3A

- 3lvarez-P3rez, J.M.; Campo, E.; Coque, J.J.; Ferreira, V. & Hern3ndez, P. 2012. Sensory and chemical characterization of the aroma of Prieto Picudo ros3 wines: The differential role of autochthonous yeast strains on aroma profiles. *Food Chemistry* 133: 284-292.
- Barnett, J. A.; Payne, R.W. & Yarrow, D. 2000. Yeast: characteristics and identification. 3er third edition. Cambridge, Reino Unido, Cambridge University Press.
- Capece, A.; Pietrafesa, R. & Romano, P. 2011. Experimental approach for target selection of wild wine yeasts from spontaneous fermentation of "Inzolia" grapes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27: 2775-2783.

- Capozzi, V.; Garofalo, C.; Chiriatti, M.; Grieco, F. & Spano, G. 2015. Microbial terroir and food innovation: The case of yeast biodiversity in wine. *Microbiological Research* 181: 75–83.
- Clavijo, A.; Calderón, I. & 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: 241–245.
- Combina, M.; Elía, A.; Mercado, L.; Catania, C.; Ganga, A. & Martínez, C. 2005. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 99: 237–243.
- Combina, M.; Mercado, L.; Borgo, P.; Elia, A.; Jofré, V.; Ganga, A.; Martinez, C. & Catanis, C. 2005a. Yeasts associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 98: 1055–1061.
- Durcanská, K.; Muchová, L.; Drtilová, 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: 9–20.
- Esteve Zarzoso B.; Gostincar, A.; Bobet, R.; Uruburu, F. & Querol, A. 2000. Selection and molecular characterization of wine yeast isolated from the El Penedes area (Spain). *International Journal Food Microbiology*. 17: 553–562
- Fleet, G. 2003. Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology* 86: 11–22.
- Formento, J. C.; Lúquez, C.; Sánchez, L.; Galiotti, H.; Sfreddo, E.; Nazralla, F.; Bernardi, M.; Genovart, J.; Riveros, R. & Figueroa, C. 2011. Selección de Levaduras Enológicas Autóctonas de las Regiones Vitivinícolas de Mendoza. Nuevo Procedimiento de Búsqueda y Selección en las Yemas de Vid. III Jornadas Nacionales de Biología y Biotecnología de Levaduras, Mendoza, 30 junio-1 julio de 2011 / compilado por Mariana Combina. - a ed. - Buenos Aires: Ediciones INTA. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - INTA Mendoza., 2011.
- Garofalo, C.; Russo, P.; Beneduce, L.; Massa, S.; Spano, G. & Capozzi, V. 2015. Non-*Saccharomyces* biodiversity in wine and the microbial terroir: a survey on Nero di Troia wine from the Apulian region, Italy. *Annals of Microbiology* 56: 234–247.
- 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.
- Jolly, N.P.; Augustyn, O.P.H. & Pretorius, I.S. 2006. The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. *South African Journal for Enology and Viticulture* 27: 15–39.
- Kurtzman, C.P. & Fell, J.W. 1998. Part IV Methods. En: "The Yeasts, A Taxonomic Study" Fourth edition. Amsterdam, The Netherlands, Elsevier Science B.V. 75–107.
- Li, S.; Cheng, Ch; Li, Z.; Chen, J.; Yan, B. & Han, B. 2010. Yeast species associated with wine grapes in China. *International Journal of Food Microbiology* 138: 85–90.
- Liu, P.; Lu, L.; Duan, Ch. & Yan, G. 2016. The contribution of indigenous non *Saccharomyces* wine yeast to improved aromatic quality of Cabernet Sauvignon wines by spontaneous fermentation. *Food Science and Technology* 71: 356–363.
- Maturano, Y.P.; Rodríguez Assaf, L.A.; Toro, M.E.; Nally, M.C.; Vallejo, M.; Castellanos de Figueroa L.I.; Combina, M. & Vazquez, F. 2012. Multi-enzyme production by pure and mixed cultures of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts during wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 199: 23–32.
- Mercado, L.; Dalcerob, A.; Masuellia, R. & Combina, M. 2007. Diversity of *Saccharomyces* strains on grapes and winery surfaces: analysis of their contribution to fermentative flora of Malbec wine from Mendoza (Argentina) during two consecutive years. *International Journal of Food Microbiology* 24: 403–412.

- Ocón, E.; Gutiérrez, A.R.; Garijo, P.; López, R. & Santamaría, P. 2010. Presence of non-*Saccharomyces* yeasts in cellar equipment and grape juice during harvesttime. *International Journal of Food Microbiology* 27: 1023-1027.
- Peynaud, E. 1993. Enología Práctica, conocimiento y elaboración del vino. Editado por Ediciones Mundiales Madrid.
- Pretorius, I.S. 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16, 675-729.
- Ribereau – Gayon J.; Peynaud E.; Ribereau – Gayon P.; Sudrud P. 1989. Tratado de enología: ciencias y técnicas del vino. Editado por Hemisferio Sur S.A. Buenos Aires.
- Romancino, D.; Di Maio, S.; Muriella, R. & Oliva, D. 2008. Analysis of non-*Saccharomyces* yeast populations isolated from grape musts from Sicily (Italy). *Journal of Applied Microbiology* 105: 2248-2254.
- Suarez Lepe, J.A. & Íñigo Leal, B. (1997). Microbiología Enológica, Fundamentos de Vinificación. 3º Edición. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. España. 716.
- 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. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11: 139-173.
- Swiegers, J.H.; Capone, D.L.; Pardon, K.H.; Elsey, G.M.; Sefton, M.A.; Francis, I. L. & Pretorius I.S. 2007. Engineering volatile thiol release in *Saccharomyces cerevisiae* for improved wine aroma. *Yeast* 24: 561-574.
- Tristezza, M.; Vetrano, C.; Bleve, G.; Spano, G.; Capozzi, V. & Logrieco, A. 2013. Biodiversity and safety aspects of yeast strains characterized from vineyards and spontaneous fermentations in the Apulia Region, Italy. *International Journal of Food Microbiol* 36: 335-342.
- Vaudano, E.; Quinterio, 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.



Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional