

**Evaluación de la sensibilidad de diferentes cepas de
Saccharomyces cerevisiae a condiciones de shock térmico
que producen fermentaciones languidecientes en la
industria del vino**

Alumna: Sálice Recchia Anabella

Tesina para obtener el título de LICENCIADA EN BROMATOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS- UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO

Mendoza, 2022

**Evaluación de la sensibilidad de diferentes cepas de
Saccharomyces cerevisiae a condiciones de shock térmico
que producen fermentaciones languidecientes en la
industria del vino**

Alumna: Sálice Recchia Anabella

Correo: anabellasr@gmail.com

Directora: Dra. Lereña María Cecilia

Codirectora: Dra. Combina Mariana

Comisión evaluadora:

Presidente: MSc. Lic. Sanchez María Laura

Vocales: Dr. Ing. Maza Marcos

MSc. Lic. Brom. Martinengo Nora

Suplente: Bioquímica Farrando Silvina

RESUMEN

Las fermentaciones alcohólicas enlentecidas suponen complicaciones que afectan a la industria vitivinícola mundial. Las causas responsables de fermentaciones problemáticas son diversas, siendo consecuencia de una combinación de factores que impactan en el metabolismo o viabilidad de las levaduras, llevando a que la fermentación se enlentezca o se detenga. Dentro de los factores posibles, en esta tesina se propuso estudiar el efecto producido por el incremento de temperatura (shock térmico) durante el comienzo de la fermentación alcohólica (FA), para evaluar la implicancia del tratamiento térmico en la cinética de fermentación y en la actividad metabólica y estado fisiológico de diferentes cepas comerciales de *Saccharomyces cerevisiae*. En estudios previos del grupo, se determinó que un incremento brusco en la temperatura produce alteraciones en la cinética de fermentación con una magnitud que depende de la temperatura aplicada y de la cepa de *S. cerevisiae* utilizada. Este trabajo tuvo como objetivo la validación de tales resultados y la ampliación del estudio a otras cepas de *S. cerevisiae*. Se emplearon 4 cepas comerciales de *S. cerevisiae* inoculando mostos sintéticos donde se evaluaron diferentes condiciones térmicas. En el día 3 de la FA, se aplicaron shocks térmicos a temperaturas de 36°C y 40°C durante 16 horas, luego de lo cual las FA continuaron a 28 °C. Se determinó la cinética de FA para todos los tratamientos, y también el estado fisiológico de las levaduras (viabilidad/vitalidad). Cada cepa evaluada mostró diferentes comportamientos en respuesta a los tratamientos térmicos, aportando información importante referida a la resistencia al estrés térmico de cepas no estudiadas anteriormente. Esta tesina contribuye a la comprensión de la variabilidad de respuesta y comportamiento de distintas cepas de *S. cerevisiae*, ampliando el estudio abordado por el grupo en publicaciones previas.

Palabras clave: *S. cerevisiae*, shock térmico, fermentaciones problemáticas

ABSTRACT

Sluggish fermentations are frequent issue affecting the wine industry worldwide. The causes responsible of problematic fermentations are diverse, and they are generally a consequence of a combination of factors that impact on the metabolism or viability of yeasts, leading to a sluggish or stuck fermentations. Among the different possible factors, in this study we proposed to evaluate the effect produced by a sudden temperature increase (thermal shock) during the onset of alcoholic fermentation (AF), to determinate the impact of heat shock on fermentation kinetics as well as on the metabolic activity and physiological state of different commercial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Previous studies of the group, demonstrated that an abrupt increase in temperature produces alterations in fermentation kinetics with a magnitude that depends on the temperature applied and the strain of *S. cerevisiae* employed. The aim of this study was to validate these results and to extend the study to other *S. cerevisiae* strains. Four commercial strains of *S. cerevisiae* were used to inoculate synthetic musts and different heat-shock conditions were evaluated. On day 3 of AF, heat shocks were applied at temperatures of 36°C and 40°C for 16 hours, after which AF continued at 28°C. AF kinetics was monitored for all treatments, as well as physiological status (viability/vitality). All strains evaluated showed different behaviors in response to the heat treatments, and the results obtained provided important information regarding the thermal resistance to heat stress of unstudied strains. This study contributes to the understanding of the variability of response and behavior of different strains of *S. cerevisiae*, extending the study addressed by the group in previous publications.

Keywords: *S. cerevisiae*, heat shock, problematic fermentations

DEDICATORIA

A mi madre, por enseñarme el valor de la fortaleza.

A mi padre, por confiar en mis decisiones.

A mi hermana y hermano, por ser mis compañeros y guías en la vida.

A mi sobrina, que llenó mi vida de luz y amor.

A mis amigas, con quienes he tenido el honor de coincidir.

AGRADECIMIENTOS

A mis directoras de tesis, Cecilia y Mariana, admirables mujeres que confiaron en mí y me guiaron en el final de un proceso tan importante para mi vida.

A la comunidad de Ciencias Agrarias, por aportarme conocimientos valiosos y contribuir con su vocación a la formación de profesionales indispensables para la vida.

A mi familia, por su compañía incondicional.

Al universo, por abrirme los ojos y mostrarme la conexión que existe entre mis decisiones y lo que sucede.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	Elaboración del vino	2
1.2.	Datos vitivinícolas regionales	3
1.3.	Levaduras: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
1.4.	Participación de las levaduras en la fermentación.....	6
1.5.	Fermentación alcohólica	7
1.6.	Nutrición de los mostos.....	9
1.7.	Fermentaciones problemáticas.....	9
1.8.	Causas de las fermentaciones detenidas o languidecientes	10
1.8.1.	Limitación de nutrientes:	10
1.8.2.	Toxinas:.....	11
1.8.3.	Incompatibilidad microbiana:.....	11
1.8.4.	Temperaturas extremas:	11
1.8.5.	Cambios bruscos de temperatura	11
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	13
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
3.1.	Medios y soluciones utilizadas	16
3.1.1.	YPD sólido.....	16
3.1.2.	YPD líquido	16
3.1.3.	Mosto sintético.....	16
3.1.4.	Buffer fosfato salino (PBS).....	17
3.2.	Cepas de <i>S. cerevisiae</i>	18
3.3.	Preparación de los inóculos.....	18
3.4.	Inoculación de los mostos	18
3.5.	Nutrición de los mostos y aplicación de los shocks térmicos.....	18
3.6.	Seguimiento de las fermentaciones	18
3.7.	Evaluación de la viabilidad/vitalidad de <i>S. cerevisiae</i> durante las fermentaciones	19
3.8.	Diseño experimental:	19
3.9.	Análisis estadístico:	20
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
4.1.	Determinación del impacto del shock térmico en la cinética de la FA	22
4.2.	Efecto del shock térmico sobre la vitalidad celular.....	24

4.3. Análisis fisicoquímicos de los vinos obtenidos.....	29
5. CONCLUSIONES	34
6. BIBLIOGRAFÍA	36

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Elaboración del vino

El vino es una bebida que se obtiene a partir de la uva (*Vitis vinifera*), mediante la fermentación alcohólica de su mosto o jugo. El proceso de fermentación se produce por la acción metabólica de las levaduras que transforman los azúcares del fruto (mayoritariamente glucosa y fructosa) en alcohol etílico y gas en forma de dióxido de carbono. La ley argentina sobre vinos 14.878, define en su Art. 17 como vinos genuinos a aquellos obtenidos por la fermentación alcohólica de la uva fresca y madura o del mosto de la uva fresca, elaborado dentro de la misma zona de producción. Los microorganismos son los responsables del proceso de transformación del mosto en vino, en particular las levaduras son quienes llevan a cabo las transformaciones bioquímicas que ocurren en el mosto de uva, que tiene como producto final al vino (Ribéreau-Gayon y col., 2006). Más específicamente, el proceso es denominado fermentación alcohólica (FA), e implica la transformación de los azúcares presentes en el mosto en etanol, anhídrido carbónico y otros compuestos minoritarios que contribuyen a la composición del vino.

La elaboración del vino comienza en la vid, con la maduración de las bayas. La época de maduración depende fundamentalmente del clima y de la variedad (Alejandre, 2007). Durante el proceso de maduración ocurre un aumento del contenido de azúcares y una disminución de la acidez total, que finaliza en la denominada madurez fisiológica, momento en que las semillas del fruto están en condiciones de germinar. La madurez fisiológica no necesariamente coincide con la madurez industrial, la cual refiere al momento idóneo de recolección del fruto para el uso al que será destinado (Alejandre, 2007). Una vez que la baya llega a la concentración de azúcares deseada (medida en grados Brix) se procede a su cosecha y posterior vinificación.

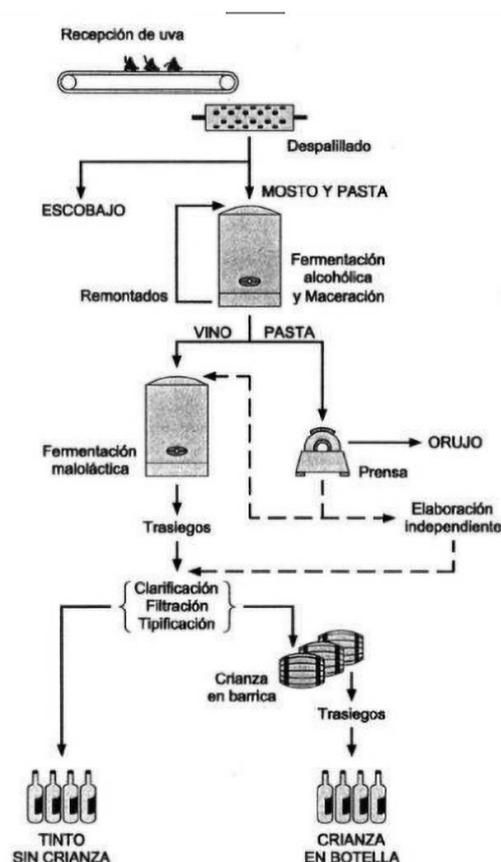


Figura 1: Esquema de Vinificación de Tintos (Alejandre, 2007).

Las primeras etapas del proceso de elaboración del vino suceden durante el cultivo. En la vid se miden los grados Brix y temperatura de los racimos, verificando también las condiciones

higiénico-sanitarias de los mismos. Si los parámetros medidos son adecuados se procede a la cosecha de forma manual o mecánica, y se transporta la uva hacia la bodega. Como se muestra en la Figura 1, al ingresar la uva al establecimiento se realiza el despallado y estrujado, eliminando el escobajo para evitar que aporte al vino un exceso del tanino y astringencia. De esta forma se obtiene el mosto el cual es transportado hacia tanques de fermentación en donde se efectúan adiciones de anhídrido sulfuroso, asegurando su protección frente a eventuales contaminaciones microbianas, oxidación; y facilitando la extracción de color. Se suele realizar también la corrección de la acidez total del mosto a través de la adición de ácido tartárico. A partir de este momento comienza la fermentación alcohólica propiamente dicha. Dicho proceso puede ser llevado a cabo por levaduras indígenas (fermentación espontánea) o bien a través de la inoculación de levaduras de origen comercial, siendo esta última una estrategia habitualmente empleada en la elaboración de vino (Alejandre, 2007; Carrascosa y col., 2011).

Una vez comenzada la fermentación, el dióxido de carbono liberado empuja hacia arriba las partículas sólidas, formando en la parte superior del depósito una masa compacta llamada "sombbrero". Dicha masa debe mantenerse constantemente húmeda, para lo cual se rocía con el propio mosto en fermentación, mediante las operaciones periódicas de remontajes, que se efectúan con ayuda de bombas o bien mediante la realización de "bazuqueos" manuales. En los vinos tintos se suele mantener la temperatura de fermentación entre los 18 y 30 °C. A esta temperatura la actividad de las levaduras se desarrolla sin problemas, consiguiéndose una adecuada extracción de color. Una vez finalizada la fermentación alcohólica se separa el vino de los componentes sólidos (orujos y semillas), mediante la operación de descube. De esta manera se obtiene el vino gota, el cual en algunos casos continuará la fermentación con bacterias ácido-lácticas en un proceso conocido como fermentación maloláctica, llevándose el mismo a cabo mediante constante control de los microorganismos involucrados (Carrascosa y col., 2005). A continuación, se llevarán a cabo operaciones de decantación y trasiego con el fin de eliminar borras gruesas, luego en caso de obtenerse vinos jóvenes se puede proceder a la clarificación donde se neutralizarán cargas negativas de polifenoles con cargas positivas de clarificantes como gelatina u ovoalbúmina. Por otro lado, para vinos de guarda luego de la decantación y trasiego continua la etapa de conservación y crianza en barricas de madera, etapa que puede durar entre 6 y 24 meses. Finalmente, continua la etapa de clarificación y filtración para eliminar borras finas y por último el embotellado y tapado, donde se pueden realizar ajustes de acidez y adición de estabilizadores, obteniéndose el vino terminado (Alejandre, 2007).

1.2. Datos vitivinícolas regionales

La industria vitivinícola es de gran importancia para el país, especialmente en la región de Cuyo. Mendoza es la principal provincia productora de uva y vino, y esta actividad representa un importante componente en su economía productiva. Mendoza cuenta con la mayor superficie implantada en el país con 151.490 hectáreas, abarcando el 70,4% del total de cultivo de vid del país, según datos publicados por el Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV, 2020).

Como muestra la Figura 2, en la provincia de Mendoza existen 5 zonas vitícolas: zona Norte, zona Centro (zona alta del Río Mendoza), zona Este, zona Valle de Uco y zona Sur (INV, 2019).

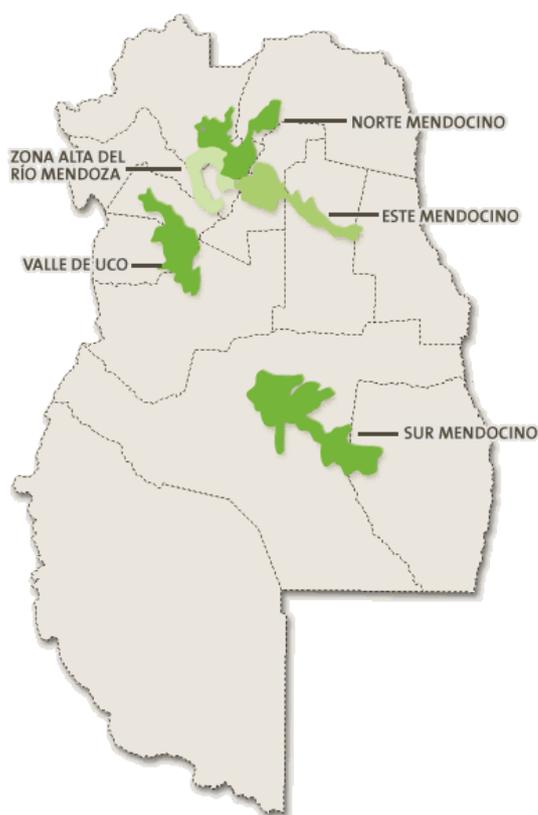


Figura 2. Regiones vitivinícolas de la provincia de Mendoza (Bernardi,2013).

La Región del Norte de Mendoza (Las Heras, Lavalle), representa el 9,87% del total de la superficie vitícola de la provincia irrigada con aguas del río Mendoza. La Zona Alta del Río Mendoza o Región Centro (Godoy Cruz, Guaymallén, Luján de Cuyo, Maipú), comprende el 16,70% del total del área vitícola de Mendoza, irrigada también con aguas del río Mendoza. La Región del Este de Mendoza (Junín, La Paz, Rivadavia, San Martín, Santa Rosa) incluye el 48,07% del total cultivado en la provincia principalmente, está bañada por el curso inferior del río Tunuyán y Mendoza, completándose la demanda hídrica por agua subterránea captada por bombeo. La Región del Valle de Uco (San Carlos, Tunuyán y Tupungato) comprende el 10,03% del total de viñedos de Mendoza que están regados por los ríos Tunuyán y Tupungato. Finalmente, la Región del Sur de Mendoza (General Alvear y San Rafael), incluye 15,34% de las viñas de la provincia de Mendoza y están irrigadas por los ríos Atuel y Diamante (Bernardi, 2013).

Dentro de las uvas con mayor aptitud para elaboración de vinos y mostos en la provincia de Mendoza predominan las variedades tintas, representando el 61 % del total del segmento. El 23 % corresponde a variedades rosadas y el 15,8 % a blancas. El cultivo de uvas tintas en la provincia presentó un aumento del 63 % respecto al año 2000, encontrándose en mayor cuantía variedades como Malbec, Bonarda, Cabernet Sauvignon, Syrah, Tempranillo, Merlot, y Pinot Noir (Fernández et al., 2019).

1.3. Levaduras: *Saccharomyces cerevisiae*

Las levaduras, quienes desempeñan un papel fundamental durante el proceso de elaboración del vino, son hongos unicelulares cuya reproducción ocurre por brotación o fisión. La mayoría de las levaduras pertenecen a la división Ascomycota debido a su desarrollo sexual, formándose el cigoto dentro de una estructura con forma de saco o bolsa (Carrascosa y col., 2011). Se encuentran diseminadas por toda la naturaleza y llegan a la uva por la acción del

viento e insectos siendo retenidas en la pruina, una sustancia cerosa que recubre la piel de la uva (Mesas y Alegre, 1999).

El grupo de *Saccharomyces sensu stricto* fue descrito inicialmente en 1970, y comprendía originalmente 21 especies (Fernández-Espinar y col., 2003; Querol y col., 2003). Con el correr de los años y la modernización de las herramientas taxonómicas, el género *Saccharomyces* se ha ido reclasificando donde muchos taxones han sido reubicados en el grupo “*Saccharomyces sensu lato*”. Actualmente, el género *Saccharomyces* cuenta con 8 especies: *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. jurei*, *S. kudriavzevii*, *S. arboricola*, *S. eubayanus* y *S. uvarum*. Asimismo, estas especies dan paso a híbridos naturales formados en la naturaleza, sin la intervención humana. Como es el caso del híbrido natural *S. bayanus* que está compuesto por genoma de *S. uvarum*, *S. eubayanus* y *S. cerevisiae*; o como el híbrido natural *S. pastorianus*, compuesto por *S. cerevisiae* y *S. eubayanus* (Alsammar y Delneri, 2020) (Figura 3).

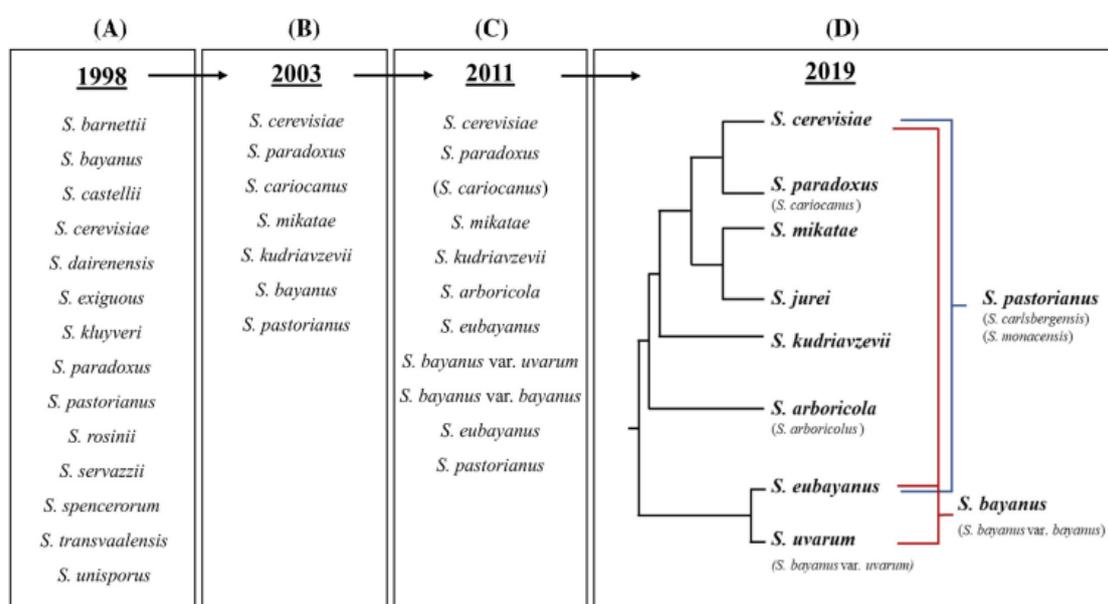


Figura 3: Reordenamientos taxonómicos del género *Saccharomyces* a lo largo de los años (Alsammar y Delneri, 2020).

Las levaduras constituyen las células eucariotas más simples. Su estructura celular incluye envolturas nucleares que rodean a un citoplasma con varios orgánulos, y un núcleo verdadero rodeado por una membrana donde se encuentran los cromosomas (Figura 4). Al igual que las células vegetales, estos microorganismos presentan dos envolturas celulares: la pared celular y la membrana plasmática; separadas entre sí por el espacio periplásmico. El protoplasma está constituido por el citoplasma y la membrana plasmática. La pared celular tiene como función principal proteger a la célula. Está compuesta por dos constituyentes principales, betaglucanos y manoproteínas; y en menor proporción por quitina. Esta envoltura da una forma a la célula, a través de su organización macromolecular. Asimismo, dicha envoltura celular cuenta con enzimas, las cuales se encuentran conectadas a la pared o situadas en el espacio periplásmico. Por otro lado, las envolturas celulares de las levaduras desempeñan un papel esencial: contribuyen al éxito de la fermentación alcohólica y liberan ciertos constituyentes que se suman a la composición del vino resultante (Ribéreau-Gayon y col., 2006).

La membrana celular (o plasmática) es una barrera con alta selectividad, que controla los intercambios que ocurren entre el citoplasma y la envoltura del exterior celular. Como

membrana biológica, se compone principalmente de lípidos y proteínas. La membrana plasmática de *S. cerevisiae* contiene alrededor de 40% de lípidos y 50% de proteínas, mientras que glucanos y mananos se presentan en menor proporción. Los lípidos de membrana son esencialmente fosfolípidos y esteroides. Estos presentan propiedades anfifílicas, es decir, poseen una porción hidrofóbica y otra hidrofílica, lo cual permite la interacción con compuestos polares y apolares que atraviesan la membrana. Además, estos componentes son los responsables de la fluidez de dicha membrana, debido a los cambios que ocurren en la disposición espacial de las cadenas hidrocarbonadas en función de la temperatura. Esta envoltura contiene también numerosas proteínas o glicoproteínas, cuyas funciones son permitir el transporte de solutos al interior y exterior celular. Ya en el citoplasma se encuentran las enzimas responsables de catalizar numerosas reacciones que ocurren en la célula, particularmente aquellas enzimas que llevan a cabo la lisis de los azúcares presentes en el mosto, siendo máxima su actividad durante la fase logarítmica de las levaduras (Ribéreau-Gayon y col., 2006).

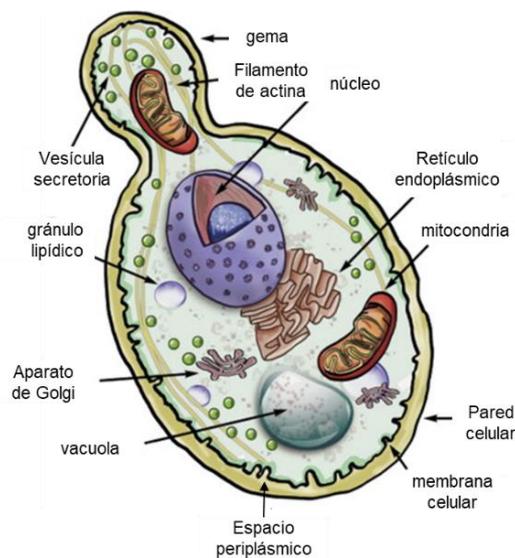


Figura 4: Principales componentes de una célula de levadura (Ketela y col., 1998).

1.4. Participación de las levaduras en la fermentación

En las vides, las levaduras pueden encontrarse distribuidas de manera aleatoria sobre distintas partes de la planta, como son sarmientos, hojas, racimos y bayas. Se encuentran también en los estomas y lugares donde existen pequeñas fisuras, que pueden exudar hacia el exterior sustancias azucaradas. Por último, se disponen en una menor cantidad sobre la pruina que cubre el resto del hollejo (Hidalgo Togores, 2003; Bernardi, 2013).

Las levaduras se encuentran presentes en las uvas en baja proporción, en un orden de 10^3 a 10^5 células por baya, siendo estos valores variables de acuerdo con numerosos factores como el estado higiénico-sanitario de la uva, condiciones climáticas durante el cultivo y en el viñedo, y de los tratamientos fitosanitarios aplicados al mismo (Hidalgo Togores, 2003; Combina y col., 2005a). La etapa fisiológica en que se encuentran las plantas también tiene repercusión en la proporción de levaduras presentes; sobre el comienzo del invierno ocurre una baja en la cantidad de levaduras ya que la planta entra en receso, refugiándose las levaduras en las yemas, protegidas por la pubescencia y la cámara de aire debajo de las férulas (Lúquez y col., 2007; Gonzalez y col., 2020). En referencia a las especies de levaduras presentes en uvas maduras y sanas, mayoritariamente se encuentran géneros de metabolismo oxidativo y forma apiculada como: *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia* y *Hansenula*, y en menor proporción levaduras del tipo fermentativo como *Saccharomyces*. Sin embargo, estas últimas

también se hallan en mayor número en las bodegas, en superficies como el suelo, paredes, depósitos, superficies de maquinarias, tanques, bombas, mangueras, etc. En este sentido, las instalaciones de la bodega son consideradas como parte de la ecología en las fermentaciones espontáneas (Hidalgo Togoires, 2003; Bernardi, 2013; Mercado y col., 2007).

Por otro lado, las fermentaciones pueden realizarse mediante la inoculación con cepas de levaduras comerciales, la mayoría de las cuales pertenecen a la especie *S. cerevisiae*. Existen en la actualidad una amplia variedad de cepas comerciales disponibles en el mercado que se utilizan frecuentemente en bodegas. Las fermentaciones no espontáneas, se realizan luego de una inoculación del cultivo de manera tal de lograr una población inicial de alrededor de 10^6 células/ml. Luego, el proceso fermentativo comienza rápidamente. En contraste, en las fermentaciones espontáneas, sin la adición del cultivo iniciador, ocurre un período de latencia (fase lag) donde se produce una multiplicación espontánea de la microflora naturalmente presente en el mosto, conocida como levaduras indígenas. La fermentación típica consta entonces de tres etapas. La primera de ellas es una fase de crecimiento exponencial que dura entre dos y cinco días donde coexisten diferentes especies de levaduras no-*Saccharomyces* con *Saccharomyces*. Debido a la presencia de algunos factores selectivos como la anaerobiosis, el sulfitado y la incipiente presencia de etanol; la especie *Saccharomyces* rápidamente se transforma en dominante. En esta etapa coexisten diferentes cepas de *S. cerevisiae* especialmente adaptadas al proceso fermentativo que, multiplicándose hasta poblaciones de 10^7 a 10^8 células viables/ml, metabolizan casi la totalidad de los azúcares a una velocidad máxima de fermentación. A continuación, sigue la fase estacionaria que dura aproximadamente ocho días y, a pesar de que el número de células no aumenta (la biomasa se mantiene estable), la velocidad de fermentación sigue manteniéndose en su valor máximo debido a que las levaduras son metabólicamente activas. Finalmente, la fermentación entra en una fase de muerte o declive, donde decrece el número de células viables hasta 10^5 células/ml aproximadamente, lo cual va acompañado de una disminución en la velocidad de fermentación favorecida también por los efectos tóxicos del etanol y el agotamiento de nutrientes (Figura 5) (Combina y col., 2005b; Mercado y col., 2010). Durante esta declinación, pueden aparecer otros géneros de levaduras consideradas como indeseables, tales como *Brettanomyces*, *Pichia*, o *Candida*, que pueden desarrollarse en el vino, lo cual lleva a la toma de medidas oportunas para evitar que esto suceda (Hidalgo Togoires, 2003; Ribéreau-Gayon y col., 2006).

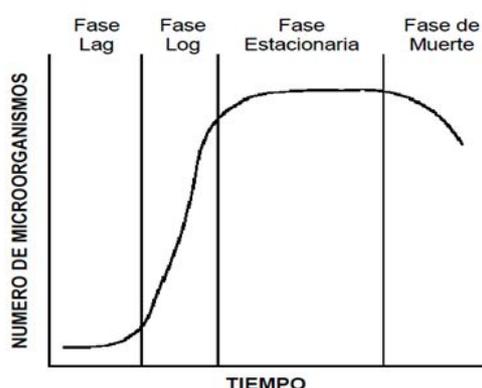


Figura 5: Fases de la población de levaduras durante la fermentación alcohólica.

1.5. Fermentación alcohólica

La palabra fermentación hace referencia a los procesos de transformación de la materia orgánica (líquido azucarado) con rápido y tumultuoso desprendimiento de gas. Las levaduras, microorganismos quimiorganotrofos (quimiheterótrofos), obtienen energía por la degradación de materia orgánica. Dichos microorganismos tienen la capacidad de degradar

los azúcares utilizando dos vías metabólicas: la fermentación y la respiración, donde ambos procesos tienen su inicio común en la glicólisis. La sucesión de reacciones que transforman la glucosa en piruvato con formación de ATP constituye una vía casi universal de metabolización de las hexosas en los sistemas biológicos eucariotas. En medios con alta concentración de azúcares, como es el caso del mosto de uva, la principal levadura que interviene en este proceso, *S. cerevisiae*, obtiene energía metabolizando los azúcares por la vía fermentativa, desactivando de forma casi completa la vía respiratoria. Este evento es conocido como efecto Crabtree o represión catabólica por la glucosa. El mecanismo es considerado como una adaptación competitiva dentro de la especie *S. cerevisiae*, ya que a pesar de que la fermentación es mucho menos eficiente energéticamente que la respiración (2 ATP versus 36 ATP por mol de glucosa utilizado, respectivamente), les permite a las levaduras consumir de manera más rápida los azúcares disponibles produciendo etanol y de este modo reducir la microflora competitiva del entorno (Ribéreau-Gayon y col., 2006).

La fermentación alcohólica (FA) se compone de una serie de reacciones en cadena catalizadas por diversas enzimas presentes en las levaduras (Figura 6). Las características fisicoquímicas del medio tienen una influencia notable sobre la producción y funcionalidad de las enzimas microbianas, por lo tanto, el desarrollo de cada fermentación y el resultado final pueden ser diferentes tanto por las características fisiológicas de las levaduras como por las condiciones en las cuales se realice la fermentación (Ribéreau-Gayon y col., 2006).

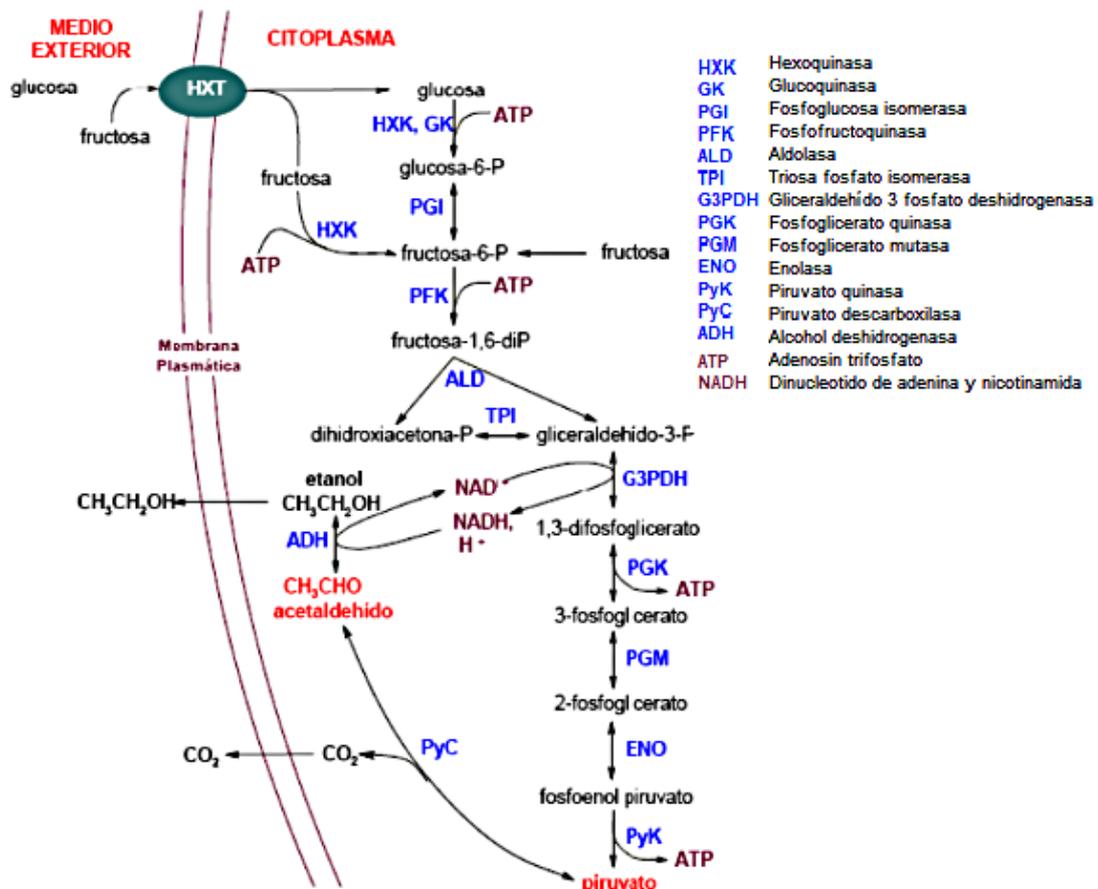


Figura 6: Esquema de la fermentación alcohólica. Glicólisis de los azúcares por *S. cerevisiae* y sistemas enzimáticos implicados (Bernardi, 2013).

El transporte de las hexosas presentes en el mosto, principalmente glucosa y fructosa, a través de la membrana plasmática constituye una etapa clave en el uso de los azúcares por

parte de las levaduras durante la fermentación alcohólica. Este mismo tiene lugar gracias a un complejo sistema proteico conocido como HXT (Hexose Transport). La incorporación de hexosas a través de la membrana no requiere de gasto de energía, ya que el movimiento se realiza a favor de un gradiente de concentración que es energéticamente favorable. Posteriormente, la glicólisis se efectúa enteramente en el citoplasma celular (Ribéreau-Gayon y col., 2006).

La FA comprende un proceso de transformación enzimática que, partiendo de la glucosa, está compuesto por 11 reacciones que terminan en la producción de etanol y dióxido de carbono. En contraste, la fermentación de la fructosa o levulosa está compuesta por 10 reacciones (Figura 6).

Asimismo, la FA es una reacción exotérmica, que en consecuencia produce liberación calor. Las levaduras liberan 40 kcal de energía por cada mol de azúcar ($C_6H_{12}O_6$) consumido, de los cuales 25 kcal son disipados en forma de calor. Es por esto último que resulta imprescindible el control de la temperatura durante el proceso de fermentación, para evitar que las levaduras se encuentren a temperaturas mayores que las óptimas de crecimiento, las cuales podrían resultar nocivas y afectar su viabilidad.

1.6. Nutrición de los mostos

La nutrición de los mostos es un procedimiento ampliamente realizado en la industria enológica y que suele llevarse a cabo en las primeras 48-72 horas de iniciado el proceso. El nitrógeno es un compuesto esencial para el crecimiento de las levaduras, favoreciendo no solo la formación de biomasa, sino que también la actividad metabólica, a través del incremento de la velocidad de consumo de azúcares por parte de las levaduras (Beltrán y col., 2005). Las levaduras consumen las fuentes nitrogenadas provenientes del mosto durante las primeras 24-48 horas de la fermentación alcohólica. En términos generales, la nutrición de los mostos puede ser realizada con productos comerciales actualmente disponibles en el mercado que combinan nitrógeno inorgánico (sales de amonio) con nitrógeno orgánico en forma de mezclas de aminoácidos y vitaminas. También en la práctica es ampliamente utilizado el nitrógeno inorgánico, principalmente en forma de sales de amonio como el difosfato de amonio.

1.7. Fermentaciones problemáticas

Las fermentaciones lentas o detenidas son uno de los principales problemas de la industria vitivinícola, provocando importantes pérdidas económicas. Se considera que una fermentación está detenida o enlentecida cuando se produce una suspensión en el consumo de azúcar o cuando su velocidad es demasiado baja para los fines prácticos (Bisson, 1999; Vargas y col., 2020). Una fermentación problemática puede presentarse de diferentes maneras, o bien mostrando una fase lag prolongada o bien un consumo lento de los azúcares hasta una detención abrupta de la FA. A su vez, cada una de estas situaciones se presenta con diferentes perfiles anormales de consumo de azúcares tal como se muestra en la Figura 7.

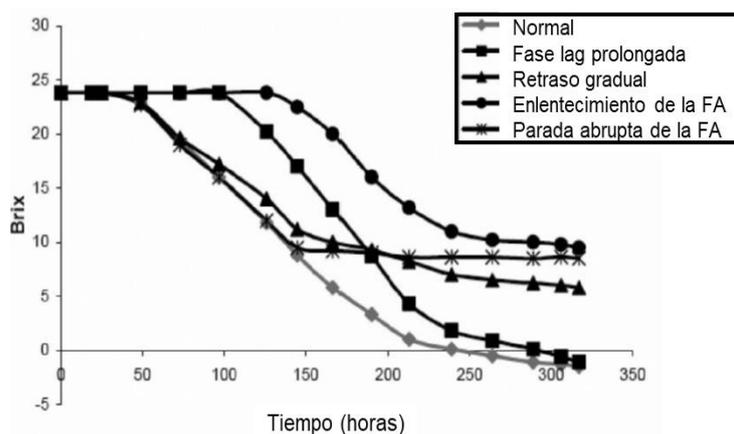


Figura 7: Diferentes perfiles de FA (Adaptado de Malherbe y col., 2007).

Si la fermentación se detiene de forma temprana, el alto nivel de azúcares residuales presente conduce a vinos microbiológicamente inestables y más susceptibles al deterioro, con posibles pérdidas de calidad y valor económico (Lonvaud Funnel, 1999; Maisonnave y col., 2013). Adicionalmente, aun cuando se logre reiniciar una fermentación detenida o lenta, los procedimientos aplicados pueden afectar negativamente la calidad del vino (Urtubia y col., 2012). Por lo tanto, es de gran importancia detectar e identificar los factores que pueden conducir a fermentaciones problemáticas.

1.8. Causas de las fermentaciones detenidas o languidecientes

Los factores que conducen a una fermentación problemática han sido ampliamente estudiados, y en términos generales se ha sugerido que las causas suelen ser múltiples, es decir como consecuencia de diferentes componentes actuando en simultáneo. Se han descrito diversas posibles causas de fermentaciones problemáticas, tal como la limitación de nutrientes, la toxicidad de los residuos agrícolas presentes en la uva, la sanidad de la uva y las temperaturas, entre otros (Malherbe y col., 2007). Cada uno de estos parámetros supone condiciones de estrés que pueden causar un efecto adverso sobre el crecimiento, viabilidad o vitalidad de las levaduras, provocando alteraciones en la velocidad y eficiencia en el consumo de azúcar y, por tanto, conduciendo a una fermentación problemática (Ivorra y col., 1999; Malherbe y col., 2007).

Asimismo, algunos mostos pueden presentar mayor riesgo de fermentaciones detenidas, aunque esto no necesariamente conduzca a fermentaciones anormales (Malherbe y col., 2007). A continuación, se describen algunas de las causales de fermentaciones detenidas o languidecientes más estudiadas:

1.8.1. Limitación de nutrientes:

Los nutrientes (principalmente nitrógeno) son requeridos para la obtención de biomasa y para mantener la actividad metabólica de la misma (capacidad fermentativa). En ese sentido, la mayoría de las regiones vinícolas permiten el uso de suplementos nutricionales para evitar FA enlentecidas asociadas al déficit nutricional. Es por ello por lo que actualmente es una causa menos frecuente de fermentaciones enlentecidas (Bisson, 1999).

1.8.2. Toxinas:

Se ha demostrado también que varias sustancias tóxicas conducen a paradas de fermentación (Ribéreau-Gayon y col., 2006). Levaduras no-*Saccharomyces* tales como *Hansenula* y *Kluyveromyces* producen factores *killer* que son activos contra *Saccharomyces*. Por otro lado, los agentes fungicidas y pesticidas utilizados en el viñedo pueden afectar de forma negativa la viabilidad de las levaduras si se encuentran presentes en concentraciones residuales elevadas en el momento de la vendimia (Bisson, 1999).

1.8.3. Incompatibilidad microbiana:

Una elevada población inicial de levaduras no-*Saccharomyces* y de bacterias supone un mayor riesgo de fermentaciones lentas o de paradas de fermentación. Esto se debe, en parte, a la competencia por los nutrientes y a la producción de sustancias tóxicas (Bisson, 1999).

1.8.4. Temperaturas extremas:

La exposición a temperaturas extremas también puede afectar la velocidad de fermentación. Varios trabajos han demostrado la importancia de la temperatura en el crecimiento de las levaduras del vino y la influencia de este factor ambiental en la distribución natural de las especies silvestres (Bisson, 1999).

El blanco principal de los efectos inhibitorios de altas o bajas temperaturas es la membrana plasmática, debido a las modificaciones que provoca el shock térmico sobre las cadenas hidrocarbonadas de dicha envoltura. Puesto que el etanol y la temperatura tienen como objetivo la misma función celular, no sorprende que sus efectos sean sinérgicos. Los cambios bruscos de temperatura también afectan la actividad de las enzimas citoplasmáticas y la función de las organelas. La capacidad de responder a los cambios repentinos de temperatura depende de la capacidad de las diferentes cepas de *S. cerevisiae* para desarrollar una respuesta adecuada a dicho estrés. Frente a un incremento brusco de la temperatura, las células activan la transcripción de genes en respuesta al estrés para la posterior síntesis las proteínas del golpe de calor. Si el golpe de calor tiene lugar bajo condiciones de limitación de nutrientes para las levaduras, las células podrían no ser capaces de compensar los cambios debidos a la temperatura (Bisson, 1999).

1.8.5. Cambios bruscos de temperatura

El aumento de la temperatura del mosto tiene varios efectos en la calidad final del vino. En primer lugar, la temperatura regula la velocidad de fermentación. Una fermentación rápida, a una temperatura demasiado alta, puede ser perjudicial para la calidad del vino, y una fermentación lenta, a una temperatura demasiado baja, retrasa los procesos posteriores y aumenta los riesgos de alteraciones en el vino. Además, el calor excesivo puede dañar o matar las levaduras, lo cual puede ralentizar o incluso detener la fermentación (Vargas y col., 2020).

Como se mencionó anteriormente la FA es una reacción exotérmica y produce en los vinos tintos una cantidad de calor promedio de 983 kJ por mol de azúcar consumido. La producción de calor varía durante todo el proceso de fermentación y alcanza su máximo en la fase tumultuosa, que suele producirse en las primeras etapas del proceso (aproximadamente en el primer tercio del tiempo total de fermentación) (Maicas, 2020). La temperatura del mosto de uva aumenta a razón de 1,3 °C por cada 100 g de azúcares consumidos durante la fermentación, debido al calor liberado por el metabolismo de las levaduras (Bisson, 2005). De esta manera pueden producirse incrementos de temperatura de 12-15 °C, y por consiguiente

el mosto de uva podría superar los 40 °C sin un adecuado control de temperatura (Schmid y col., 2009; Valentine y col., 2018). Además, la fermentación de la uva tinta se lleva a cabo junto con sus pieles que forman el “sombbrero” en la parte superior del líquido (Schmid y col., 2009). De este modo, el calor no se distribuye uniformemente, sino que se forman verdaderos gradientes térmicos, donde las temperaturas más altas se localizan principalmente en el sombrero (Guerrini y col., 2017; Schmid y col., 2009; Valentine y col., 2018). Finalmente cabe destacar que también en el sombrero se generan gradientes de temperatura, pudiendo deberse a diferentes tratamientos aplicados durante la maceración (remontados, bazuqueos, delestages), e influyendo en el curso de la fermentación. (Bisson, 2002).

Por otro lado, la suplementación de nitrógeno durante la primera mitad de la fermentación (densidad del mosto de 1060 mg/L) es una práctica enológica ampliamente utilizada ya que mejora la cinética y reduce la duración de la fermentación (Beltrán et al., 2005) (Vargas y col., 2020). Sin embargo, esta práctica tiene un impacto directo en la actividad metabólica de las levaduras, lo que también puede favorecer al aumento de la temperatura (Bisson, 1999; Malherbe y col., 2007).

Adicionalmente, en las regiones productoras de uva con clima cálido y muy cálido (índice heliotérmico: HI +2 y HI +3) (Tonietto y Carbonneau, 2004) la elevada temperatura ambiental durante la vendimia puede favorecer que la uva y el mosto presente elevadas temperaturas iniciales, contribuyendo negativamente al proceso fermentativo. Por ejemplo, la recolección de las uvas durante los días calurosos favorece el aumento de temperatura inicial del mosto. Además, la temperatura de la uva puede continuar aumentando debido al tiempo de espera de los camiones hasta la descarga en la bodega, algo frecuente en bodegas de gran volumen (Coulter y col., 2008).

El uso de depósitos de acero inoxidable con regulación térmica contribuye a superar estos problemas relacionados con la temperatura en las bodegas industriales. Sin embargo, aún hay muchas bodegas artesanales o “boutique” y/o de gran volumen que utilizan otros materiales como tanques de hormigón para las fermentaciones con control térmico deficiente y los grandes volúmenes presentan elevada inercia térmica que enlentecen los procesos de refrigeración (Coulter y col., 2008, Vargas y col., 2020).

Estudios previos del grupo de trabajo han demostrado que elevaciones de temperatura superiores a los 36 °C en estadios tempranos de la fermentación conducen a enlentecimientos significativos de la FA dependiendo de la cepa de levadura, la nutrición de los mostos y la temperatura alcanzada (Vargas y col., 2020). Estos importantes hallazgos han sido observados mediante los ensayos con tres cepas de *S. cerevisiae*. Con el objeto de validar resultados previos y obtener una conclusión más amplia que permita extrapolarla a nivel industrial, resulta imprescindible evaluar el comportamiento de otras cepas de *S. cerevisiae* en respuesta a los shocks térmicos y sus efectos en la FA.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis:

Un incremento brusco en la temperatura produce alteraciones en la cinética de fermentación con una intensidad que depende de la temperatura aplicada y de la cepa de *S. cerevisiae* utilizada.

Objetivo general:

Evaluar la sensibilidad de diferentes cepas de *S. cerevisiae* a elevaciones bruscas de las temperaturas aplicadas en estadios tempranos de la vinificación que producen fermentaciones languidecientes en la industria del vino.

Objetivos específicos:

- 1) Evaluar el efecto de shocks térmicos aplicados en estadios tempranos de la fermentación sobre el perfil fermentativo, viabilidad y vitalidad de cepas comerciales de *S. cerevisiae*.
- 2) Identificar las cepas *S. cerevisiae* más resistentes o sensibles al shock térmico y relacionarlos con los perfiles de viabilidad/vitalidad de las levaduras durante las fermentaciones.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Medios y soluciones utilizadas

3.1.1. Agar Extracto de levadura Peptona Dextrosa (YPD) sólido

Se prepararon placas de Petri conteniendo 30 mL del medio YPD para reactivación de las cepas previo a la preparación de los inóculos. El medio fue preparado de acuerdo con la siguiente composición:

- Peptona bacteriológica 5 g
- Glucosa 20 g
- Extracto de levadura 5 g
- Agar 20 g
- Agua destilada csp 1 L

Los componentes fueron disueltos y posteriormente esterilizados en autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

3.1.2. YPD líquido

La preparación de los inóculos fue realizada en medio YPD líquido de acuerdo con la siguiente composición:

- Peptona bacteriológica 20 g
- Glucosa 10 g
- Extracto de levadura 5 g
- Agua destilada csp 1 L

Los componentes fueron disueltos y posteriormente esterilizados en autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

3.1.3. Mosto sintético

Todas las fermentaciones fueron llevadas a cabo utilizando mosto sintético (MS) de acuerdo con lo establecido por Bely y col. (1990). En la preparación del mosto sintético se incluyeron dos modificaciones de acuerdo con los objetivos de la tesis. Por un lado, la concentración de azúcares totales fue de 240 g/L (120 g de glucosa y 120 g de fructosa), de esta manera se obtuvo un mosto con una concentración de azúcares similar a la observada en la práctica donde los mostos de uvas tintas suelen partir de 23 o 24 °Brix. Asimismo, la formulación del MS original contiene 300 mg/L de nitrógeno total en forma de nitrógeno inorgánico como NH₄Cl y nitrógeno orgánico en la forma de una mezcla de aminoácidos, tal como se mostrará más adelante. En este caso, se modificó el contenido de nitrógeno a 140 mg/L (MS140), concentración por debajo de la cual la finalización de la fermentación se ve comprometida. El mosto fue preparado siguiendo la composición indicada en la Tabla 1. Finalmente, se ajustó su pH a 3,3 con NaOH y se esterilizó mediante filtración con membrana de 0,22 µm, utilizando una unidad filtrante. Una vez esterilizado, el MS fue distribuido en frascos Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 150 mL de MS140 y tapados utilizando tapones estériles.

Tabla 1: Composición del MS140

Componentes	
Azucares	
Glucosa	120 g
Fructosa	120 g
Ácidos	
Citríco-1-hidrato	0,5 g
L-tartárico	3 g
DL-málico	5 g
Minerales	
KH ₂ PO	0,75 g
K ₂ SO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,16 g
NaCl	0,2 g
Fuente de Nitrógeno	
NH ₄ Cl	0,21 g
Stock de aminoácidos	4.7 mL
Otras soluciones	
Stock de. Vitaminas	10mL
Stock Oligoelementos	1mL
Stock de factores de anaerobiosis	1mL
Agua destilada csp	1 L

- **Stock de vitaminas:** Myo- inositol 2 g; Pantotenato de calcio 0,15 g; Tiamina clorhidrato 0,025 g; Ácido nicotínico 0,2 g; Piridoxina 0,025 g y Biotina 0,0003 g. Los componentes se disolvieron en 1 litro de agua destilada, fueron distribuidos en tubos cónicos de 50 mL y conservados a -20 °C.
- **Stock de oligoelementos:** MnSO₄ H₂O 4 g; ZnSO₄.7H₂O 4 g; CuSO₄.5H₂O 1 g; KI 1 g; CoCl₂.5H₂O 0,4 g; H₃BO₃ 1 g; y (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 1 g. Los componentes se disolvieron en 1 litro de agua destilada. Los stocks fueron conservados a 4 °C.
- **Stock de aminoácidos:** Tirosina 1,5 g; Triptófano 13,4 g; Isoleucina 2,5 g; Ácido aspártico 3,4 g; Ácido glutámico 9,2 g; Arginina 28,3 g; Leucina 3,7 g; Treonina 5,8 g; Glicina 1,4 g; Glutamina 38,4 g; Alanina 11,2 g; Valina 3,4 g; Metionina 2,4 g; Fenilalanina 2,9 g; Serina 6 g; Histidina 2,6 g; Lisina 1,3 g; Cisteína 1,5 g; y Prolina 46,1 g. Los componentes se disolvieron en 1 litro de agua destilada. Los stocks fueron conservados a -20 °C.
- **Stock de factores de anaerobiosis:** Ergosterol 1,5 g; Ácido oleico 0,5 g; Etanol 50 mL; y Tween 80 50 mL. Los componentes se disolvieron en 100 mL de agua destilada. Los stocks fueron conservados a 4 °C.

3.1.4. Buffer fosfato salino (PBS)

El PBS fue preparado de acuerdo con la siguiente composición:

- NaCl	8 g
- KCl	0,2 g
- Na ₂ HPO ₄	1,2 g
- KH ₂ PO ₄	0,2 g
- Agua destilada csp	1 L

Los diferentes componentes fueron disueltos en agua destilada y el pH fue ajustado a 7,2 – 7,4 utilizando NaOH. Finalmente fue esterilizado en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

3.2. Cepas de *S. cerevisiae*

Para el desarrollo de esta tesis se emplearon 4 cepas comerciales de *S. cerevisiae*: Enoferm M2, Lalvin ICDV21, Lalvin BM45 y Lalvin EC1118. Las dos primeras fueron seleccionadas por su elevada velocidad de crecimiento a 40 °C (buen fitness o capacidad metabólica a altas temperaturas:) y las dos últimas por su baja velocidad de crecimiento a 40 °C (mal fitness a altas temperaturas) de acuerdo con el trabajo realizado por García Ríos y col. (2014).

3.3. Preparación de los inóculos

A partir de stocks en glicerol conservados a -20 °C en la Colección de Cultivos Microbianos de vid y vino (CMV) de la EEA Mendoza, INTA, las cepas fueron activadas mediante siembra en placas de YPD e incubadas durante 48 horas a 28 °C. A partir de esas placas se seleccionó una única colonia por cada cepa, con la cual se sembraron 4 placas de YPD por extensión, con el objetivo de obtener una pátina en cada placa, y de esta forma una gran cantidad de biomasa. Las placas se incubaron durante 48 horas a 28 °C. Finalmente se utilizaron palillos estériles para colectar las pátinas de cada cepa que se utilizaron para inocular 100 mL de YPD líquido. Estos cultivos líquidos fueron incubados durante 4 h en agitación a 150 rpm a 28 °C.

3.4. Inoculación de los mostos

A continuación, se cuantificó la concentración de los inóculos activados. Para ello se realizaron diluciones de 1/10 y 1/100 en agua estéril y se realizó el recuento en cámara de Neubauer. Los mostos fueron inoculados con las diferentes cepas de *S. cerevisiae* a razón de 2×10^6 células/mL y mantenidos a 28 °C. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

3.5. Nutrición de los mostos y aplicación de los shocks térmicos

Tal como se mencionó en la introducción, la nutrición de los mostos con sales de amonio es una práctica ampliamente utilizada en la industria enológica. Las diferentes unidades experimentales fueron suplementadas con $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$ fosfato diamónico (DAP) en una concentración de 200 mg/L en el día 3 de la fermentación (correspondiente a una densidad aproximada de 1030-1040 mg/L).

Luego de 3 horas de la nutrición, se procedió a simular los shocks térmicos mediante la colocación de los frascos Erlenmeyers en estufas a las diferentes temperaturas a evaluar (36 °C y 40 °C). El shock térmico se mantuvo durante 16 horas, luego de lo cual los tratamientos fueron inmediatamente acondicionados nuevamente a 28 °C, donde continuaron el proceso fermentativo.

3.6. Seguimiento de las fermentaciones

El seguimiento de las fermentaciones se realizó mediante un monitoreo diario de la densidad, utilizando un densímetro (Densito 30 PX, Mettler Toledo). Para ello, cada día se tomaron muestras de 2 mL de las diferentes unidades experimentales, en las cuales se midió dicho parámetro. Se consideró que la fermentación culminó cuando se alcanzó una concentración final de azúcares reductores menor a 4 g/L (Bisson, 1999). Tanto la concentración de azúcares totales como otros parámetros fisicoquímicos de las fermentaciones (glicerol, ácido acético,

etanol) fueron determinados mediante espectrofotometría infrarrojo con el equipo Alpha-FT-IR WineAnalyzer de Bruker (Massachusetts, US).

3.7. Evaluación de la viabilidad/vitalidad de *S. cerevisiae* durante las fermentaciones

Para determinar la viabilidad/vitalidad de cada cepa de *S. cerevisiae* durante las fermentaciones se utilizó el citómetro de flujo ACCURI C6 (BD) con tinciones fluorescentes que permitieron analizar la viabilidad y vitalidad de las células. La viabilidad se evaluó utilizando el fluorocromo yoduro de propidio (IP), el cual puede ingresar a la célula únicamente cuando existe daño en la membrana, emitiendo fluorescencia roja al intercalarse en el ADN de la levadura. De esta manera un incremento en las células teñidas con IP correlacionó con una disminución de la viabilidad celular. Por otro lado, la vitalidad se evaluó mediante la determinación de la actividad esterasa utilizando el fluorocromo diacetato de carboxifluoresceína acetoximetil éster (CFDA-AM) (bi y col., 2012; Saldi y col., 2014). CFDA-AM es un compuesto que puede difundir libremente a través de la membrana plasmática independientemente de su estado y emite fluorescencia verde cuando las enzimas esterases inespecíficas, presentes en el citoplasma de células vitales, clivan los enlaces del compuesto liberando una molécula fluorescente. De esta forma, las células que presentan fluorescencia verde se interpretan como células vitales o metabólicamente activas. Además, el kit permite identificar una tercera población celular posible, aquellas células cuya membrana ha sido afectada o dañada (fluorescencia roja) pero cuya vitalidad aún no ha sido comprometida (fluorescencia verde). Esta población que, en determinado momento puede presentar ambas fluorescencias, podría evolucionar con el tiempo hacia la recuperación celular o por el contrario hacia la muerte celular. Tanto IP como CFDA-AM están incluidos en el Kit FungaLight™ CFDA,AM/Ioduro de Propidio Yeast Vitality de Molecular Probes™ (Oregon, US).

Durante diferentes momentos de la FA fueron tomadas muestras de 1 mL del mosto en fermentación y se realizaron diluciones decimales en PBS hasta alcanzar una concentración aproximada de 10^6 células/mL. Luego, a 1 mL de la dilución se le adicionó 1 μ L de CFDA,AM y 1 μ L de IP, y se incubó por 15 minutos a 37 °C siguiendo las recomendaciones del fabricante del kit utilizado. Las células teñidas fueron homogeneizadas en vórtex y posteriormente se analizaron utilizando el citómetro de flujo ACCURI C6 (BD). Las imágenes fueron adquiridas y procesadas utilizando el programa BD CSampler.

3.8. Diseño experimental:

El diseño experimental pretendió reproducir condiciones de altas temperaturas producidas habitualmente en bodegas. Este aumento de temperatura está asociado a una elevada actividad metabólica de las levaduras durante los primeros días de fermentación, el cual se ve favorecido además por la nutrición de los mostos. Por lo tanto, se aplicaron diferentes aumentos de la temperatura a los tres días de iniciada la fermentación. Los tratamientos realizados fueron los siguientes:

- TC (Tratamiento control): sin la aplicación de shock térmico, las fermentaciones se llevaron a cabo a 28 °C hasta consumo total de los azúcares.
- T36: la aplicación del shock térmico a 36°C se realizó en el día 3 de la fermentación durante 16 horas.
- T40: la aplicación del shock térmico a 40°C se realizó en el día 3 de la fermentación durante 16 horas.

Para los tratamientos a 36 y 40°C, luego de aplicar los shocks térmicos los ensayos se llevaron a condiciones ambientales de 28°C para continuar su evaluación.

3.9. Análisis estadístico:

Con la finalidad de realizar un análisis estadístico de las curvas de fermentación de los 36 tratamientos se calculó el área bajo la curva (ABC) hasta el día 11 de la FA, tal como muestra la Figura 8. El ABC representada en la figura en color verde permite la cuantificación del grado de afectación de cada FA a los diferentes tratamientos. De esta forma y a modo de ejemplo, el tratamiento a 36 °C muestra un ABC mayor al del control y a su vez, el tratamiento de 40°C muestra un ABC mayor al resto de los tratamientos. Una vez determinados el ABC para cada uno de los tratamientos medidos en unidades arbitrarias, fue posible realizar análisis estadísticos para establecer diferencias significativas entre los tratamientos.

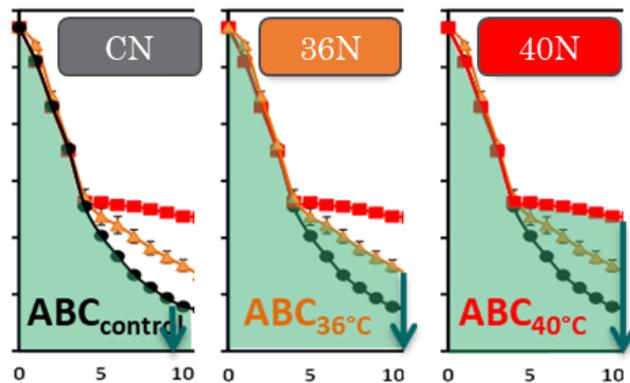


Figura 8: Representación gráfica de la cuantificación del área bajo la curva (ABC).

El análisis de los datos fisicoquímicos de los vinos finales, se realizó mediante ANOVA utilizando el programa InfoStat de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Córdoba (FCA-UNC).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tal como se mencionó en la introducción, las fermentaciones de uvas tintas son habitualmente llevadas a cabo a temperaturas de entre 18 y 30 °C. Sin embargo, pueden ocurrir elevaciones térmicas durante la FA asociadas tanto a factores externos como la elevada temperatura ambiental o factores internos, propios de la fermentación, como el calor producido por el activo metabolismo de las levaduras, el cual puede además verse favorecido por la nutrición nitrogenada de los mostos es estadios de fermentación tumultuosa. Estudios previos del grupo mostraron que aumentos bruscos aplicados en etapas tempranas de la fermentación producen alteraciones en la cinética de fermentación cuya intensidad depende de la temperatura aplicada y de la cepa de *S. cerevisiae* utilizada (Vargas y col., 2020). En dicho trabajo también se demostró que el incremento de la temperatura produce una caída en la proporción de células viables. Para esta tesis se propuso evaluar la sensibilidad de diferentes cepas de *S. cerevisiae* a elevaciones bruscas de la temperatura aplicados en estadios tempranos de la vinificación, de manera de ampliar y validar los datos obtenidos en dicho estudio previo.

4.1. Determinación del impacto del shock térmico en la cinética de la FA

Con el objetivo de abordar el estudio del efecto producido por el shock térmico, se llevaron a cabo fermentaciones a escala de laboratorio las cuales fueron inoculadas con 4 cepas diferentes de *S. cerevisiae*: Enoferm M2, Lalvin EC1118, Lalvin BM45 y Lalvin ICDV21. Las FA fueron llevadas a cabo a 28 °C, en el día 3 se realizó la nutrición con 200 mg/l de DAP y se aplicaron shocks térmicos a 36 °C y 40 °C durante 16 horas. Las FA fueron monitoreadas a través de la medición de densidad.

Los resultados mostraron que todas las cepas estudiadas finalizaron la FA en el mismo tiempo en la situación control (28 °C) (Tabla 2). Sin embargo, ante a los diferentes tratamientos térmicos, la duración fue diferente para las diferentes cepas estudiadas.

Tabla 2: Duración de las FA en días para los diferentes tratamientos.

Cepas	TC	T36	T40
Enoferm M2	12,67±0,58(a)	30,67±0,58(b)	30±0(b)
Lalvin EC1118	12,67±0,58(a)	12,33±0,58(a)	16,33±0,58(b)
Lalvin BM45	13,33±1,15(a)	19±1(b)	18,67±1,15(b)
Lalvin ICDV21	12,33±0,58(a)	13±0(b)	13±0(b)

Los valores expresan la duración de la FA en días ± desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos dentro de la misma cepa según test de Fisher $p < 0,05$.

Se observó que la cepa **Enoferm M2**, fue la más afectada por los shocks térmicos, tanto a 36 °C como a 40 °C, duplicando en ambos casos el tiempo necesario para finalizar la FA. En este sentido, la condición control finalizó la FA en aproximadamente 13 días, mientras que en los tratamientos T36 y T40 se requirieron 30 días para consumir la totalidad de los azúcares. No se observaron diferencias entre los tratamientos T36 y T40 respecto a la duración de la FA, es decir ambos shocks térmicos produjeron un impacto similar en términos de duración de la FA para esta cepa (Tabla 2). No obstante, cuando se analizó el ABC y se realizaron

comparaciones estadísticas, pudo observarse una diferencia significativa entre los tres tratamientos. Particularmente en los días inmediatamente posteriores al shock térmico se observó un menor impacto del shock térmico a 36 °C con respecto al shock térmico a 40 °C (Figura 9). Sin embargo, en el largo plazo ambos tratamientos mostraron un perfil similar, requiriendo en ambos casos el mismo tiempo para finalizar la FA (Tabla 2).

En el caso de la cepa **Lalvin EC1118**, se observó un claro impacto de ambos tratamientos térmicos sobre el perfil de FA, donde ambas curvas de fermentación se diferencian claramente de las de la fermentación control (Figura 9). El tratamiento T36, se diferencia del control respecto a la curva de FA luego del shock térmico mostrando diferencia significativa en su ABC. Curiosamente, la duración de la FA no se diferenció de la del control (Tabla 2), sugiriendo una rápida capacidad de recuperación de esta cepa al estrés térmico de menor intensidad. En contraste, cuando la temperatura aplicada fue de 40 °C, la FA presentó una duración de 18 días (Tabla 2) y el análisis del ABC mostró diferencias estadísticamente significativas (Figura 9).

El análisis de los resultados obtenidos para la cepa **Lalvin BM45** mostró una diferenciación del comportamiento de esta cepa con respecto a las dos previamente descritas. En este caso, se observó que los shocks térmicos a 36 y a 40 °C produjeron efectos similares en el perfil de FA, donde ambas curvas se vieron prácticamente solapadas (Figura 9). En este sentido, temperaturas diferentes representaron un estrés similar y esto se reflejó también en los valores de ABC, donde no se observaron diferencias significativas entre ambos tratamientos, pero sí con respecto al control. Finalmente, ambos tratamientos produjeron un retraso similar en el tiempo necesario para la finalización de la FA, ya que en ambos casos fueron requeridos 20 días mientras que el control de la FA de esta cepa finalizó a los 13 días de FA (Tabla 2).

Finalmente, la cepa **Lalvin ICDV21** fue la que mostró mayor solidez en la capacidad de respuesta al shock térmico tanto de 36 °C como de 40 °C. En las curvas de la cinética de FA se pudo observar que ambos tratamientos se diferenciaron del tratamiento control y mostraron un perfil similar entre ellos. Asimismo, los datos del ABC permitieron ver diferencias significativas entre ambos tratamientos y también con respecto al control (Figura 9). Sin embargo, es interesante destacar que ambos tratamientos finalizaron la FA en el día 13, mientras que el control lo hizo entre el día 12 y 13 (Tabla 2). Si bien esta diferencia en la duración de la FA es estadísticamente significativa, en los términos prácticos a nivel enológico el efecto de ambos tratamientos no tiene impacto sobre el proceso fermentativo. Esto sugiere que esta cepa presenta una buena capacidad de respuesta y recuperación al stress térmico, incluso frente a la mayor temperatura aplicada (T40), posibilitando que ambos tratamientos de shock térmico finalicen el consumo de los azúcares prácticamente al mismo tiempo que la FA control (Tabla 2).

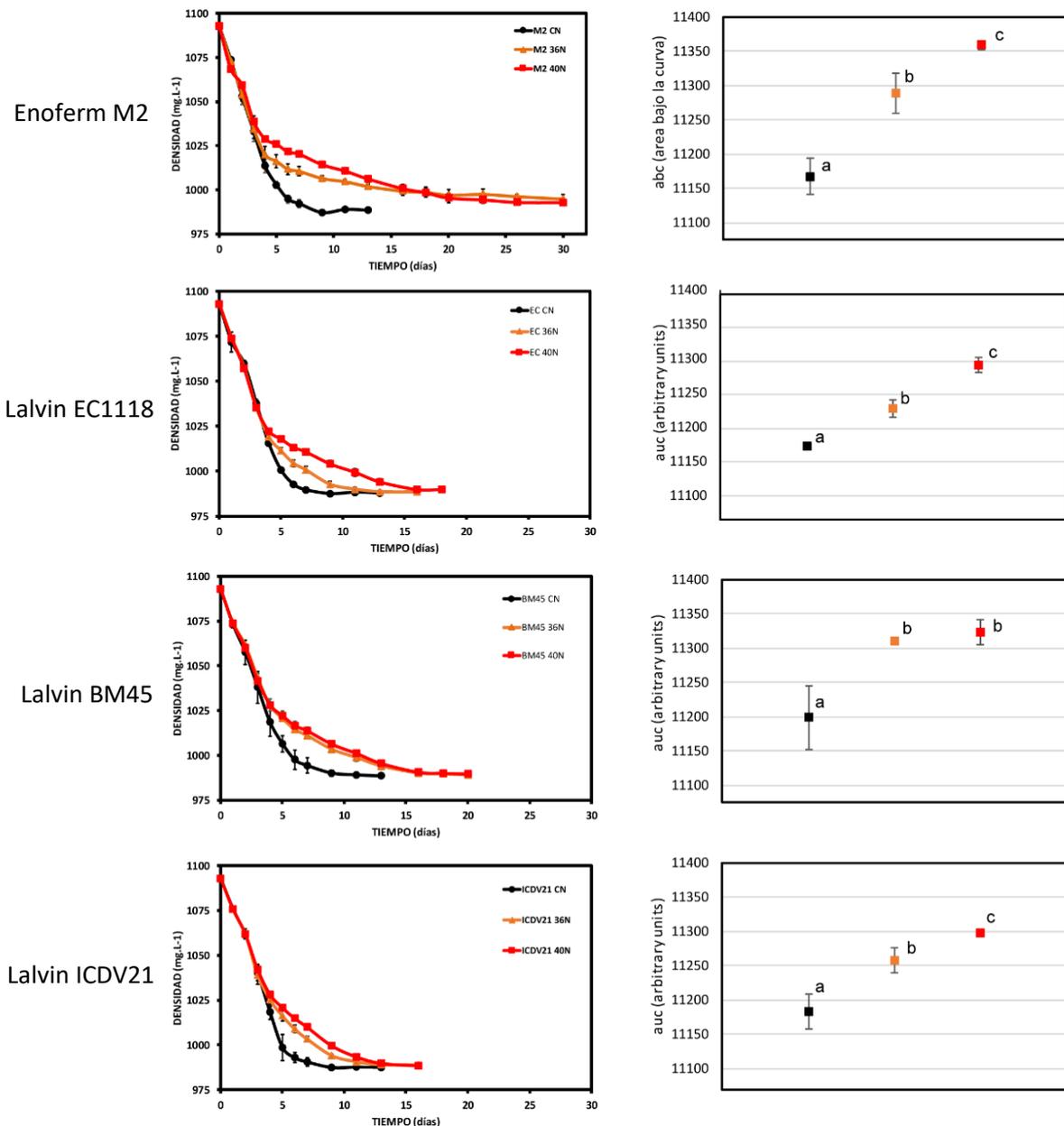


Figura 9: Perfiles de FA y análisis estadístico de las mediciones de ABC (área bajo la curva) diferentes letras significan diferencias estadísticas según test LSD Fisher $p < 0,05$.

4.2. Efecto del shock térmico sobre la vitalidad celular

El estado fisiológico (vitalidad y viabilidad) de las cepas de *S. cerevisiae* evaluadas en presente trabajo fue determinado mediante citometría de flujo asociada a tinciones fluorescentes específicas. Como se describió en la metodología los fluorocromos que se emplearon fueron: 5-carboxifluoresceína diacetato de acetoximetil éster (CFDA,AM) e Ioduro de Propidio (IP), ambos incluidos en el Kit FungaLight™. Estos fluoróforos permitieron clasificar e identificar poblaciones de células vitales, células vitales con daño en la membrana y células no vitales (muertas) en la muestra de análisis. Además, mediante el uso del citómetro de flujo se pudo analizar un gran número de células en pocos minutos aportando una cuantificación sólida del estado fisiológico de la población celular en estudio en momentos específicos de interés.

Para establecer la distribución de las diferentes poblaciones en la muestra de estudio se definieron áreas o “gates”, las cuales identificaron a cada población: 1) células vitales (CFDA+, IP-), 2) células vitales con daño en la membrana (CFDA+, IP+), y 3) células no vitales (CFDA-,IP+) (Figura 10). Para poder definir las áreas se emplearon controles de células vitales (cultivo fresco) y de células no vitales (células muertas por calor mediante un tratamiento a 90 °C durante 10 minutos). Los datos se reflejaron en gráficos de puntos, donde cada punto representa una célula analizada, cuya ubicación dependió de su estado fisiológico y por ende de su tinción fluorescente. En este caso, la fluorescencia verde (CFDA,AM) se ubica en el eje “y” mientras que la fluorescencia roja (IP) se muestra en el eje “x”.

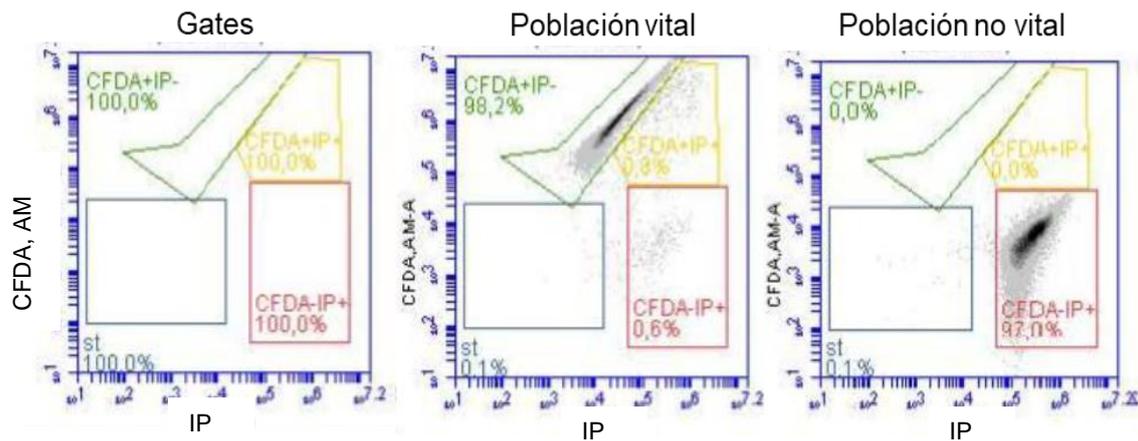


Figura 10: Definición de áreas de recuento de las diferentes poblaciones en las muestras control vital y no vital analizadas por citometría de flujo. Se observa que la población vital se ubica principalmente en el área verde y amarillo, mientras que la población no vital, la mayoría de los puntos están localizados en el área roja.

Los datos de vitalidad celular obtenidos con el citómetro de flujo se graficaron mediante curvas, permitiendo una mejor visualización de la distribución porcentual de células vitales y no vitales en las muestras de estudio. La Figura 10 muestra a modo de ejemplo cómo se distribuyen las poblaciones celulares en las diferentes condiciones estudiadas. El perfil de color rojo representa células no vitales (IP +), el perfil verde corresponde a células vitales (CFDA+), y a su vez este último se muestra junto con las células vitales con daño de membrana (CFDA+ IP+) (perfil amarillo), representando ambas poblaciones células vitales.

En la Figura 11, se muestra la distribución de poblaciones celulares correspondientes a las FA de la cepa Lalvin EC1118 en el día 10. De este modo, se pudo observar el porcentaje de células vitales y no vitales en cada tratamiento. Específicamente y a modo de ejemplo para esta cepa se observó que en la condición control, el 44,1% de las células de la población son no vitales (Figura 11 A y D). Dicho porcentaje fue elevado considerando que se trata de células que no fueron sometidas a estrés térmico, sin embargo, este porcentaje de células no vitales fue esperable en una FA avanzada, probablemente ya entrando fase de muerte, ya que la duración de la FA de esta cepa en condiciones control fue de 13 días. En contraste, el porcentaje de células no vitales fue mayor al control en T36 (58,8%) (Figura 11 B y E) y mayor aun en T40 (78,4%) (Figura 11 C y F). De esta forma, esta metodología permitió cuantificar el impacto del estrés térmico en la condición fisiológica de las células, en diferentes momentos de la FA. Cabe aclarar que, la población de células vitales, aunque con daño en la membrana

celular (PI+ CFDA+), población amarilla, mostró en todas las muestras valores pequeños y muy variables, por lo que se las incluyó dentro de la categoría células vitales, la cual tiene en cuenta entonces la sumatoria de todas las células CFDA+ independientemente de la condición de su membrana o valor de IP. Células viables = (PI- y CFDA+) + (PI+ y CFDA+).

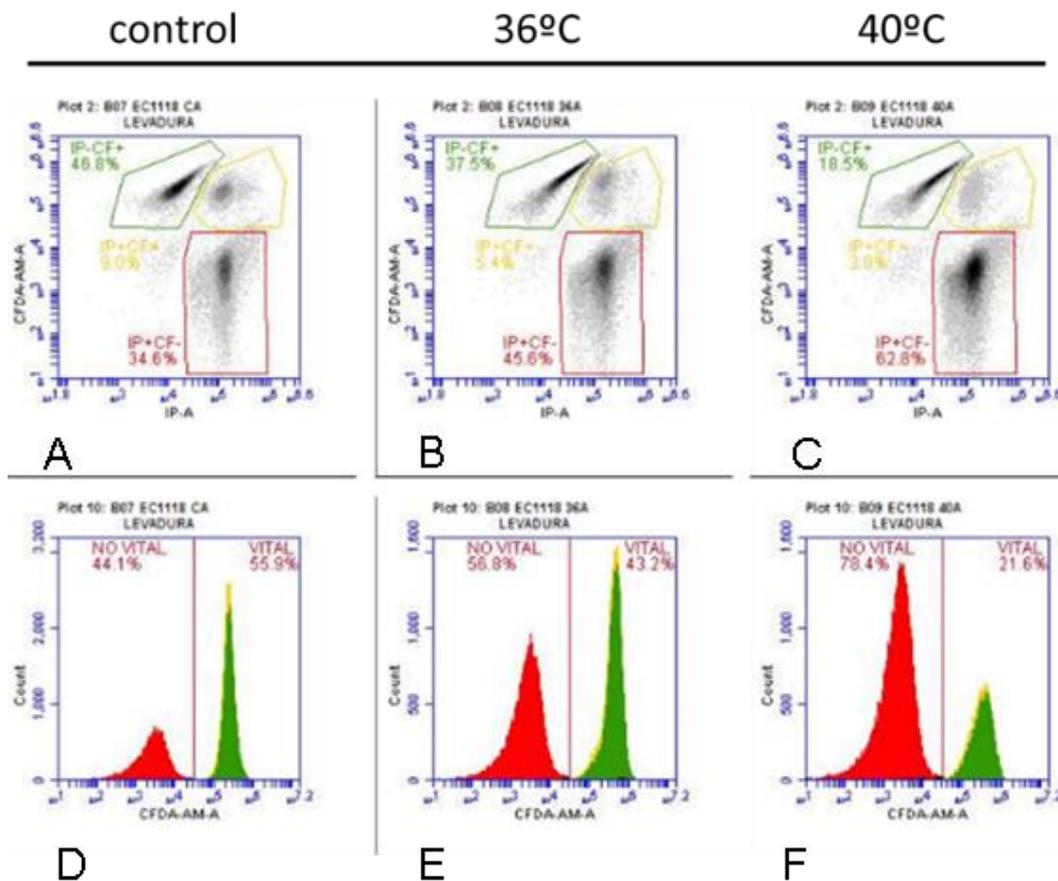


Figura 11: Gráficos de distribución de las poblaciones vitales y no vitales cuantificadas por citometría de flujo, gráfico de densidad de puntos (A-C), y gráficos de curvas de intensidad de fluorescencia (D-F). Los datos mostrados corresponden a la cepa Lalvin EC1118 en condiciones: control, 36 y 40 °C el día 10 de la FA.

Cada categoría fisiológica de las levaduras (vitales y no vitales) fueron graficadas en porcentajes para cada tratamiento. Este análisis del estado fisiológico de las levaduras se realizó para el día 10 y 17 de la FA.

En la Figura 12 se muestran las categorías fisiológicas para todos los tratamientos y cepas estudiadas analizados el día 10 de la FA.

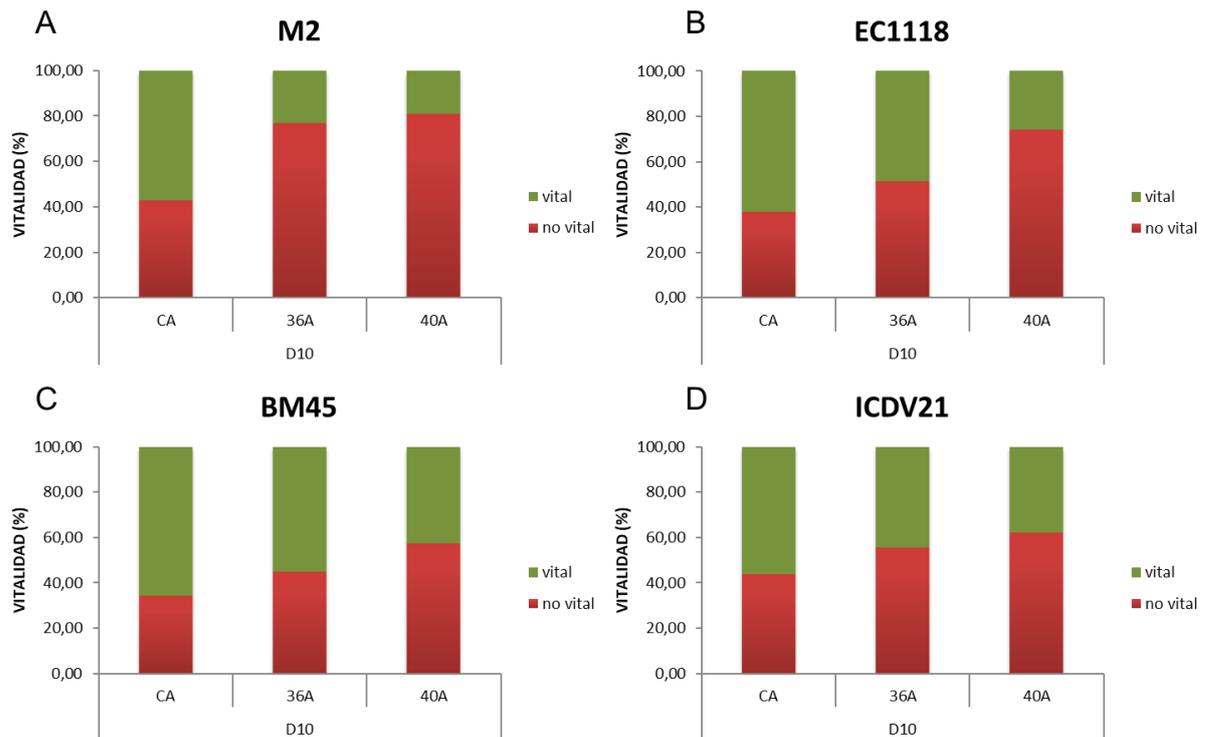


Figura 12: Porcentaje de células vitales y no vitales de las levaduras en el día 10 de la FA correspondiente a cada uno de los tratamientos evaluados (A) M2, (B) EC1118, (C) BM45 y (D) ICDV21.

Para la levadura **Enoferm M2**, se observó una marcada disminución de la población vital al día 10 con respecto al control tanto para el tratamiento a 36 °C como a 40 °C (Figura 12A). Asimismo, también se pudo determinar un porcentaje importante de células no vitales aún en la condición control, lo cual, como se mencionó anteriormente, fue esperable teniendo en cuenta que se trataba de células correspondientes a las últimas etapas de una fermentación normal (fase estacionaria – fase de muerte). Por otro lado, esta cepa fue la que mostró mayor sensibilidad a los tratamientos aplicados en la cinética de la FA, evidenciando un significativo retraso en la FA para los 2 tratamientos (Figura 9). En este sentido, se determinó una clara correlación entre los resultados obtenidos en la cinética de FA y el estado fisiológico posterior al shock térmico para esta cepa. La disminución de células vitales luego de ambos shocks térmicos explicaría en este caso el impacto observado sobre la cinética de FA. Finalmente, luego de ambos shocks térmicos se observó un porcentaje similar de células no vitales, sugiriendo que para esta cepa no habría diferencias en términos ni de vitalidad ni de cinética de FA entre los tratamientos a 36 °C o 40 °C, ya que ambos shocks la afectaron de manera similar.

En la cepa **Lalvin EC1118**, se observó una disminución de la población vital proporcional a la intensidad del shock térmico aplicado. De esta manera, se evidenció una mayor caída en la población vital a 40 °C donde se observó solo un 20% de células vitales. Mientras tanto, a 36 °C se observó una población vital mayor, aunque inferior a la que se obtuvo en el control para el mismo tiempo (Figura 12B). Con respecto a la cinética de FA, el shock térmico de 36 °C, si bien mostró una alteración del perfil de FA, no hubo retrasos en la finalización de la FA, la cual tuvo una duración igual al control (13 días). Esto último pudo ser explicado a partir de los datos de vitalidad, que mostraron un elevado porcentaje de células vitales luego del shock térmico a 36 °C, las cuales fueron capaces de finalizar la FA en el mismo tiempo que el control.

Para el caso de la cepa **Lalvin BM45**, luego del shock a 36 °C no se observó una caída significativa de la vitalidad con respecto al control, aunque dicha caída fue ligeramente mayor en las muestras correspondientes a 40 °C (Figura 12C). Esta cepa mostró elevados porcentajes de células vitales post shock térmico (55% a 36°C y 40% a 40°C). Sin embargo, la elevada vitalidad observada no logró compensar el retraso en la finalización de la FA para ambos tratamientos. Curiosamente, en esta cepa la cinética de la FA fue afectada de igual manera ante ambos tratamientos térmicos, requiriendo el mismo tiempo para finalizar la FA tanto a 36 °C como 40°C (alrededor de 19 días). En este caso, los datos de citometría de flujo no explicaron con claridad la cinética de la FA. Esto último sugirió que en esta cepa la caída de la vitalidad no explica el retraso de la FA, sino que probablemente se trate de una disminución en la capacidad metabólica de consumo de azúcares por parte de estas levaduras, debido a posibles daños provocados por los shocks térmicos aplicados.

Finalmente, para el caso de la levadura **Lalvin ICDV21** se observó una caída en los porcentajes de células vitales proporcional a la intensidad de los tratamientos térmicos (36 °C y 40°C) en relación con el control (Figura 12D). En esta cepa, los datos de cinética de FA mostraron que todos los tratamientos finalizaron la fermentación al mismo tiempo (13 días), sin manifestar retraso en la FA (Figura 9). En este sentido, la elevada vitalidad determinada en el día 10 (3 días antes de la finalización de la FA), explicaría la mayor termorresistencia observada para esta cepa.

En aquellas FA que mostraron un retraso en la duración de la FA con respecto al control, se realizó una segunda determinación de la vitalidad celular en el día 17 de la fermentación. Se evaluó el estado fisiológico en los siguientes casos: Enoferm M2 T36 y T40, EC1118 T40 y BM45 T36 y T40. Además, se tuvieron en cuenta los controles de cada una de esas cepas en el día 17, lo que permitió un análisis comparativo del estado fisiológico de las levaduras en un estadio avanzado de una FA normal.

En el caso de la levadura que mostró mayor sensibilidad al shock térmico, **Enoferm M2**, se observó una evidente y significativa caída en el porcentaje de células vitales para todos los casos en el día 17 de la FA. Esta caída en la vitalidad se observó también en la condición control, lo cual es esperable teniendo en cuenta que esta FA había finalizado en el día 13, es decir que se trata de células que corresponden a una FA en fase de muerte. Al mismo tiempo el pequeño porcentaje de células vitales a 36 y 40 °C y su evidente capacidad para recuperar la vitalidad explicó el significativo enlentecimiento observado para esta cepa (Figura 13).

La cepa **Lalvin EC1118** mostró una duración de la FA significativamente mayor solo en el shock térmico de 40 °C, que terminó la FA el día 16,33, mientras que el control lo hizo en el día 13. La determinación de vitalidad en el día 17 para fermentaciones sometidas a 40 °C mostró un porcentaje de alrededor del 16% de células vitales. Se observó un porcentaje de células vitales menor al observado para la misma condición en el día 10 de la FA (alrededor del 25%). Es decir, el shock térmico a 40 °C produjo una pérdida en la vitalidad celular la cual fue aumentando a medida que avanzaba la FA, posiblemente asociada a otros factores de estrés a finales de la FA que produjo la pérdida de vitalidad en aquellas células dañadas. A pesar de esto, el 16% de células vitales fue suficiente para permitir la finalización de la FA.

Finalmente, la cepa **Lalvin BM45** mostró un porcentaje elevado de células vitales en el día 17, teniendo en cuenta el momento de la FA en que fue evaluado. Se observó alrededor de un 40% de células vitales tanto en T36 como en T40. En estos tratamientos las FA finalizaron alrededor del día 19. La elevada vitalidad celular observada en el día 17 para esta cepa no parece haber explicado adecuadamente la afectación observada en la cinética de FA, como había sido previamente observado en el análisis de vitalidad del día 10 de la FA (Figura 12). Esto último podría sugerir que en este caso la afectación celular por el shock térmico estaría relacionada con una menor capacidad metabólica de esta cepa y no tanto con la pérdida de vitalidad. Este hallazgo abre una interesante puerta para evaluar el efecto del shock térmico sobre el metabolismo de esta levadura.

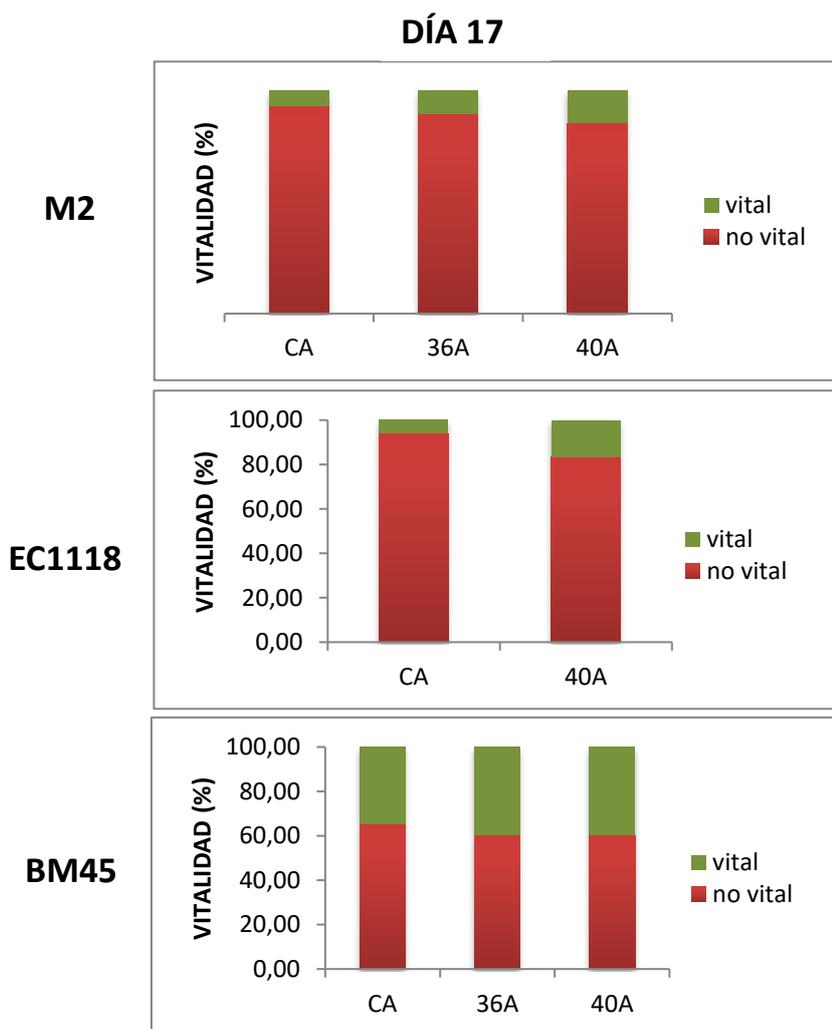


Figura 13: Porcentaje de células vitales y no vitales en el día 17 de la FA correspondiente a aquellos tratamientos que mostraron enlentecimiento: M2 (36 y 40 °C), EC1118 40 °C y BM45 (36 y 40 °C). Todos los tratamientos se muestran con su control respectivo en el mismo momento a pesar de que los TC ya habían finalizado la FA.

4.3. Análisis fisicoquímicos de los vinos obtenidos

Una vez finalizadas las FA, se realizó el análisis fisicoquímico de los vinos obtenidos utilizando el equipo Alpha-Wine Analyzer, cuyos principales resultados se resumen en la tabla 3.

En términos generales, a pesar de los retrasos en las fermentaciones producidas por los shocks térmicos, ninguna de las FA se detuvo completamente y en todos los casos se produjo un consumo total de los azúcares reductores. Particularmente, solo la cepa **Enoferm M2** mostró una concentración de azúcares reductores superior a 4 g/l en el tratamiento a T36 (6,4 g/l finales) a los 30 días, cuando el ensayo fue concluido. Debido a la bajo concentración de azucares residuales es posible que esta cepa haya consumido la totalidad de los azucares en los días sucesivos.

Tabla 3: Análisis fisicoquímicos de los vinos obtenidos en cada tratamiento.

Enoferm M2			
	28°C	36°C	40°C
Duración FA	13	30	30
Az reductores	3,43±1,5	6,4±7,42	1,07±0,23
Glucosa	2,47±0,55	1,27±0,4	0,1±0,17
Fructosa	0,97±0,99	5,13±7,07	0,1±0,17
Ac. acético	0,91±0,05(a)	1,26±0,02(b)	1,32±0,08(b)
Etanol	12,7±0,26(a)	8,43±0,42(b)	8,37±0,32(b)
Glicerol	7,43±0,49(a)	8,03±0,31(ab)	8,37±0,23(b)

EC1118			
	28°C	36°C	40°C
Duración FA	13	13	18
Az reductores	1,73±0,31 (a)	1,2±1,13 (a)	1,17±0,93 (a)
Glucosa	1,73±0,31 (a)	0,7±0,36 (b)	0,63±0,25 (b)
Fructosa	0±0 (a)	0,5±0,78 (a)	0,53±0,92 (a)
Ac. acético	0,88±0,02 (a)	1,06±0,05 (b)	1,13±0,05 (b)
Etanol	12,67±0,38 (a)	12,47±0,64 (a)	12,43±0,23 (a)
Glicerol	7,1±0,1 (a)	7,8±0,3 (b)	8,33±0,12 (c)

BM45			
	28°C	36°C	40°C
Duración FA	13	20	20
Az reductores	1,5±0,79 (a)	1±0,44 (a)	0,43±0,45 (a)
Glucosa	0,5±0,46 (a)	0,6±0,26 (a)	0,43±0,45 (a)
Fructosa	1±0,92 (a)	0,4±0,69 (a)	0±0 (a)
Ac. acético	1,09±0,05 (a)	1,14±0,04 (a)	1,07±0,08 (a)
Etanol	13,67±0,21 (a)	12,43±0,25 (b)	12,07±0,31 (b)
Glicerol	7,57±0,49 (a)	6,93±0,43 (a)	7,57±0,15 (a)

ICDV21			
	28°C	36°C	40°C
Duración FA	13	13	13
Az reductores	0,6±0,3 (a)	2,17±0,4 (b)	4±1,05 (c)
Glucosa	0,6±0,3 (a)	1,03±0,32 (a)	0,9±0,56 (a)
Fructosa	0±0 (a)	1,13±0,21 (b)	3,1±0,5 (c)
Ac. acético	0,98±0,02 (a)	1,01±0,04 (a)	1,02±0,01 (a)
Etanol	13,73±0,21 (a)	12,97±0,35 (b)	13,3±0,26 (ab)
Glicerol	7,8±0,4 (a)	7,37±0,38 (a)	7,3±0,26 (a)

Los datos representan el valor promedio de las réplicas y su desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas para cada parámetro entre tratamientos dentro de la misma cepa según Test LSD Fisher $p < 0,05$.

En el caso de la cepa **Enoferm M2**, se observó una marcada caída en los niveles de etanol en los tratamientos sometidos a shock térmico, disminuyendo en más de 4 grados tanto en T36 como en T40, con respecto al control (Tabla 3 y Figura 14). Curiosamente, se observó también un incremento en la concentración de glicerol, que fue proporcional a la temperatura del shock térmico aplicado. Este resultado podría atribuirse a que la síntesis de glicerol se asocia a las respuestas al estrés térmico y oxidativo, lo cual podría haber redireccionado parte del flujo metabólico de la glucólisis hacia la producción de glicerol en lugar de etanol. Sin embargo, este incremento en la concentración de glicerol podría no explicar completamente la significativa disminución en la concentración de etanol, el cual también puede asociarse a una parcial volatilización debido a que las FA sometidas a shock térmico demoraron 30 días en finalizar. Por último, se presentaron diferencias significativas en la producción de acidez volátil de ambos tratamientos térmicos respecto al control. Parte de la producción de acético podría deberse a la oxidación del etanol luego de los shocks térmicos, relacionándose entonces con la disminución del contenido de etanol para estos tratamientos con respecto al control.

Para la cepa **Lalvin EC1118** no se vieron diferencias en las concentraciones finales de etanol (Tabla 3 y Figura 14). Sin embargo, se observaron diferencias significativas en las concentraciones finales de glicerol, siendo las concentraciones más altas a mayor temperatura aplicada. En este caso, la mayor producción de glicerol a temperaturas elevadas podría formar parte de la respuesta celular frente al shock térmico. En este sentido, el glicerol tiene un importante rol en *S. cerevisiae*, actuando como agente protector frente a estrés osmótico oxidativo e incluso térmico (Folch-Mallol y col., 2004). Para esta cepa también se observó un incremento en la acidez volátil en las FA sometidas a shock térmico de 36 °C y dicho incremento fue aún mayor en los tratamientos a 40 °C.

Por otro lado, la levadura **Lalvin BM45** presentó una caída significativa en la concentración de etanol en las FA sometidas a shock térmico, aunque su magnitud no fue tan marcada como la observada para Enoferm M2 (Figura 14). Con respecto a la acidez volátil, particularmente esta cepa evidenció una mayor producción de acético a 36 °C respecto a 40 °C, relacionándose esto con un menor valor presentado de glicerol para el tratamiento térmico de menor intensidad. La mayor producción de volátil en el tratamiento a 36 °C se puede correlacionar con una disminución del agente protector (glicerol) en dicho tratamiento, aunque dichas diferencias no fueron significativas.

Finalmente, se observó para la cepa **Lalvin ICDV21** una disminución pequeña, aunque significativa, en la concentración de etanol solo en el tratamiento a 36 °C. Por otro lado, no fueron observadas diferencias para ninguno de los tratamientos en la concentración final de glicerol y ácido acético. En términos generales, esta cepa fue la que mostró menor variabilidad en cuanto a concentración de etanol y glicerol frente a los tratamientos aplicados. Asimismo, esta cepa fue la menos afectada por los tratamientos, ya que ninguno de los mismos produjo un retraso en la FA, y todas consumieron los azúcares en el mismo tiempo que el control (13 días, Tabla 2).

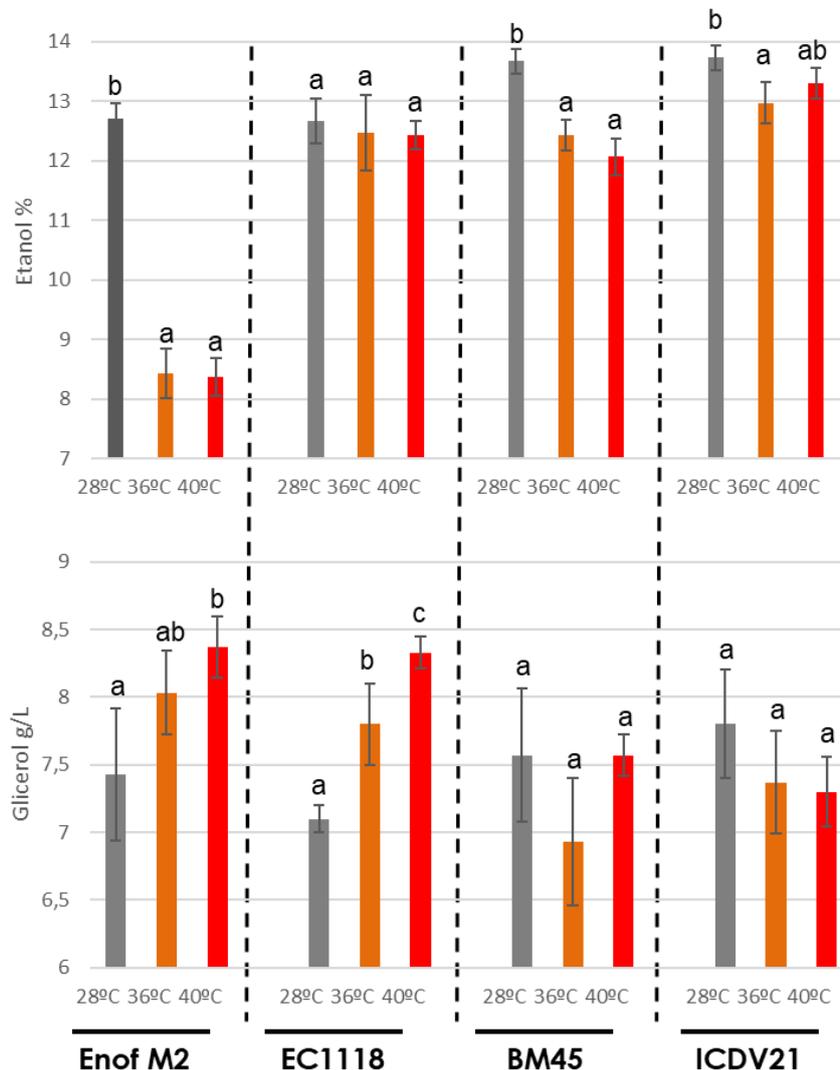


Figura 14: Análisis fisicoquímico de las FA, comparación para cada cepa entre los diferentes tratamientos. Letras diferentes corresponden a diferencias estadísticamente significativas según Test LSD Fisher $p < 0,05$.

Además, se realizó un análisis comparativo entre cepas para un mismo tratamiento, cuyo objetivo fue evaluar la variabilidad de las cepas frente a una misma condición (Figura 15). Ya en la condición control se pudieron establecer claras diferencias entre cepas en cuanto a la concentración final de etanol, donde Lalvin BM45 y Lalvin ICDV21 presentaron niveles de etanol significativamente superiores a las otras dos cepas, Enoferm M2 y Lalvin EC1118. Teniendo en cuenta que se trata en este caso de controles, donde todas las FA partieron del mismo mosto, estas diferencias dieron cuenta de variaciones inherentes a cada cepa. Esto no ocurrió cuando se analizó el contenido final de glicerol, donde no se evidenciaron diferencias significativas para ninguna de las cepas en la condición control.

Cuando se compararon los resultados entre cepas sometidas a shock térmico de 36 °C, sólo se observó una caída significativa en los niveles de etanol en el caso de la cepa Enoferm M2,

tal como fue discutido anteriormente. En el resto de las levaduras no se visualizaron diferencias ni en el contenido de etanol ni en el de glicerol.

Por último, a 40 °C Enoferm M2 mostró un contenido final de etanol significativamente menor con respecto a las otras 3 cepas evaluadas, algo similar a lo que se determinó a 36 °C. Mientras que la misma cepa EnofermM2, y también Lalvin EC1118, evidenciaron concentraciones de glicerol significativamente mayores a las otras dos cepas evaluadas (Lalvin BM45 y Lalvin ICDV21).

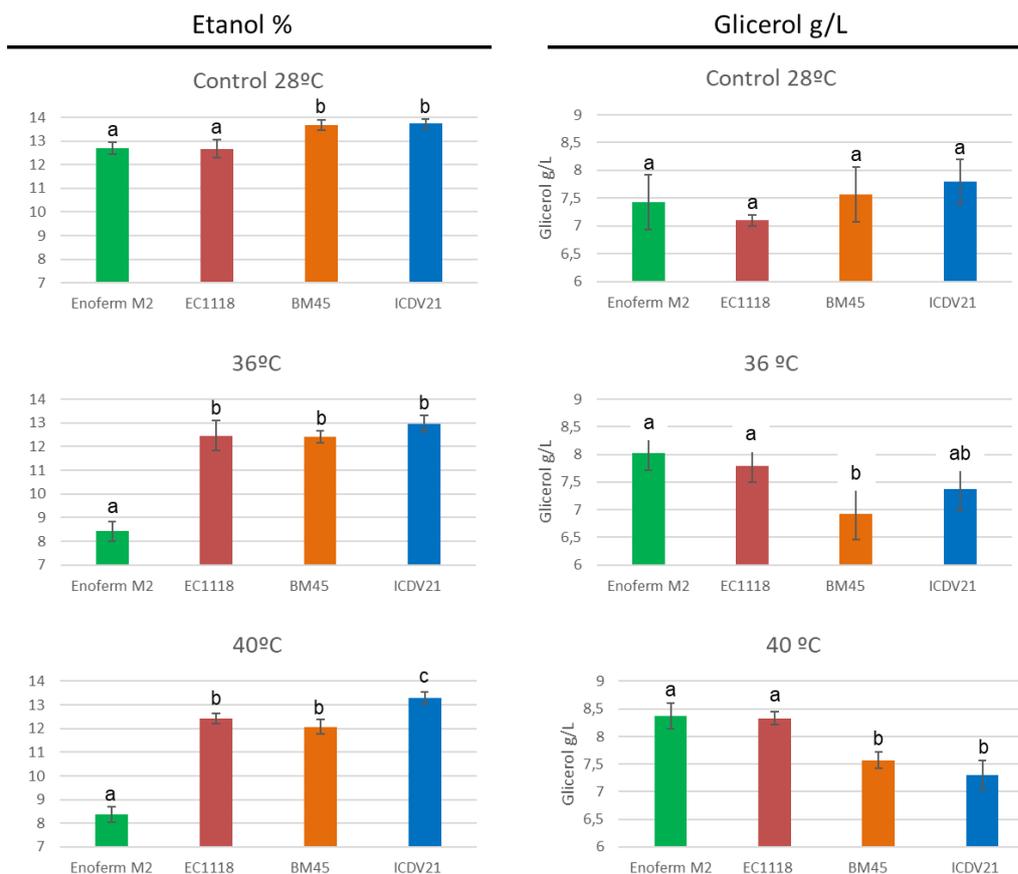


Figura 15: Análisis fisicoquímico de las FA, comparación entre cepas para cada tratamiento. Letras diferentes corresponden a diferencias estadísticamente significativas según Test LSD Fisher $p < 0,05$.

5. CONCLUSIONES

Así como se mencionó en la introducción, las FA enlentecidas constituyen un problema que afecta ampliamente a la industria vitivinícola. Las causas de FA problemáticas son diversas y en general se deben a una combinación de factores más que al efecto de un único factor. En este trabajo se propuso estudiar el efecto producido por un shock térmico de corta duración sobre el perfil de la FA y sobre la vitalidad de las levaduras. Se utilizaron 4 cepas de *S. cerevisiae* comerciales, y todas mostraron un diferente grado de afectación frente a un incremento brusco de la temperatura, tanto en términos de cinética de FA como en el estado fisiológico de las células luego del shock térmico. Estos resultados contribuyen a ampliar el estudio de estrés térmico abordado por el grupo y publicado previamente (Vargas et al., 2020). Los ensayos desarrollados en esta tesis aportan información valiosa acerca de la variación interespecífica dentro de cepas vínicas de *S. cerevisiae* en relación con su resistencia al estrés térmico de cepas y confirmar los resultados previamente obtenidos, donde un shock térmico de 40°C resulta una condición crítica para la industria del vino ya que produce enlentecimientos de las fermentaciones para todas las cepas de levaduras y medidas correctivas deberían tomarse de manera temprana. Además, los resultados obtenidos representan los estudios base para futuras investigaciones sobre los mecanismos de respuesta de las diferentes cepas de *S. cerevisiae* frente a una misma condición y sentar las bases para estrategias de selección de levaduras adaptadas a condiciones térmicas elevadas, que puedan dar respuesta a problemas asociados con el calentamiento global.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Alejandre, M. M. L. (2007). Manual de Viticultura, Enología y Cata. Editorial Almuzara, España.
- Alsammar, H. & Delneri, D. (2020). An update on the diversity, ecology and biogeography of the *Saccharomyces* genus. *FEMS Yeast Research*, 20(3), foaa013.
- Beltran, G., Esteve-Zarzoso, B., Rozès, N., Mas, A., & Guillamón, J. M. (2005). Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(4), 996-1002.
- Bely, M., Sablayrolles, J. M., & Barre, P. (1990). Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 70(4), 246-252.
- Bernardi, A. M. (2013). Selección de levaduras vínicas provenientes de la provincia de Mendoza (Tesina de grado de Licenciatura en Bromatología, Universidad Nacional de Cuyo. Facultad de Ciencias Agrarias).
- Bisson, L. F. (1999). Stuck and sluggish fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(1), 107-119.
- Bisson, L. (2002). DIAGNÓSTICO Y REACTIVACIÓN DE LAS PARADAS DE FERMENTACIÓN. *REVISTA INTERNET DE VITICULTURA Y ENOLOGÍA*, 11(1), 1-13.
- Bisson, L. (2005). Fermentaciones ralentizadas o detenidas. *Revista Internet de Viticultura y Enología*, 10 (2). Disponible en: <https://www.infowine.com/intranet/libretti/libretto2516-01-1.pdf>
- Carrascosa, A. V., Muñoz, R., & González García, R. (2005). Microbiología del vino. AMV ediciones.
- Carrascosa, A. V., Muñoz, R., & González, R. (Eds.). (2011). *Molecular wine microbiology*. Cham, Switzerland: Elsevier.
- Chan, J. M., Zervantonakis, I. K., Rimchala, T., Polacheck, W. J., Whisler, J., & Kamm, R. D. (2012). Engineering of in vitro 3D capillary beds by self-directed angiogenic sprouting. *PLoS One*, 7(12), e50582.
- Combina M., Mercado L., Borgo P., Elía A., Jofré V., Ganga A., Martínez C., Catania C. (2005a) Yeasts associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina. *Journal of Applied Microbiology* 98(5): 1055-1061.
- Combina M., Elía A., Mercado L., Catania C., Ganga A., Martínez C. (2005b) Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 99(3): 237-243.
- Coulter, A.D., Henschke, P.A., Simos, C.A., & Pretorius, I.S. (2008). When the heat is on, yeast fermentation runs out of puff. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal*, 23, 26–30
- Fernández, C., Baroni, A., Ríos Vera, M., Cantaloube, J., Bonamaison, C., Marianetti, A. (2019). *Matriz productiva para Mendoza* [Archivo PDF]. Instituto de Desarrollo rural. https://www.idr.org.ar/wp-content/uploads/2019/07/Matriz_Productiva_2019_1.pdf
- Fernández-Espinar T., Barrio E., & Querol A. (2003). Analysis of the genetic variability in the species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Yeast*, 20(14), 1213-1226.
- Folch-Mallol J.L., Garay-Arroyo A., Lleídas F y Covarrubias Robles A.A. (2004). La respuesta al estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 46 (1-2): 24-46
- García-Ríos, E., Gutiérrez, A., Salvadó, Z., Arroyo-López, F. N., & Guillamon, J. M. (2014). The fitness advantage of commercial wine yeasts in relation to the nitrogen concentration,

- temperature, and ethanol content under microvinification conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(2), 704-713.
- Guerrini, L., Angeloni, G., Baldi, F., & Parenti, A. (2017). Thermal effects of pump-overs during red wine fermentation. *Applied Thermal Engineering*, 112, 621-626.
- Gonzalez M.R., Sturm M.E., Lerena M.C., Rojo M.C., Chimeno V.S., Combina M., Mercado L.A. (2020) Persistence and reservoirs of *Saccharomyces cerevisiae* biodiversity in different vineyard niches. *Food Microbiology* 86: 103328.
- Hidalgo Togados, J. (Ed.) (2003) *Tratado de Enología I*. Ediciones Mundi Prensa, España
- INV (Instituto Nacional de Vitivinicultura) (2019). Regiones Vitivinícolas Argentinas. Provincia de Mendoza. Zona Valle de Uco.: https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/valle_de_uco_19.pdf
- INV (Instituto Nacional de Vitivinicultura) (2020). Informe Anual de superficie 2020: https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/anuario_superficie_2020.pdf
- Ivorra, C., Pérez-Ortín, J.E., & del Olmo, M. (1999). An inverse correlation between stress resistance and stuck fermentations in wine yeasts. *Biotechnology and Bioengineering* 64, 698–708.
- Ketela, T., Brown, J. L., Stewart, R. C., & Bussey, H. (1998). Yeast Skn7p activity is modulated by the Sin1p-Ypd1p osmosensor and contributes to regulation of the HOG pathway. *Molecular and General Genetics MGG*, 259(4), 372-378.
- Lonvaud-Funel, A. (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie Van Leeuwenhoek International* 76, 317–331.
- Lúquez, C.V., Formento, J.C. y Peralta, E.D. (2007). Las yemas, principal reservorio de levaduras entre los órganos aéreos vegetativos y reproductivos de la vid (*Vitis vinifera* var. Malbec). *Revista de la FCA UNCuyo*, 39, 83-91.
- Maisonnave, P., Sanchez, I., Moine, V., Dequin, S., & Galeote, V. (2013). Stuck fermentation: development of a synthetic stuck wine and study of a restart procedure. *International Journal of Food Microbiology*, 163(2-3), 239–247.
- Malherbe, S., Bauer, F., & Du Toit, M. (2007). Understanding problem fermentations-a review. *South African Journal for Enology and Viticulture* 28, 169–186.
- Maicas S. (2020). The Role of Yeasts in Fermentation Processes. *Microorganisms*, 8(8), 1142.
- Mercado L., Dalcero A., Masuelli 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. *Food Microbiology* 24: 403-412.
- Mercado L., Jubani S., Caggero C., Masuelli R., Combina M. (2010) Molecular relationship between *Saccharomyces cerevisiae* strains involved in winemaking from Mendoza, Argentina. *Current Microbiology* 61, 506-514.
- Mesas, J. M., & Alegre, M. T. (1999). El Papel De Los Microorganismos En La Elaboración Del Vino. *CYTA-Journal of Food*, 2(4), 174-183.
- Querol, A., Fernández-Espinar, M. T., del Olmo, M., & Barrio, E. (2003). Adaptive evolution of wine yeast. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1-2), 3-10.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (Eds.). (2006). *Handbook of enology, Volume 1: The microbiology of wine and vinifications (Vol. 1)*. John Wiley & Sons.
- Saldi S., Driscoll D., Kuskin D., Chang L. (2014) Image-based cytometric analysis of fluorescent viability and vitality staining methods for Ale and Lager fermentation yeast. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 72 (4):253-260.

Schmid, F., Schadt, J., Jiranek, V., & Block, D. E. (2009). Formation of temperature gradients in large- and small-scale red wine fermentations during cap management. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 15(3), 249-255.

Tonietto, J., & Carbonneau, A. (2004). A multicriteria climatic classification system for grape-growing regions worldwide. *Agricultural and Forest Meteorology* 124, 81–97.

Urtubia, A., Hernández, G., & Roger, J. M. (2012). Detection of abnormal fermentations in wine process by multivariate statistics and pattern recognition techniques. *Journal of Biotechnology*, 159(4), 336–341.

Valentine, G. D. S., Walker, M. E., Gardner, J. M., Schmid, F., & Jiranek, V. (2018). Brief temperature extremes during wine fermentation: effect on yeast viability and fermentation progress. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 25(1), 62-69.

Vargas, A. S., Lerena, M. C., Alonso-del-Real, J., Esteve-Zarzoso, B., Mercado, L. A., Mas, A., Querol A., & Combina, M. (2020). Effect of transient thermal shocks on alcoholic fermentation performance. *International Journal of Food Microbiology*, 312, 108362.