

Karla Riquelme Rodríguez

**ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES ENTRE LEVADURAS
VÍNICAS EN FERMENTACIONES ALCOHÓLICAS MIXTAS Y
SECUENCIALES, CON LEVADURAS INMOVILIZADAS Y LIBRES**

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

Dirigido por María Jesús Torija y Gemma Beltran

Máster en BEBIDAS FERMENTADAS

Facultad de Enología



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

**Tarragona
Septiembre 2021**

ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES ENTRE LEVADURAS VÍNICAS EN FERMENTACIONES ALCOHÓLICAS MIXTAS Y SECUENCIALES, CON LEVADURAS INMOVILIZADAS Y LIBRES

Riquelme, K., Torija MJ., Beltran G.

karlaester.riquelme@estudiants.urv.cat

Departamento de Bioquímica y Biotecnología, Facultad de Enología, Universitat Rovira i Virgili, Campus Sescelades, 43007 Tarragona, España

Palabras clave: inmovilización, alginato de sodio, inoculación secuencial, *Torulaspota delbrueckii*, interacciones entre levaduras, fermentación alcohólica

Índice

Resumen y palabras claves.....	4
Abstract and key words.....	5
1. Introducción	6
1.1 Sistemas de inoculación.....	6
1.2 <i>Torulaspota delbrueckii</i>	8
1.3 Interacciones entre levaduras.....	8
1.4 Estudios previos.....	9
1.5 Inmovilización de levaduras.....	11
2. Hipótesis.....	13
3. Materiales y métodos	14
3.1. Microorganismos	14
3.2. Preparación de inóculos de levaduras <i>S. cerevisiae</i> y <i>T.delbrueckii</i>	14
3.3. Población viable de las diferentes cepas.....	14
3.4 Inmovilización de levaduras en perlas de alginato.....	16
3.4.1 Protocolo de inmovilización.....	16
3.5. Diseño experimental	17
3.6 Toma de muestra.....	20
4 Resultados y discusión	21
4.1 Fermentaciones individuales.....	21
4.2. Fermentaciones secuenciales.....	29
5. Conclusiones y perspectivas futuras	31
6. Referencias Bibliográficas.....	32
7. Anexos.....	35
8. Autoevaluación.....	40
9. Agradecimientos.....	41

RESUMEN

Estudios anteriores del grupo de investigación de Biotecnología Enológica de la URV, han reportado que, en fermentación de tipo secuenciales, *Torulaspota delbrueckii* es capaz de inhibir el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, imponiéndose durante fermentación. Para evitar esta interacción de tipo negativa, en este trabajo se estudió la interacción *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* en ausencia de contacto célula-célula mediante el uso de un soporte de inmovilización de levaduras llamado alginato de sodio. Para ello se realizaron fermentaciones individuales y secuenciales, en mosto sintético, con *T. delbrueckii* Biodiva™ inmovilizada y *S. cerevisiae* QA23 o *S. cerevisiae* Viniform REVELACIÓN. Se optimizó el proceso de inmovilización con distintos parámetros y condiciones de fermentación. Las fermentaciones fueron seguidas mediante la pérdida de la densidad del mosto, la evolución de las poblaciones microbianas y diferenciando morfológicamente cada levadura. Varios factores físicos como concentración de alginato, concentración del inóculo, la cepa de levadura, entre otros juegan un papel determinante en los sistemas de inmovilización, teniendo estos parámetros un efecto en la tasa de transferencia de masa del sustrato y del producto final. Las condiciones seleccionadas como óptimas en la inmovilización de *T. delbrueckii* para fermentación individual contemplaron una concentración de alginato 2 y 3%, en ausencia de formaldehído, y a una temperatura de 22 °C, sin embargo, no terminaron la fermentación. Por otro lado, en las fermentaciones secuenciales, se evaluó el porcentaje de alginato en la inmovilización de una levadura no-*Saccharomyces*, en presencia o ausencia de formaldehído, en temperaturas de fermentación de 22 °C, para posteriormente inocular *S. cerevisiae* libre, donde se logró un término correcto de la fermentación. En este caso las condiciones óptimas fueron una concentración de 2% de alginato, con 2% de formaldehído y a una temperatura de 22 °C.

Palabras clave: inmovilización, alginato de sodio, inoculación secuencial, *Torulaspota delbrueckii*, interacciones entre levaduras, fermentación alcohólica

ABSTRACT

Previous studies by the URV Oenological Biotechnology research group have reported that, in sequential fermentation, *Torulaspora delbrueckii* can inhibit the growth of *Saccharomyces cerevisiae*, imposing itself during fermentation. To avoid this negative type of interaction, in this work the *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* interaction was studied in the absence of cell-cell contact using a yeast immobilization support called sodium alginate. Individual and sequential fermentations were carried out in synthetic must, with immobilized *T. delbrueckii* Biodiva™ and free cells of *S. cerevisiae* QA23 or *S. cerevisiae* Viniferm REVELATION. The immobilization process was optimized with different parameters and fermentation conditions. The fermentations were followed by the loss of the density of the must, the evolution of the microbial populations and morphologically differentiating each yeast. Several physical factors such as alginate concentration, inoculum concentration, yeast strain, among others, play a determining role in immobilization systems, these parameters influencing the mass transfer rate of the substrate and the final product. The conditions selected as optimal in the immobilization of *T. delbrueckii* for individual fermentation contemplated an alginate concentration of 2 and 3%, in the absence of formaldehyde, and at a temperature of 22 ° C, however, they did not finish the fermentation. On the other hand, in the sequential fermentations, the percentage of alginate in the immobilization of a non-*Saccharomyces* yeast was evaluated, in the presence or absence of formaldehyde, at fermentation temperatures of 22 ° C, to later inoculate free *S. cerevisiae*, where a correct termination of the fermentation was achieved. In this case, the optimal conditions were a concentration of 2% alginate, with 2% formaldehyde and at a temperature of 22 ° C.

Key words: immobilization, sodium alginate, sequential inoculation, *Torulaspora delbrueckii*, yeast interactions, alcoholic fermentation.

1. INTRODUCCIÓN

La fermentación alcohólica (FAL) consiste en la transformación de los azúcares del mosto, principalmente glucosa y fructosa, en etanol y CO₂ (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). En la FAL, *Saccharomyces cerevisiae* es indiscutiblemente la especie dominante, pese a la gran variedad de microorganismos asociados a la vinificación, y otros procesos de fermentación. La habilidad de *S. cerevisiae* para competir con otras especies microbianas durante la fermentación alcohólica ha sido atribuida a su alto poder fermentativo y capacidad para soportar las hostiles condiciones ambientales, como son altos niveles de etanol y ácidos orgánicos, valores de pH bajos, escasa disponibilidad de oxígeno y agotamiento de ciertos nutrientes (Albergaria *et al.*, 2016).

La FAL se puede producir de manera espontánea mediante los propios microorganismos del mosto, o inducir inoculando levaduras seleccionadas. Las fermentaciones espontáneas son aquellas fermentaciones que se producen debido a las especies de levaduras presentes en la uva utilizada para elaborar el mosto, por lo que participan un gran número de levaduras, tanto *Saccharomyces* como *no-Saccharomyces*, lo que hace que el producto final, sea impredecible y de una calidad variable, debido a la falta de control microbiológico. La gran variabilidad cuantitativa y cualitativa de las especies *Saccharomyces*, se encuentran en las primeras etapas de la fermentación, esto se puede explicar por la gran cantidad de factores que influyen en la microbiota de la uva, como la localización, las condiciones climáticas, el cultivo, la aplicación de pesticidas y otras prácticas agronómicas, la etapa de maduración, la salud de la uva, los procedimientos de cosecha. y las condiciones climáticas específicas en cada año de cosecha. (Padilla *et al.*, 2016).

Por otro lado, están las fermentaciones inoculadas, en donde se utiliza *S. cerevisiae* como cultivo iniciador. Ésta es una práctica muy extendida en la elaboración del vino, convirtiéndose en una solución para obtener vinos de calidad, con mayor control microbiológico, siendo más reproducibles en cada temporada. Sin embargo, con esta práctica se ha reducido la complejidad organoléptica de los vinos, ya que la fermentación la realiza principalmente una única cepa de levadura.

Las especies de *Saccharomyces* pueden contribuir a las características sensoriales finales del producto. Igualmente se ha demostrado que las levaduras *no-Saccharomyces* tienen un impacto positivo en las características organolépticas del vino (Ciani *et al.*, 2010). Sin embargo, las cepas seleccionadas de *S. cerevisiae* predominan en cultivos iniciadores para asegurar una fermentación rápida y fiable del mosto de uva, por lo tanto, una calidad de vino constante y predecible.

Aunque *S. cerevisiae* produce la mayor parte del etanol en el vino, las levaduras *no-Saccharomyces* juegan un papel significativo produciendo compuestos aromáticos, como ésteres, alcoholes superiores, ácidos y monoterpenos. (Medina *et al.*, 2013).

En las últimas décadas, numerosos estudios han descrito la importancia de las levaduras *no-Saccharomyces* en la mejora de la complejidad aromática del vino (Ciani *et al.*, 2016; Ciani & Comitini, 2019). En este contexto, se propone la utilización de inóculos mixtos de ciertas levaduras *no-Saccharomyces* junto con *S. cerevisiae*, para mejorar las propiedades químicas y sensoriales del vino. Se ha reportado que las levaduras *no-Saccharomyces* mejoran los parámetros de calidad del vino, reduciendo la concentración de etanol, afectando el contenido de glicerol, aumentando la complejidad aromática, disminuyendo la acidez, impactando el contenido de antocianinas, polisacáridos y manoproteínas, entre otros (Benito *et al.*, 2018).

Las especies de levaduras *no-Saccharomyces* más estudiadas para la producción de vino incluyen *Candida*, *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Zygosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspota*, y *Lachancea* (Jolly *et al.*, 2014)

1.1 Sistemas de inoculación

Debido a la presencia de diversas especies de levaduras durante la FAL espontánea, es difícil controlar correctamente el proceso de fermentación y obtener un producto final con calidad estable y homogénea. Para corregir este problema, en las fermentaciones se comenzaron a utilizar levaduras comerciales de *S. cerevisiae*, lo que garantiza una calidad estable del vino. Por tanto, para obtener una mayor complejidad de aromas, se han iniciado investigaciones sobre inoculaciones con levaduras *no-Saccharomyces* en asociación con *Saccharomyces*

Cuando se utilizan levaduras *no-Saccharomyces*, en cultivos iniciadores mixtos, existen dos prácticas generales de inoculación. La primera es co-inocular levaduras *no-Saccharomyces* y *S. cerevisiae* a la vez en el mosto, en donde en la primera fase de fermentación prevalecerán las levaduras *no-Saccharomyces*, para luego terminar la fermentación *S. cerevisiae*; considerando que la concentración de levaduras sea mayor en las levaduras *no-saccharomyces*. La co-inoculación a veces implica la inoculación de levaduras *no-Saccharomyces* en mayor concentración que *S. cerevisiae*, para que puedan prevalecer más tiempo en la fermentación, antes de que *S. cerevisiae* se imponga (Padilla *et al.*, 2016).

Debido a la inhibición que ejerce *S. cerevisiae* sobre el crecimiento de las *no-Saccharomyces* y la rápida imposición sobre estas si están en co-cultivo, existe otra estrategia de inoculación mixta, la inoculación secuencial. Esta segunda metodología, se logra inoculando primero con la levadura *no-Saccharomyces*, y a las 24-48 horas se inocula una cepa de vino de *S. cerevisiae* para finalizar la fermentación, logrando que las levaduras *no-Saccharomyces* inicien la fermentación, entregando al mosto, características organolépticas.

La fermentación secuencial parece ser la más exitosa, ya que prolonga el potencial enológico de las levaduras *no-Saccharomyces* durante los primeros días de fermentación. Las fermentaciones secuenciales con *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* aumentan la complejidad del vino, lo que podría ayudar a mejorar la calidad de algunos tipos de vino. (Loira *et al.*, 2014).

Ambas son prácticas factibles, aunque las posibles interacciones entre las levaduras podrían determinar qué estrategia de inoculación es más apropiada. (Padilla *et al.*,2016).

1.2 *Torulaspota delbrueckii*

Entre las levaduras *no-Saccharomyces* que se han estudiado para mejorar las características del vino, está *Torulaspota delbrueckii* siendo una de las especies más estudiada, comercializada y utilizada a nivel industrial (Benito *et al.*, 2018). La utilización de fermentaciones mixtas, incluyendo la combinación de *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* permite una menor producción de ácido acético, en comparación con cultivos puros de *S. cerevisiae*, y es particularmente útil para mostos de uva con alto contenido de azúcar (Bely *et al.*,2008).

Del mismo modo, presenta una baja producción de compuestos indeseables, pudiendo aumentar la complejidad en el vino (Renault *et al.*, 2009; Renault *et al.*, 2015).

Por lo que la co-fermentación junto con *S. cerevisiae* se ha propuesto para modular el sabor del vino y para asegurar una fermentación alcohólica completa, así como para reducir significativamente la cantidad de etanol. En cuanto a la tolerancia al etanol de *T. delbrueckii*, Ciani y Maccarelli (1997) informaron que *T. delbrueckii* es capaz de fermentar y tolerar una concentración de etanol cerca del 9% (v/v), sin embargo, otro estudio indica que sólo tolera hasta un 7,4% (v/v) (Bely y col., 2008). Esta característica puede ayudar a evitar problemas derivados del cambio climático, como los vinos de alto contenido alcohólico debido a las altas concentraciones de azúcar en los mostos de uva.

T. delbrueckii también muestra una notable capacidad de liberación de manoproteínas y polisacáridos en el vino, lo que aumenta la calidad del vino con respecto a las propiedades de sensación en boca (Belda *et al.* 2016). Asimismo, puede producir niveles más altos de ésteres afrutados, tioles y terpenos y menores cantidades de alcoholes superiores, respetando así el carácter inicial de la uva (Belda *et al.*,2017).

En efecto, algunos autores han sugerido utilizar *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* simultáneamente para mejorar el sabor afrutado, la calidad del aroma y reducir la concentración de ácido acético de vinos (Bely *et al.* 2008; Ciani *et al.* 2006).

1.3 Interacciones entre levaduras

En las últimas décadas, ha habido un aumento progresivo en el contenido de etanol en el vino debido al cambio climático global, el que se relaciona directamente con una mayor madurez de la uva, de igual forma, los nuevos estilos de vinos que aparecen de la preferencia del consumidor. No obstante, mayores niveles de alcohol puede percibirse negativamente, debido a que se produce una reducción en la calidad del vino, como también pueden existir problemas de salud (Canónico, *et al.*, 2016)

En este contexto, varias líneas de investigación tienen como objetivo la reducción del contenido de etanol de los vinos, que generalmente se han centrado en la gestión del viñedo y las prácticas enológicas, y en particular en la desalcoholización del vino (Varela *et al.*, 2015). Desde un punto microbiológico, el uso de levaduras no- *Saccharomyces*, en combinación con *S. cerevisiae* se ha propuesto como una posible estrategia para reducir el grado alcohólico y al mismo tiempo para mejorar la calidad del vino (Jolly *et al.*, 2014; Capozzi *et al.*, 2015).

Generalmente, las levaduras no *Saccharomyces* se consideran activas en la primera parte de la fermentación, cuando la concentración de etanol no es demasiado alta. No obstante, en comparación con las especies de *Saccharomyces*, no están bien adaptados para terminar el FAL.

1.4 Estudios previos

En estudios previos realizados el grupo de investigación de Biotecnología enológica de la URV, se ha estudiado las interacciones entre levaduras *Saccharomyces* y diversas especies no-*Saccharomyces*, especialmente *T. delbrueckii*. Inicialmente, el estudio se basó en una inoculación secuencial, en la que primero se inoculó *T. delbrueckii* y 48 h más tarde se inoculó *S. cerevisiae*. El mosto sintético se fermentó a una temperatura de 16 °C y se midió la densidad y la población viable del mosto, para observar su evolución. Curiosamente se observó una inhibición del crecimiento de la cepa de *S. cerevisiae* durante la fermentación, siendo *T. delbrueckii* quien dominó hasta el final.

Se evaluaron posibles causas, para explicar la falta de imposición de *S. cerevisiae* sobre *T. delbrueckii* siendo una posible explicación la temperatura de fermentación podría ser una causa de la inhibición entre las levaduras.

El resultado obtenido fue que la fermentación secuencial a 22 °C se ralentizó respecto a las fermentaciones individuales, pero esta fue capaz de terminar la fermentación, a diferencia de la fermentación a 16 °C, que se paró tras la inoculación de *S. cerevisiae*. Por tanto, estos resultados mostraron que *T. delbrueckii* era la causante de la inhibición del crecimiento de *S. cerevisiae* a bajas temperaturas de fermentación, pero no a temperaturas superiores.

La posible segunda causa, fue que la parada de fermentación se debiera a una falta de nutrientes en el medio en el momento de inocular *Saccharomyces*, y que debido al crecimiento previo de *T. delbrueckii*, el mosto tuviera una carencia de algún nutriente esencial. Para esto, se realizaron fermentaciones secuenciales, en las que se eliminó *T. delbrueckii*, inoculando posteriormente *S. cerevisiae*, y añadiendo diferentes nutrientes (aminoácidos, vitaminas, oligoelementos o factores de anaerobiosis), estos nutrientes se agregaron individualmente y en conjunto, para determinar cuál podría ser el nutriente que causara la limitación del crecimiento de la levadura *Saccharomyces*. Los resultados solo mostraron mejoras significativas cuando se incorporan en conjunto todos los nutrientes, pero en la adición de sólo alguno de ellos estas mejoras se observaron de forma parcial. Esto demostró que la inhibición no se produce por el déficit de un único nutriente, sino que se produce por un desajuste en la concentración de la matriz de nutrientes completa.

Otra hipótesis que se comprobó fue la presencia de sustancias inhibidoras sintetizadas por *T. delbrueckii*, las cuales inhibiría el crecimiento de *S. cerevisiae*. Hay registros de la síntesis de proteínas killer en varias cepas de *Saccharomyces* y *no-Saccharomyces*, cuya función es controlar posibles contaminaciones del mosto por parte de otras levaduras. Este fenómeno killer se ha descrito considerablemente en vinificación, en donde se han identificado cepas de *T. delbrueckii* y *L. thermotolerans* como agentes de biocontrol eficaces. (Ciani & Comitini, 2019).

Una posible explicación sería, por tanto, que *T. delbrueckii* secretara alguna toxina killer, que afectaría a *S. cerevisiae*, impidiendo su crecimiento. Pero, estudios anteriores del grupo de investigación confirmaron que las cepas de *T. delbrueckii* testadas no mataban a las cepas de *S. cerevisiae*.

Se repitieron experimentos con más de dos cepas de ambas especies para evaluar si esta inhibición era específica de algunas cepas. Los resultados con las nuevas cepas fueron similares a los obtenidos con las cepas testadas inicialmente. Esto demostró que esta inhibición no es específica de cepa, sino que es común entre estas especies.

Posteriormente se probó si las inhibiciones eran específicas de especie, realizando la fermentación secuencial con otra levadura *no-Saccharomyces*. En este caso con una cepa de *Lachancea thermotolerans*. En este experimento se inoculó *L. thermotolerans* en mosto sintético a 16°C, luego de 48 horas, se eliminó *L. thermotolerans*, inoculándose *S. cerevisiae*. El resultado mostró que se producía una inhibición del crecimiento, así como una ralentización en la fermentación al eliminar *L. thermotolerans*, e inocular *S. cerevisiae*. Exponiéndose que *L. thermotolerans* también inhibe a *S. cerevisiae*. Demostrándose que la inhibición de *S. cerevisiae* no era específica desde *T. delbrueckii*, sino que otras especies de *no-Saccharomyces* también podían ocasionarla.

Y por último se evaluó, si hubiera una inhibición por contacto célula-célula. Para comprobar este punto, se realizó la fermentación eliminando por filtración *T. delbrueckii* del mosto antes de inocular *S. cerevisiae*. El resultado obtenido fue una parada de fermentación, lo que demostró que la falta de imposición de *Saccharomyces* no era debida a una inhibición por contacto célula-célula.

Es por esto que, para poder estudiar mejor las interacciones entre levaduras de diferentes especies, se pensó que el siguiente paso era realizar las fermentaciones mixtas compartimentalizadas, es decir separar las especies, que no haya contacto célula-célula, pero si intercambio de medio. Para ello el grupo de investigación de Biotecnología Enológica está trabajando con dos estrategias: una la utilización de membranas o sacos de diálisis de diferente tamaño para separar las especies, y otra la inmovilización de levaduras con alguna matriz porosa como alginato, que permita el intercambio de sustratos y productos, pero sin contacto con las otras levaduras libres.

1.5 Inmovilización de levaduras

En los últimos años, está aumentando el interés por utilizar células inmovilizadas para procesos de fermentación (Bleve *et al.*, 2016). La inmovilización de levadura o microencapsulación se define como el confinamiento físico de células intactas en una región de espacio con conservación de actividad biológica (Moreno García *et al.*, 2018). Otros autores definen la técnica de microencapsulación como un proceso en donde pequeñas partículas o gotas son rodeadas por un recubrimiento homogéneo o heterogéneo integrado a las cápsulas con variadas aplicaciones (Borgogna *et al.*, 2010). Esta tecnología tiene como objetivo confinar las células de levadura activas intactas a una región específica, aumentando así la densidad celular, permitiendo la mejora y prolongación de la producción de ciertos metabolitos (p. ej., aromáticos), lo que permite un mejor control y estabilidad de la levadura, proporcionando protección celular, permitiendo la recuperación, reutilización celular y fermentaciones continuas (Moreno García *et al.*, 2018).

A continuación, se presentan los distintos tipos de inmovilización, y sus posibles ventajas y desventajas

Tabla 1. Métodos de inmovilización de levaduras. (Moreno García *et al.*, 2018)

Métodos de inmovilización	Descripción	Ventajas	Desventajas
Autoinmovilización	Capacidad innata de las células para agregarse (es decir, adhesión, formación de biopelículas, formación de filamentos y floculación).	Efectos beneficiosos sobre la calidad del vino, y es utilizado a nivel industrial	Es sensible a factores como pH, al medio, contenido de oxígeno.
Inmovilización en una superficie de apoyo	Adsorción celular a un portador por celda	Materiales portadores baratos y facilidad para realizar el proceso	La profundidad y la fuerza de unión de las células no están determinadas. Posible desprendimiento de células de levadura
Atrapamiento en una matriz porosa	Incorporación de células a redes rígidas.	Prevención de la difusión celular y tolerancia de la transferencia de sustratos y productos del metabolismo.	Alto costo, baja estabilidad mecánica y química. La biomasa atrapada en una matriz de gel es fundamental para el uso de procesos biotecnológicos que utilizan células de levadura inmovilizadas viables.

Soportes naturales	Principio de pureza de grado alimenticio y utilizado con el mínimo o ningún pre-tratamiento.	Gran abundancia, bajo costo y naturaleza de grado alimenticio.	Proceso de degradación de los soportes no evaluados. Ampliación industrial no descrita.
Soportes orgánicos	Fabricado sintéticamente (p. Ej., plástico) o extraído de fuentes naturales mediante procesos más complejos (p. Ej., Hidrogeles poliméricos) independientemente de su pureza de grado alimenticio.	Capacidad de gelificar en condiciones suaves y formar perlas esféricas que protegen contra la contaminación y las sustancias inhibidoras al tiempo que favorecen la utilización del sustrato y mejorando la estabilidad, la productividad del sabor y la eficiencia.	Altos costos, baja estabilidad mecánica y química.
Soportes inorgánicos	No son materiales orgánicos como cerámica porosa, vidrio poroso, espuma de poliuretano, etc.	Suele ser abundante y puede mejorar la fermentación, productividad y aroma.	Fuertes cambios en el metabolismo y la viabilidad celular. Altas concentraciones de residuos minerales.

Ejemplos de inmovilizaciones

En comparación con las células libres, el uso de células inmovilizadas en la elaboración del vino es un área de investigación en rápida expansión con el objetivo de aumentar la productividad de la fermentación (Tsakiris *et al.*, 2004). La inmovilización de levadura es una forma prometedora de mejorar el manejo de cultivos mixtos. Por ejemplo, se han utilizado levaduras co-inmovilizadas no-*Saccharomyces* en alginato de calcio junto con una inoculación final de células libres de *S. cerevisiae* para reducir el contenido de etanol en el vino (Canónico *et al.*, 2016). El uso de levaduras inmovilizadas fue reportado por primera vez por Bidan *et al.* (1980) para la elaboración de vino espumoso por el método de champnoise. Donde no se reportaron diferencias químicas u organolépticas entre Champagne producido con células libres o inmovilizadas. Del mismo modo, en el proceso de elaboración del cava, una de las grandes ventajas de esta técnica es la de suprimir la etapa de removido durante la elaboración, puesto que la clarificación es más rápida y las levaduras sedimentan antes. Esto supone un gran ahorro económico, así como un menor tiempo de elaboración y menos espacio de almacenamiento en bodega. Además, mejora la fermentación bajo las condiciones de alta presión, baja temperatura, y contenido en etanol.

Alginato de sodio como soporte de inmovilización

El alginato de sodio es uno de los soportes más utilizados en la industria alimentaria. Varios estudios han utilizado el alginato de sodio como soporte de inmovilización. Blevé y col. (2016) co-inmovilizó microorganismos en perlas de alginato, que revelan una eficacia de rendimiento de fermentación del mosto, con disminución del tiempo necesario para completar la fermentación alcohólica, presentando una baja producción de acidez volátil y rasgos organolépticos similares del vino obtenido de fermentaciones alcohólicas y maloláctica de células libres.

2.HIPÓTESIS

A partir de estudios previos se ha determinado que existen levaduras *no-Saccharomyces* que provocan una inhibición en el crecimiento de *S. cerevisiae*, pudiendo ser un riesgo para el correcto desarrollo de la fermentación. Particularmente se ha observado que cepas de *T. delbrueckii* y *L. thermotolerans* pueden inhibir el crecimiento de *S. cerevisiae* en inoculación secuencial. Por lo que la hipótesis planteada en este trabajo es que, si no hay contacto celular entre las dos especies iniciadoras utilizadas en cultivos mixtos, ambas especies pueden coexistir, y la fermentación finalizar adecuadamente. Para ello, se realizarán las fermentaciones con la cepa de *T. delbrueckii* inmovilizada.

Los objetivos de este trabajo son:

- Optimización del proceso de inmovilización de *T. delbrueckii*, utilizando alginato de sodio como soporte. Para ello se optimizarán las concentraciones de los reactivos, cantidad de inóculo y condiciones de fermentación idóneas para el proceso.
- Testar las cepas inmovilizadas de *T. delbrueckii* en fermentaciones individuales y secuenciales con *S. cerevisiae* usando mosto sintético.

El estudio de estas fermentaciones se llevará a cabo mediante análisis de cinética de fermentación por densidad del mosto, y de la evolución de la población por densidad óptica y crecimiento en placa con medio diferencial.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Microorganismos:

Los microorganismos utilizados fueron cepas comerciales de *Torulaspota delbrueckii* (Biodiva, Lallemand, España), la cual abreviaremos como TdB, y *Saccharomyces cerevisiae* (Lalvin QA23, Lallemand, Canadá; y Revelación, Agrovin, España), abreviándola como ScR y ScQ. Estas cepas fueron proporcionadas por el laboratorio de Biotecnología Enológica, del Departamento de Biotecnología y Bioquímica de la Universidad Rovira i Virgili.

3.2 Preparación de inóculos de levaduras *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*

La metodología de preparación de los inóculos fue común para todas las cepas utilizadas. En la campana de flujo laminar, se tomó una pequeña muestra de las colonias ya crecidas en placa YPD, y se resuspendió en 50 mL de medio Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD) (Descrito en medios de cultivo) en tubos Falcon. Posteriormente, se incubaron a 28 °C, durante 48 h. Pasado este tiempo, se preparó el inóculo, y se incubó con agitación a 120 rpm a 28°C, por 24 h.

Se realizaron pruebas de fermentación con las cepas ScQ (*S. cerevisiae*, QA23), ScR (*S. cerevisiae* Revelación) y TdB (*T. delbrueckii* Biodiva) de forma individual y secuencial, en mosto sintético (Beltran *et al.*, 2004 (Anexo 2))

3.3 Población viable de las diferentes cepas

El recuento de la población viable se hizo mediante el conteo de colonias. Una vez las levaduras se colocan en un medio nutritivo sólido adecuado, las células viables son capaces de desarrollar y formar un grupo microscópico, visible a simple vista, llamado colonia. (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Los medios de cultivo utilizados fueron un medio rico, YPD-sólido (Anexo 2), un medio diferencial, WL Nutrient Broth y un medio selectivo, agar lisina (Anexo 2).

El medio WLN permite diferenciar la morfología de las especies que se pueden encontrar en el mosto, a través de las diferencias morfológicas entre colonias (Figura 1), en este caso de *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*. Permitiendo controlar posibles contaminaciones. Al cultivar las cepas utilizadas en este estudio, ScR formaba colonias circulares con tonalidad blanquecina, mientras que TdB formaba colonias circulares con tonalidad blanquecina pasando los días alcanzaba una coloración más verdosa.

El medio agar Lisina es un medio selectivo para levaduras *no-Saccharomyces*, ya que las levaduras *Saccharomyces*, no pueden crecer con Lisina como única fuente de Nitrógeno. En la Figura 2, TdB se muestra que se formaban colonias circulares blancas, las que a medida que pasaban los días alcanzaban mayor tamaño.

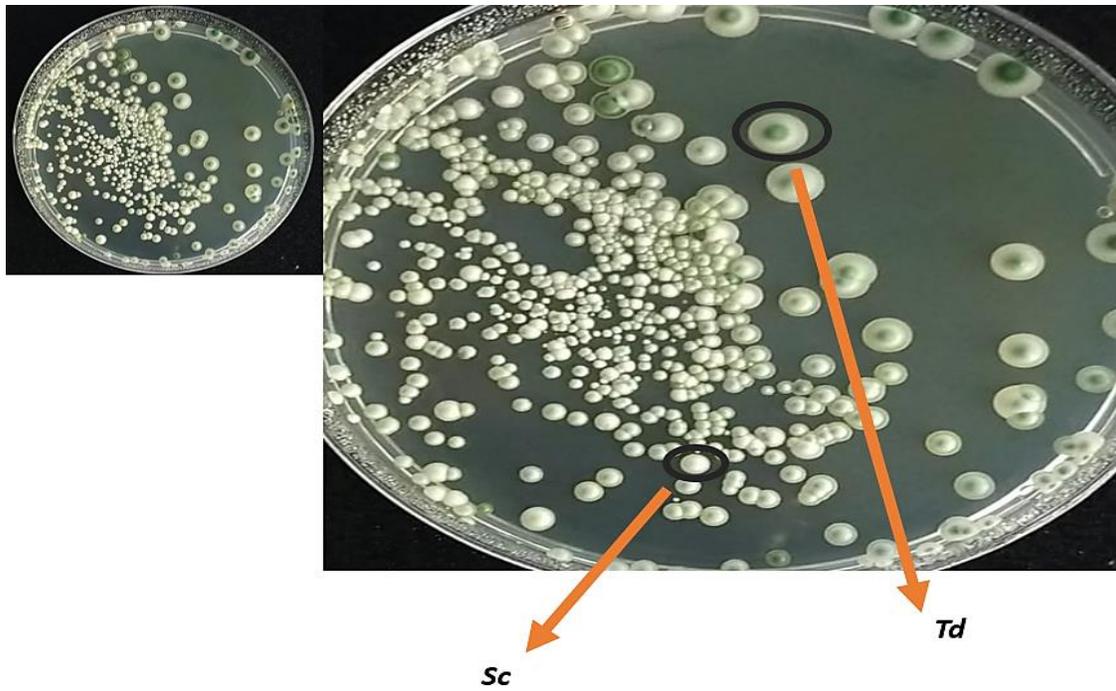


Figura 1. Placas de WLN conteniendo cultivos mixtos de levaduras no-Saccharomyces con *S. cerevisiae*. Placa cultivo mixto *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*.

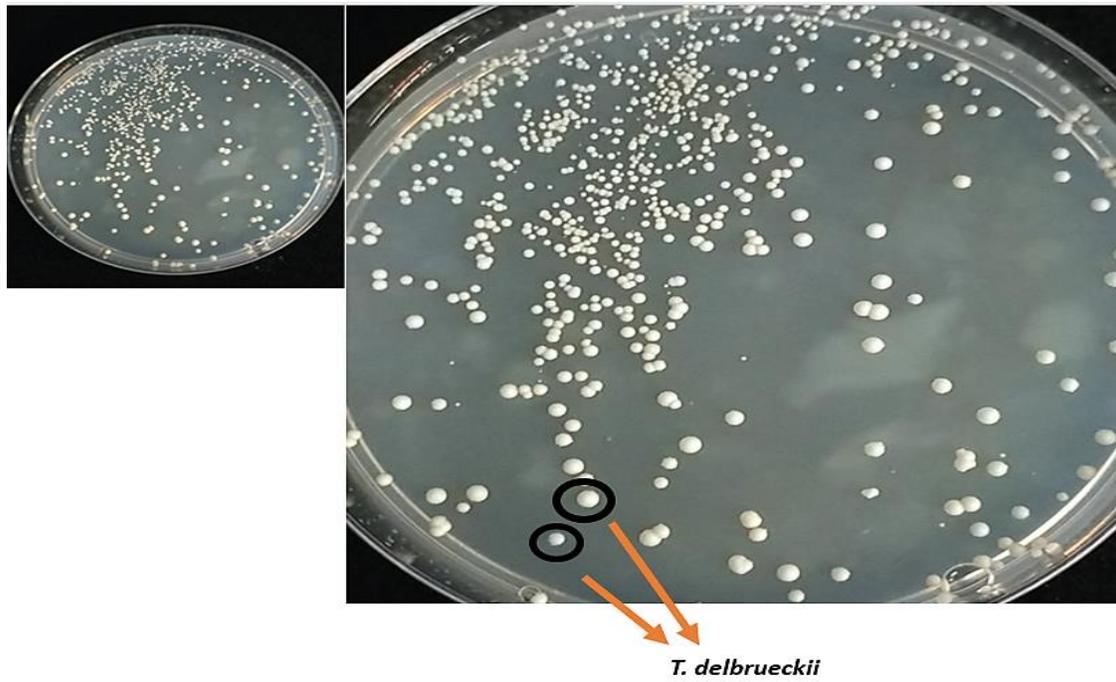


Figura 2. Placas de agar lisina, conteniendo un cultivo puro de levaduras no-Saccharomyces, *T. delbrueckii*.

3.4 Inmovilización de las levaduras en perlas de alginato:

Se evaluaron diferentes protocolos para realizar la inmovilización de las levaduras. Se ajustaron distintos factores como temperatura de fermentación, concentración de inóculo, y concentración de los diferentes reactivos.

3.4.1 Protocolo de inmovilización

El primer protocolo que se utilizó se basó en el protocolo de *Hidalgo et al., (2011)*. Este protocolo consistió en resuspender 1 g de levadura LSA en 10 ml de agua (aproximadamente $1 \text{ g} = 6 \times 10^9$ concentración final $6 \times 10^8 \text{ cel./ml}$), o 25 ml de mosto en plena actividad fermentativa. Luego se disolvieron 0,5 g de alginato de sodio en 10 ml de agua estéril, y se mezclaron suavemente las levaduras con el alginato (concentración final $3 \times 10^8 \text{ cel./ml}$). Posteriormente se calculó el volumen necesario para inocular cada fermentador a unos $5 \times 10^6 \text{ cel./ml}$. Con una jeringa de 10 ml y aguja de 1 mm, se tiró la preparación gota a gota, desde 20 cm de alto, a un vaso precipitado con 200 ml de CaCl_2 2%, y agitación magnética suave. De este modo, se formaron perlas de alginato de aproximadamente 3mm con las levaduras inmovilizadas. Se dejó unos 30 minutos en agitación, las perlas se sacaron y se lavaron con agua estéril.

Para terminar, se realizó una doble inclusión. Para ello se introdujeron las perlas en solución estéril de formaldehído al 5%, y se mantuvieron en agitación durante 3-4 minutos, para que el formaldehído penetrara en las perlas e inactivara las levaduras de la periferia. Se sacaron las perlas y se lavaron con abundante agua estéril. Luego se lavaron en una solución de CaCl_2 al 2%, para posteriormente lavarlas nuevamente con agua destilada estéril.

Las perlas se introdujeron en una solución de alginato de sodio al 0,2 % durante 5 minutos, en agitación, en donde se formó el recubrimiento estéril de alginato de calcio. De nuevo se introdujeron las perlas en una solución de CaCl_2 2%, y se mantuvieron en agitación durante 30 minutos para endurecer el recubrimiento.

Este protocolo base se optimizó variando distintos parámetros como la concentración de algunos reactivos (alginato, formaldehído, carbonato de calcio), la concentración de células y tiempos de incubación, así como factores externos tales como, la temperatura de fermentación.

Tabla 1. Protocolos de inmovilización de levaduras realizados con su respectivo % de alginato, formaldehído, tiempo de contacto con Ca₂Cl 2% y si existe o no doble inclusión en el procedimiento.

	Referencia	% Alginato	% Formaldehído	Tiempo de contacto con Ca ₂ Cl 2%	Doble inclusión
Protocolo 1	Hidalgo <i>et al.</i> , 2011	5%	5%	30 minutos en agitación suave	✓
Protocolo 2	Hidalgo <i>et al.</i> , 2011	0,8, 2 y 4%	5%	30 minutos en agitación suave	✓
Protocolo 3	Duarte <i>et al.</i> , 2013 / Kreigel <i>et al.</i> , 2013	4%	5%	1 hora en agitación suave	✓
Protocolo 4.a	Duarte <i>et al.</i> , 2013	3%	5%	1 hora en agitación suave	✗
Protocolo 4. b	Duarte <i>et al.</i> , 2013	3%	2%	1 hora en agitación suave	✓

3.5 Diseño experimental:

Se realizaron fermentaciones en 220 ml de mosto sintético (pH 3.3) (Beltran *et al.*, 2004), en fermentadores estériles (botellas de vidrio de 250 ml). Los fermentadores se dejaron en agitación (120 rpm). Todos los experimentos fueron hechos en triplicado. Las pruebas de fermentación realizadas con cada protocolo están explicadas en la Tabla 2 y 3, utilizando en todos los casos controles de cultivos puros sin inmovilizar.

Para calcular el volumen necesario de la población, se realizó un recuento al microscopio de células del precultivo en la cámara Neubauer, y con la concentración del precultivo, se hizo el cálculo final del volumen a inocular.

Tabla 2. Pruebas de fermentación, con inoculaciones individuales de levaduras inmovilizadas y libres.

	Protocolo de inmov.	T (°C)	Concentración levaduras (cel./ml)	Cepa utilizada	Modificaciones realizadas
PF1	Protocolo n° 3	28°C	2×10^6	<i>S. cerevisiae</i> QA23	4% de alginato 5% formaldehído
PF2	Protocolo n° 4a	16°C	5×10^6 1×10^7	<i>S. cerevisiae</i> QA23; Revelación	3% de alginato 5% formaldehído
PF3	Protocolo n° 4a	16°C	3×10^8	<i>S. cerevisiae</i> QA23	3% de alginato 5% de formaldehído
PF4	Protocolo n° 4a	22°C	3×10^8 1×10^7	<i>S. cerevisiae</i> QA23	3% de alginato 5% formaldehído
PF5	Protocolo n° 4a	22°C	3×10^8	<i>S. cerevisiae</i> QA23	2 y 3% de alginato; 0 y 5% de formaldehído
PF6	Protocolo n° 4b	22°C	1×10^8	<i>S. cerevisiae</i> QA23	2 y 3% de alginato; 0 y 2% de formaldehído; con y sin doble capa
PF7	Protocolo n° 4a	22°C	1×10^8	<i>T. delbrueckii</i> Biodiva	2 y 3 % de alginato 2% de formaldehído

Tabla 3. Pruebas de fermentación con inoculaciones secuenciales de levaduras inmovilizadas y libres.

	Protocolo inmov.	T (°C)	Tiempo segunda inoculación	Concentración levaduras (cel./ml)	Cepa Control ^a	Modificaciones realizadas
S1	Protocolo n° 4a	22 °C	T= 36 h	Td Biodiva inmovilizada 1x10 ⁸ + Sc QA23 Libre 2x10 ⁶	Td BiodivaSc QA23	2 % de alginato 2% de formaldehído
S2	Protocolo n° 4a	22°C	T= 40h	Td Biodiva inmovilizada 1x 10 ⁸ Sc QA23 Libre 2x10 ⁶	Td Biodiva Sc QA23	

^a Todas las cepas control se inocularon a una concentración inicial de 2x10⁶ cel./ml en formato libre.

3.6 Toma de muestra

Una vez ya realizada la inoculación, se colectaron muestras diariamente (5 ml) para recuento celular, medición de densidad óptica y densidad del medio (g/L).

El recuento celular en cámara de Neubauer fue realizado usando diluciones seriadas. Posteriormente, las diluciones adecuadas, se sembraron en medio diferencial Wallerstein (WLN) y medio selectivo Lisina. La siembra en placa se realizó añadiendo 100 μ L de la dilución deseada y homogeneizando con bolitas de vidrio estériles. Tras una incubación de entre 24 y 48 horas a 28 °C, se recuenta el número de colonias formadas, Unidades formadoras de Colonia (UFCs). Asimismo, se guardó una muestra centrifugada, de 1 ml en tubos eppendorf de cada experimento.

El seguimiento de las FAL individuales de *S. cerevisiae* (Sc), *T. delbrueckii* (Td), se hizo mediante la medida de la densidad del mosto y el recuento de levaduras viables en placa de cultivo WLN y lisina.

La medición de densidad óptica ($OD_{600\text{ nm}}$) es un método de recuento indirecto, basado en la turbidez producida por el aumento de población, para determinar las poblaciones totales de levaduras. De esta manera se puede determinar la relación de la $OD_{600\text{ nm}}$ y las UFC.

Por último, se midió la densidad del medio con el densímetro Mettler Toledo, Portable Lab TM. Para esto, se tomó muestra de cada fermentador, y se centrifugó a 7000 rpm durante 5 minutos, y se midió la densidad en el sobrenadante.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizaron fermentaciones individuales y mixtas con inoculación secuencial, con levaduras inmovilizadas individuales y mixtas con inoculación secuencial, con levaduras inmovilizadas, utilizando levaduras sin inmovilizar como control.

4.1 Fermentaciones individuales

En estos experimentos se realizaron pruebas con las cepas ScQ (*S. cerevisiae*, QA23), ScR (*S.cerevisiae* Revelación) y TdB (*T. delbrueckii* Biodiva) de forma individual, en mosto sintético (Beltran *et al.*, 2004 (Anexo 2) con agitación. En la tabla 2 se resumen las diferentes pruebas de fermentación realizadas y las condiciones testadas en cada caso, como temperaturas de fermentación, la concentración de levadura inoculada (cel./ml). Las fermentaciones se realizaron midiendo la cinética de fermentación. A medida que una fermentación avanza, se produce un consumo de azúcares y una producción de etanol, produciendo una disminución de la densidad del medio. Cabe destacar que las pruebas realizadas con los dos primeros protocolos de inmovilización no aparecen en la Tabla 2 ni se presentan en Figuras, ya que ambas pruebas se realizaron a una temperatura de 28°C, y con una concentración de alginato de 0,8, 2 y 5%, en las cuales las perlas se deshicieron durante los primeros días de fermentación.

De acuerdo con la tabla 2, la primera prueba de fermentación individual con una cepa de levadura *S. cerevisiae* que se basa en el protocolo nº3 de inmovilización (Tabla 2, PF1). (Duarte *et al.*, 2013 / Kreigel *et al.*, 2013) el cuál presenta una concentración de alginato de 4%, y el tiempo de contacto con Ca₂Cl 2% se aumentó a 1 hora. Durante los 22 días de seguimiento de la fermentación, la densidad descendió desde 1087,6 g/L llegando a 1043 g/L. La fermentación alcohólica es un proceso exotérmico, por lo que la temperatura del vino aumenta. (Murray *et al.*, 2016). La alta temperatura obstaculiza el término de la fermentación, deshaciendo las perlas de alginato de sodio, liberando las levaduras encapsuladas al medio.

Debido a esto, se ajustó la prueba y se disminuyó la temperatura de fermentación en la siguiente prueba a 16 °C. Esta prueba se realizó de acuerdo con el protocolo nº 4.a, en donde utilizaron dos cepas de *S. cerevisiae*, ScQ y ScR, para evaluar el comportamiento de cada una (Tabla 2, PF2)

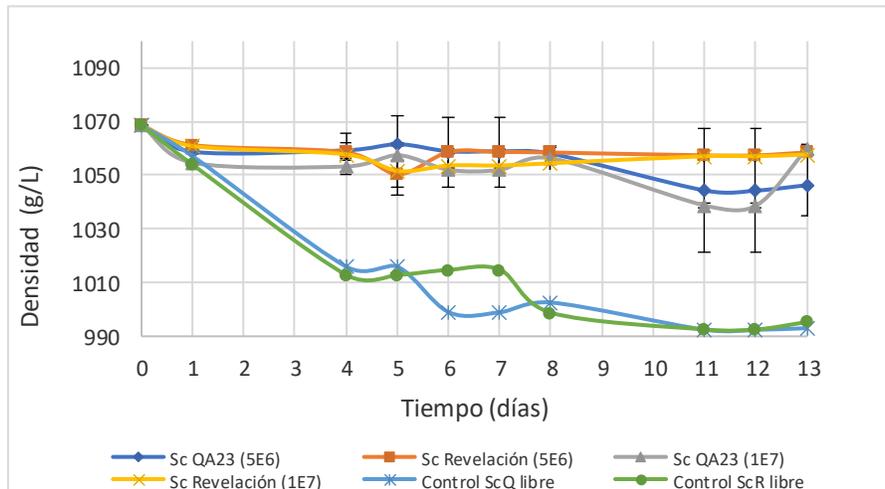


Figura 3. Evolución de la densidad del mosto a lo largo del tiempo en fermentaciones con cepas de *S. cerevisiae* inmovilizadas. Se utilizaron dos cepas *Sc QA23* y *Sc Revelación* en concentraciones diferentes 5×10^6 cel./ml y 1×10^7 cel./ml a una temperatura de fermentación de 16°C .

Como se puede observar en la Figura 3, estas fermentaciones mostraron que, aunque hubo una pequeña bajada de densidad inicial, las fermentaciones donde la levadura estaba inmovilizada se ralentizaron hasta pararse, entre 1060-1045 g/L, dependiendo de la cepa de *S. cerevisiae* utilizada, mientras que la fermentación con las levaduras libres finalizó en unos 12 días.

Posteriormente, se realizó otra prueba con el mismo protocolo, en donde se mantuvo la temperatura de 16°C , variando la concentración de levadura inmovilizada, la cual se aumentó a 3×10^8 cel./ml (Tabla 2, PF3). Este aumento se realizó para poder evaluar si las paradas de fermentación se debían a la cantidad de inóculo inmovilizado, y el hecho que las levaduras inmovilizadas no pudieran crecer y faltara biomasa total para acabar la fermentación. En esta prueba se observó que las fermentaciones con levadura inmovilizada a más alta concentración también se paraban, y al día 15 presentaban una densidad 1065 g/L (Figura 4). Por otro lado, la OD_{600 nm} era de 0,015, lo que demuestra que con este protocolo y temperatura no hay una liberación de las levaduras al medio, pero tampoco fermentan bien.

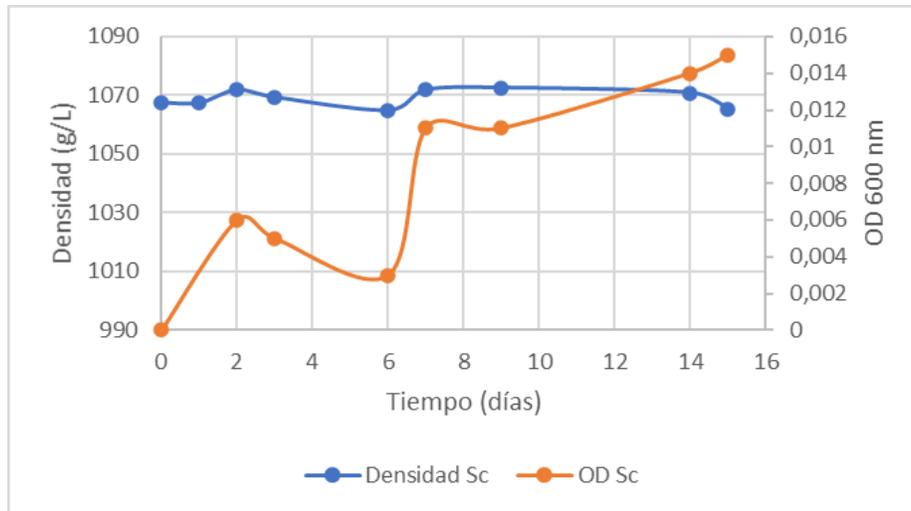


Figura 4 Seguimiento de la fermentación de la levadura *S. cerevisiae*, utilizando el protocolo 4.a, a una temperatura de fermentación de 16°C.

La medición de OD_{600 nm}, tiene como función evaluar el aumento de la biomasa total. Es común observar que la OD aumenta cuando aumentan las poblaciones de levaduras. Esto demuestra que el aumento de la biomasa se debe al aumento de las levaduras deseadas y no a un agente contaminante. Analizando los resultados anteriores, se puede afirmar que la encapsulación en alginato de sodio presenta sensibilidad a temperaturas altas (28°C), liberando parte de las levaduras al medio.

Sin embargo, con una temperatura relativamente baja (16°C), aunque no hay liberación, se observa una ralentización o parada de la fermentación alcohólica. Es por esto que se realizó otra prueba en donde se evaluó una temperatura de fermentación de 22°C, añadiendo dos concentraciones diferentes de inóculo, manteniendo la misma cepa de levadura que el experimento anterior. (ScQ) (Tabla 2, FP4) El resultado del experimento mostró que las fermentaciones con levadura inmovilizada, al día 12 presentaban una densidad de 1074 g/L, mientras que el control presentaba una densidad de 994 g/L (Figura 5). La temperatura no hizo mejorar la cinética de fermentación descartando este factor. Parece por lo tanto que el problema es el protocolo de inmovilización, que no permite a las células fermentar correctamente.

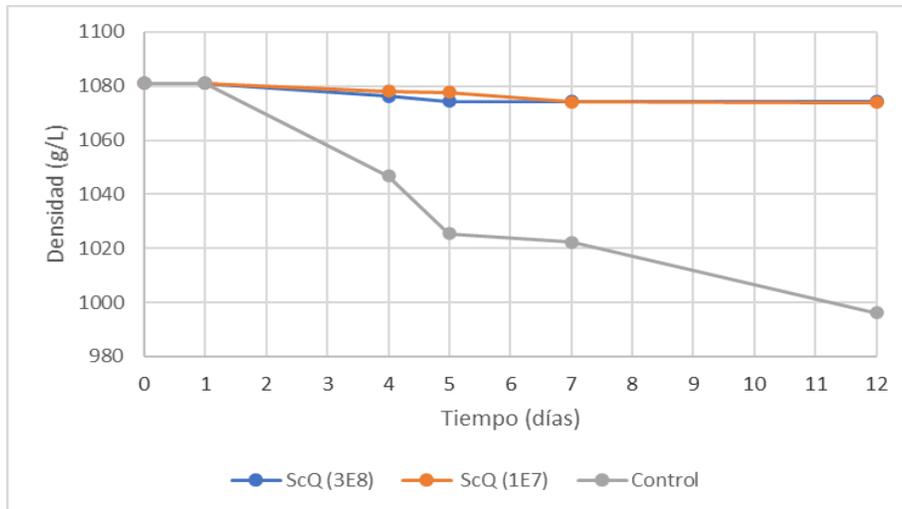


Figura 5 Seguimiento de la fermentación de la levadura ScQ, con distintas concentraciones 3×10^8 y 1×10^7 , utilizando el protocolo de inmovilización 4.a, a una temperatura de fermentación de 22 °C.

Por tanto, la siguiente prueba de fermentación se realizó modificando la concentración de alginato para inmovilizar las levaduras, utilizando 2 y 3%, y también se realizaron pruebas con 0 y 5% de formaldehído, para observar si este paso intervenía en la viabilidad de las levaduras inmovilizada (Tabla 2, PF5). En la Figura 6, podemos observar que las fermentaciones con levadura inmovilizada con menor porcentaje de alginato, y tratada con 2% de formaldehído, al día 10 tenían una densidad de 1054 g/L, mostrando una disminución lenta de la densidad lenta. Mientras que las fermentaciones con levadura inmovilizada y sin tratamiento de formaldehído pudieron fermentar correctamente, obteniendo una densidad entre 990-1000 g/L al día 10, la inmovilizada con 2% de alginato fermentó mejor que la de 3% de alginato. El control libre al día 10, finalizó con una densidad de 994 g/L.

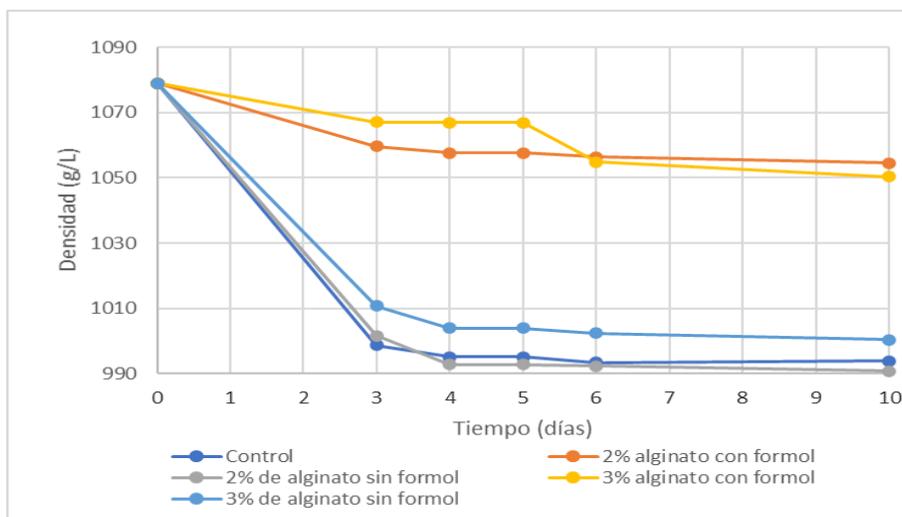


Figura 6 Seguimiento de la fermentación con levadura *S. cerevisiae*, utilizando el protocolo 4.a, con diferentes concentraciones de alginato y en presencia o ausencia de formaldehído, a una temperatura de fermentación de 22°C

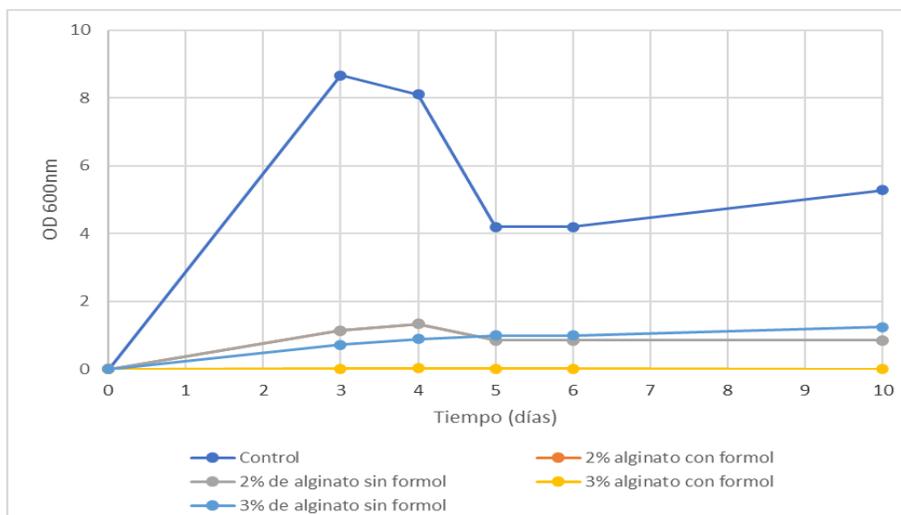


Figura 7 Variación de la O.D.a 600 nm de las fermentaciones con levadura *S. cerevisiae*, utilizando el protocolo 4.a. Con diferentes concentraciones de alginato y en presencia o ausencia de formaldehído, a una temperatura de fermentación de 22°C.

La Figura 7 muestra que la OD_{600 nm} fue mayor en las condiciones sin formaldehído, indicando que hubo una pequeña liberación de levaduras al medio, aunque los valores fueron mucho menores que en la fermentación con levaduras libres. Con este experimento podemos observar que el porcentaje de formaldehído tiene relación con la viabilidad de las levaduras inmovilizadas, ya que las inmovilizadas con 2 y 3% de alginato en presencia de formaldehído no fueron capaces de acabar la fermentación a diferencia de las fermentaciones en ausencia de formaldehído, que sí que fermentaron.

Debido a este comportamiento, se realizó la siguiente prueba de fermentación variando en la cantidad de alginato (2 y 3%) y formaldehído (0 y 2%), y realizando una doble inclusión de las levaduras inmovilizadas (Tabla 2, PF6).

La doble inclusión descrita en el protocolo de Hidalgo *et al.* (2011) se refiere a una vez las levaduras encapsuladas en alginato de sodio, se introducen en una solución estéril de formaldehído (5%) para que penetre ligeramente en las perlas e inactive las levaduras de la periferia. Luego se lavan con abundante agua, posteriormente con una solución de Ca₂Cl a una concentración de 2%, y nuevamente se lavan con agua. Finalmente se realiza una segunda capa de alginato de sodio a una concentración de 0,2% durante 5 minutos en agitación, formándose así un recubrimiento estéril de alginato de calcio. De esta manera se obtienen perlas que contienen levaduras activas atrapadas en su interior, y rodeadas de dos recubrimientos de seguridad, para evitar la salida hacia el exterior de las levaduras.

El resultado del experimento mostró que las fermentaciones con levadura inmovilizada (2% y 3% de alginato) con formaldehído, a los 5 días de fermentación tenían una densidad de 1054 g/L aproximadamente, y las fermentaciones con 2% de alginato más 2% de formaldehído, con doble capa, presentaban una densidad de 1028 g/L (Figura 8). En cambio, las fermentaciones con 2% de alginato, sin formaldehído y con doble capa, a los 5 días de fermentación, tenían densidad 994,8 g/L. Mientras que el control finaliza con una densidad de 991 g/L. Con estos resultados, se puede decir que menor cantidad de alginato para la encapsulación de las levaduras, la fermentación se desarrolla mejor, y que la presencia o ausencia de formaldehído interviene directamente en la capacidad fermentativa de las levaduras.

Por otro lado, en la evolución de la OD_{600nm}, se observa que en las fermentaciones con 2 y 3% de alginato con formaldehído (2%), no existe un crecimiento de levaduras en el medio. Mientras que, en las pruebas de fermentación con alginato, pero sin formaldehído, existe un pequeño aumento de la población (Figura 9). Por otro lado, en las fermentaciones con doble capa, en presencia de formaldehído, se observa que los primeros dos días presenta una población baja, pero a media que transcurre la fermentación la OD aumenta. Y las fermentaciones con doble capa, en ausencia de formaldehído, se observa un aumento de la población notoria desde el primer día.

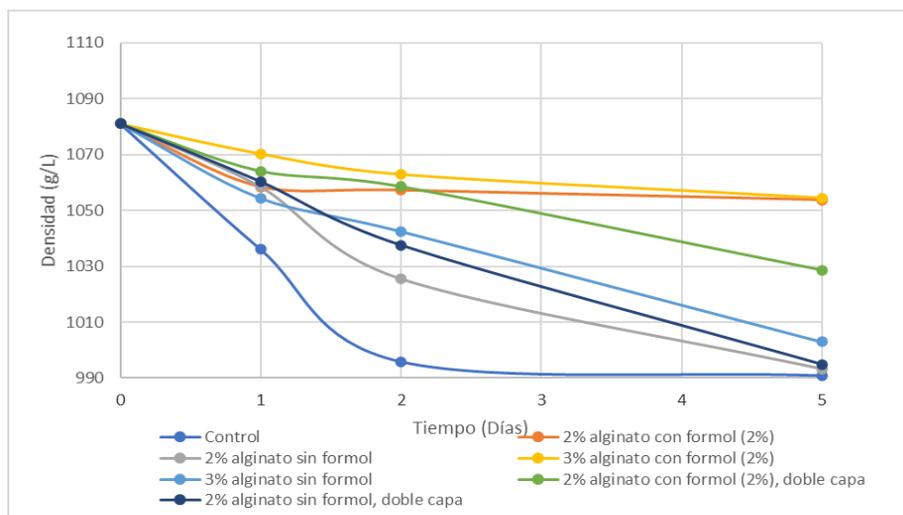


Figura 8. Seguimiento de la fermentación con levadura *S. cerevisiae* con concentración de 1×10^8 cel./ml, utilizando el protocolo 4.b. Con diferentes concentraciones de alginato, en presencia o ausencia de formaldehído y en presencia o ausencia de doble capa, a una temperatura de fermentación de 22°C.

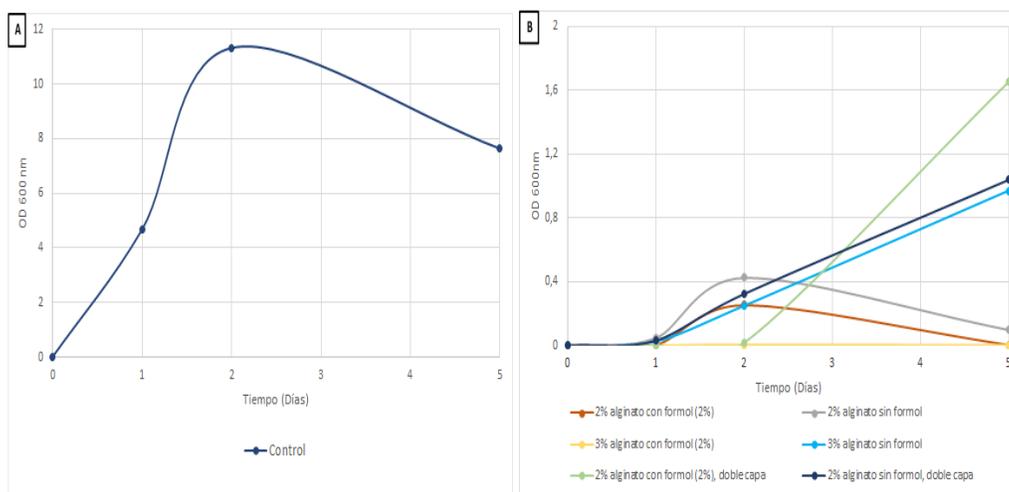


Figura 9. Variación de la OD 600 nm, de las fermentaciones con levadura *S. cerevisiae* con concentración de 1×10^8 cel./ml, utilizando el protocolo 4.b. Con diferentes concentraciones de alginato, en presencia o ausencia de formaldehído y en presencia o ausencia de doble capa, a una temperatura de fermentación de 22°C.

Observando estos últimos resultados, que presentan un desarrollo más normal de la fermentación, se procedió a realizar una prueba con una cepa *no-Saccharomyces*, en concreto una cepa de *T. delbrueckii*. (Tabla 2, PF7). En esta última prueba con fermentación individual se realizó el seguimiento de las fermentaciones durante los primeros tres días. Según Padilla *et al.*, 2016, se sabe que las levaduras *no-Saccharomyces* tienen una mayor contribución durante los primeros estadios de la fermentación alcohólica. Por lo que las levaduras *no-Saccharomyces*, en nuestro caso *T. delbrueckii* se utilizan en fermentaciones secuenciales, donde primero se inocula la cepa de *no-Saccharomyces*, y luego de 48 horas aproximadamente se inocula la cepa de *Saccharomyces*.

El resultado del experimento mostró que al día 3 de fermentación, las levaduras inmovilizadas (alginato 2% y 3%), con formaldehído (2%) presentaban una densidad entre 1058 – 1066 g/L. Las fermentaciones con 2% y 3% de alginato sin formaldehído presentaban una densidad entre 1016-1027 g/L. Mientras que el control presentaba un descenso de densidad de 1000 g/L aproximadamente (Figura 10).

Esto se relaciona directamente con el resultado de las OD_{600 nm}, ya que como se observa en la Figura 11, el control presenta un evidente aumento de la población, mientras que la fermentación con 2 y 3% de alginato y sin presencia de formaldehído, se muestran con un ascenso más notorio de población, en comparación con las fermentaciones de 2 y 3% de alginato con formaldehído, en las cuales la parada de fermentación es visible. Este resultado es directamente proporcional a las densidades estancadas del día 3.

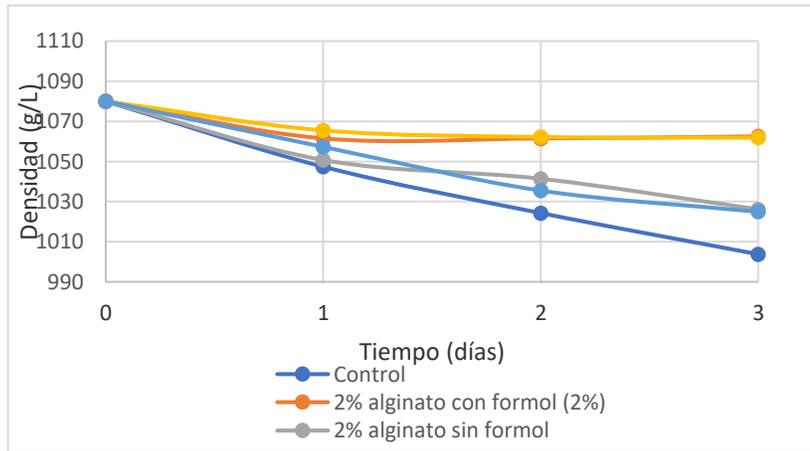


Figura 10. Seguimiento de la fermentación con *T. delbrueckii*, utilizando el protocolo 4.a, con diferentes concentraciones de alginato, en presencia o ausencia de formaldehído, a una temperatura de fermentación de 22°C.

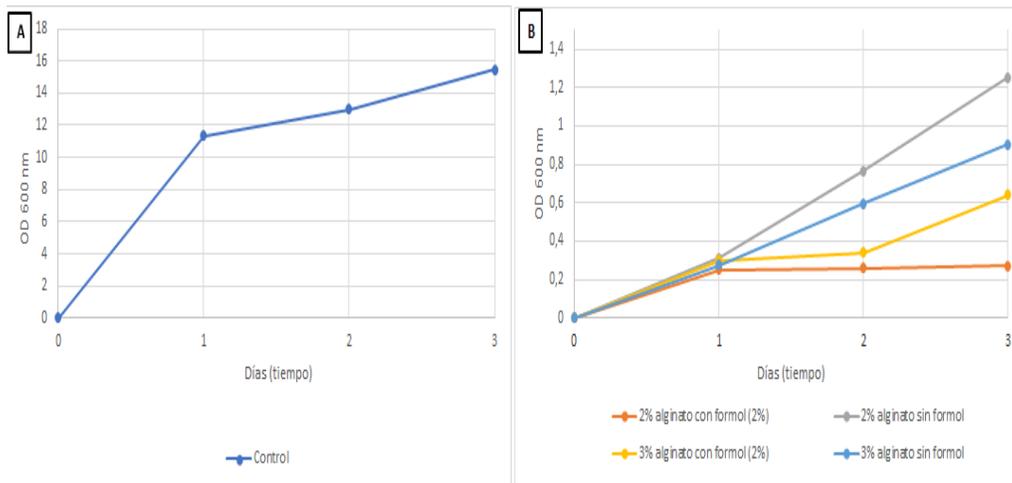


Figura 11. Variación de la O.D.a 600 nm de las fermentaciones con *T. delbrueckii*, utilizando el protocolo 4.a, con diferentes concentraciones de alginato y en presencia o ausencia de formaldehído, a una temperatura de fermentación de 22°C. A: Control, B: Pruebas de fermentación.

Luego de las distintas pruebas con cultivos puros en donde se utilizaron levaduras *S. cerevisiae* y *No-Saccharomyces*, se definieron parámetros como: concentración de alginato, concentración de formaldehído y el tiempo de acción de este. Posteriormente se realizaron nuevas pruebas de fermentación, con cultivos mixtos, probando las distintas modificaciones.

4.2 Fermentaciones secuenciales

En estos experimentos se inocularon TdB (*T. delbrueckii* Biodiva) inmovilizada, luego de unas horas se inoculó ScQ (*S. cerevisiae*, QA23) libre, en mosto sintético, y una temperatura de fermentación de 22 °C (Tabla 3). Durante el proceso de fermentación se tomaron muestras de mosto de cada fermentador y se analizó la cinética de fermentación y de las poblaciones presentes.

Según Brou *et al.*, 2018 entre las especies de levadura no-*Saccharomyces*, la atención se ha centrado en *T. delbrueckii*, ya que esta levadura ha mostrado un impacto positivo en la calidad organoléptica de los vinos y una baja producción de compuestos indeseables como ácido acético, acetato de etilo, acetaldehído, acetoína, sulfuro de hidrógeno y fenoles volátiles que disminuyen sabores extraños. Sin embargo, las no-*Saccharomyces*, por lo general, no pueden acabar la fermentación.

Por ello, en las siguientes pruebas de fermentación se inmovilizaría *T. delbureckii*, inoculando posteriormente *S. cerevisiae*. Se realizaron fermentaciones secuenciales en paralelo, las que consistían en fermentaciones inmovilizadas y fermentaciones libres, estas se realizaron en triplicado. Como se puede observar en la Tabla 3, se utilizaron dos concentraciones de levaduras distintas, para las levaduras inmovilizadas se utilizaba 1×10^8 cel./ml, mientras que en las levaduras libres se utilizaba 2×10^6 cel./ml. Se inoculó *S.cerevisiae* a las 36 horas para las levaduras inmovilizadas, mientras que para las levaduras libres se inoculo a las 24 horas. El resultado del experimento mostró que las fermentaciones inmovilizadas al día 3 de fermentación estaban paradas con una densidad entre 1066-1074 g/L (Figura 12). Luego, una vez añadida la levadura *S. cerevisiae* fermentaron normalmente, y al día 8 de fermentación presentaban una densidad entre 990 – 993 g/L, tanto las que empezaron con *T. delbrueckii* libre como inmovilizada. Además, la OD muestra que las levaduras inmovilizadas no se liberaron al medio, y que *S cerevisiae* pudo crecer normalmente una vez inoculada en el medio, incluso en presencia de las perlas de alginato de *T. delbrueckii*, llegando a poblaciones máximas parecidas.

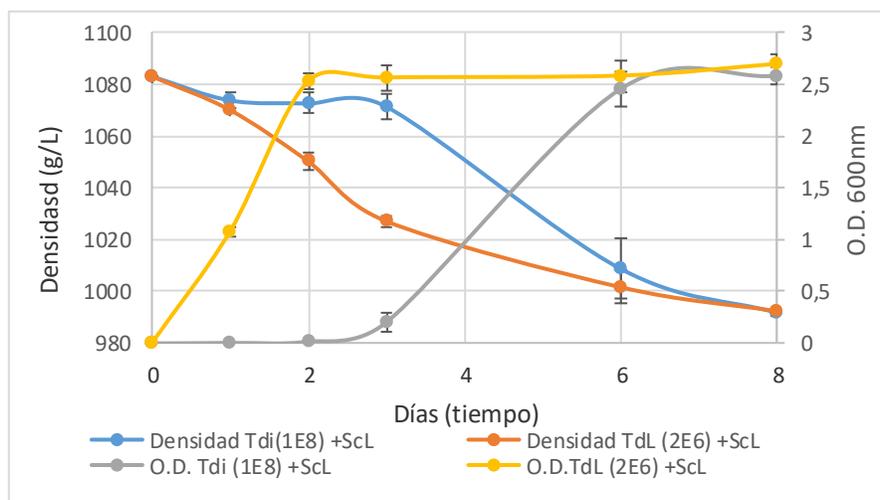


Figura 12 Seguimiento de la fermentación con dos pruebas diferentes de fermentación: *T. delbrueckii* inmovilizada (Tdi) con *S. cerevisiae* libre (ScL), y *T. delbrueckii* libre con *S. cerevisiae* libre. En la prueba de

inmovilización se utilizó alginato al 2% y en presencia de formaldehído al 2%, esta fermentación se realizó a una temperatura de fermentación de 22 °C.

Finalmente, se realizó una prueba de fermentación, con el protocolo n° 4a Duarte, utilizando una concentración de alginato del 2%. Realizando el experimento con presencia de formaldehído para las inmovilizadas, y ausencia de formaldehído para las levaduras libres. En concentraciones de inóculo de 1×10^8 (fermentaciones con inmovilización) y 2×10^6 cel./ml. (fermentaciones libres) de *T. delbrueckii*, y luego a las 40 horas se inoculó *S. cerevisiae*. Como control se utilizaron fermentaciones individuales de TdB y ScQ, esto para observar su cinética de fermentación comparándolo con las levaduras inmovilizadas y libres en inoculación secuencial. Los resultados de este experimento (Figura 14), muestran que las fermentaciones con levaduras inmovilizadas terminaron su densidad entre 990- 995 g/L al día 10. Las fermentaciones con levaduras libres terminaron su densidad entre 992-996 g/L.

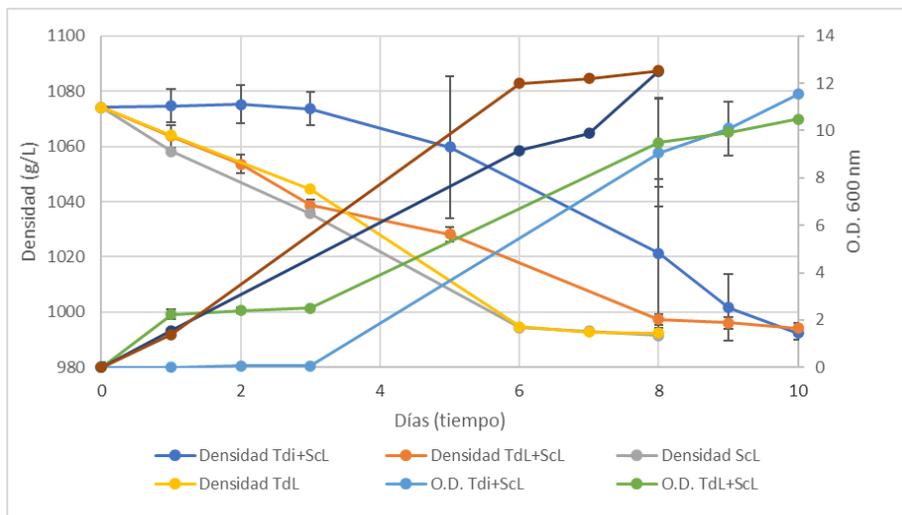


Figura 14 Seguimiento de la fermentación con *T. delbrueckii*, con diferentes concentraciones de alginato, en presencia o ausencia de formaldehído, a una temperatura de fermentación de 22°C.

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Varios factores físicos, como la concentración de alginato, el diámetro de las perlas y la carga celular, juegan un papel importante en el éxito de los sistemas inmovilización, ya que todos los factores tienen un impacto en la tasa de transferencia de masa del sustrato y el producto formado. De manera que las condiciones seleccionadas como óptimas en la inmovilización de las fermentaciones individuales fueron la concentración de alginato 2 y 3% de alginato, en ausencia de formaldehído, y a una temperatura de 22 °C, ya que obtuvieron un notorio descenso en la densidad de fermentación.

En las fermentaciones secuenciales, se evaluó el porcentaje de alginato en la inmovilización de una levadura *no-Saccharomyces*, en presencia o ausencia de formaldehído, en temperaturas de fermentación de 22 °C. Para luego transcurridas unas horas inocular *Saccharomyces* libre.

Obteniendo un término de la fermentación, las concentraciones de 2% de alginato, con 2 % de formaldehído a una temperatura de 22 °C. Esto se puede deber a la concentración del inóculo de levadura, en conjunto con la cantidad de alginato, y formaldehído a utilizar. La temperatura de fermentación sería también un factor importante, en relación con el alginato de sodio, ya que a mayor temperatura se deshacía.

La encapsulación de levaduras ofreció un intercambio de sustratos y productos, sin tener contacto con las células libres, permitiendo que las levaduras *no-Saccharomyces* no interviniera en el crecimiento de *S. cerevisiae*, en donde coexistieron ambas, finalizando adecuadamente la fermentación alcohólica.

En ese sentido, el uso de microencapsulación para la inmovilización celular podría representar una estrategia para mejorar la competitividad de las levaduras *no-Saccharomyces* durante las fermentaciones secuenciales. Siendo esta técnica, una técnica rentable, fácil de replicar, presentando buenas características de conservación, no susceptible a contaminaciones, y sin intervenir en la calidad final del producto.

Como investigaciones futuras, por un lado, se podría ampliar el estudio, observando si la encapsulación es una buena solución para reducir el contenido de etanol en los vinos. Otro posible estudio, sería realizar la encapsulación de levaduras con alginato de sodio en mosto natural, evaluando cómo la inmovilización interviene en la formación de aromas, características químicas y sensoriales de los vinos obtenidos.

Además de estos estudios, se podría repetir el experimento con otras cepas de *T. delbrueckii*, o probar con otras especies de levaduras *no-Saccharomyces*, para observar el comportamiento fermentativo de estas levaduras frente a la encapsulación.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Albergaria, H., & Arneborg, N. (2016). Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(5), 2035–2046
2. Belda, I., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., Calderón, F., & Benito, S., (2016). Outlining the influence of non-conventional yeasts in wine ageing over lees. *Yeast* 33 (7), 329–338. <https://doi.org/10.1002/yea.3165>.
3. Belda, I., Zarraonaindia, I., Perisin, M., Palacios, A., & Acedo, A. (2017). From Vineyard Soil to Wine Fermentation: Microbiome Approximations to Explain the “terroir” Concept. *Frontiers in Microbiology*. 8: 821. doi: 10.3389/fmicb.2017.00821
4. Beltran, G., Novo, M., Rozes, N., Mas, A., & Guillamon, J. M. (2004). Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentations. *FEMS Yeast Research*, 4(6), 625–632. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2003.12.004>
5. Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I., & Dubourdieu, D. (2008). Impact of mixed *Torulasporea delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International journal of food microbiology*, 122(3), 312–320. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.023>
6. Benito S. (2018). The impact of *Torulasporea delbrueckii* yeast in winemaking. *Applied Microbial and Biotechnology*, 102(7), 3081–3094. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8849-0>
7. Bidan, P., Divies, Ch., & Dupuy, P., France Patent no. 2432045, 1980.
8. Blevé, G., Tufariello, M., Vetrano, C., Mita, G., & Grieco, F. (2016). Simultaneous Alcoholic and Malolactic Fermentations by *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni* Cells Co-immobilized in Alginate Beads. *Frontiers in Microbiology*. 7:943. doi: 10.3389/fmicb.2016.00943.
9. Borgogna, M., Bellich, B., Zorzini, L., Lapasin, R., & Cesàro, A. (2010). Food microencapsulation of bioactive compounds: Rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling systems. *Food Chemistry*, 122, 416-423.
10. Canonico, L., Agarbati, A., Comitini, F., & Ciani, M. (2016). *Torulasporea delbrueckii* in the brewing process: A new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content. *Food microbiology*, 56, 45-51.

11. Capozzi, V.; Garofalo, C.; Chiriatti, M.A.; Grieco, F.; Spano, G. (2015). Microbial Terroir and Food Innovation: The Case of Yeast Biodiversity in Wine. *Microbiological Research* 181,75–83.
12. Ciani, M.; & Comitini, F. (2019). Use of non-Saccharomyces yeasts in red winemaking. In *Red Wine Technology*; Antonio, M., Ed.; Elsevier:Amsterdam, The Netherlands, ; pp. 51–68. 13.
13. Ciani, M., Beco, L., & Comitini, F. (2006). Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *International Journal of Food microbiology*, 108(2), 239–245. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.012>
14. Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., & Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: A new perspective on the use of non-Saccharomyces yeasts in winemaking. *FEMS Yeast*.
15. Ciani, M., Capece, A., Comitini, F., Canonico, L., Siesto, G., & Romano, P. (2016). Yeast Interactions in Inoculated Wine Fermentation. *Frontiers in. Microbiology* 7:555. doi: 10.3389/fmicb.2016.00555.
16. Ciani, M., & Maccarelli, F. (1998), Oenological properties of non-Saccharomyces yeasts associated with wine-making. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*.14: 199-203.
17. 2013 Duarte, J. C., Rodrigues, J. A., Moran, P. J., Valença, G. P., & Nunhez, J. R. (2013). Effect of immobilized cells in calcium alginate beads in alcoholic fermentation. *AMB Express*, 3(1), 31. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-31>.
18. Hidalgo Togo José. (2011). *Tratado de enología (2ª)*. Mundi-Prensa.
19. Jolly, N., Augustyn, O., & Pretorius, I. (2017). The role and use of non-saccharomyces yeasts in wine production. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 27, 15-39.
20. Jolly NP, Varela C, Pretorius (2014) Not your ordinary yeast: non- Saccharomyces yeasts in wine production uncovered. *Federation of European Microbiological Societies*, 14:215-237.
21. Kregiel, D., Berlowska, J., & Ambroziak, W. (2013). Growth and metabolic activity of conventional and non-conventional yeasts immobilized in foamed alginate. *Enzyme and Microbial Technology*, 53(4), 229–234. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.05.010>.

22. Loira, I., Vejarano, R., Bañuelos, M. A., Morata, A., Tesfaye, W., Uthurry, C., Villa, A., Cintora, I., & Suárez-Lepe, J. A. (2014). Influence of sequential fermentation with *Torulasporea delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on wine quality. *LWT - Food Science and Technology*, 59(2P1), 915–922.
23. Medina, K., Boido, E., Fariña, L., Gioia, O., Gomez, M. E., Barquet, M., et al. (2013). Increased flavour diversity of Chardonnay wines by spontaneous fermentation and co-fermentation with *Hanseniaspora vineae*. *Food Chemistry*. 141, 2513–2521. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.04.056.
24. Moreno-García J, García-Martínez T, Mauricio JC and Moreno J (2018) Yeast Immobilization Systems for Alcoholic Wine Fermentations: Actual Trends and Future Perspectives. *Frontiers in Microbiology* 9: 241. doi: 10.3389/fmicb.2018.00241.
25. Murray, C., Quiñones, G., Cortés, Escobar, F.R., & Cardemil, J.M. (2016). Solar assisted absorption machine for the fermentation cooling and maceration heating processes in the winemaking industry. *Energy Procedia* 91, 805–814.
26. Padilla, B., Gil, J. V., & Manzanares, P. (2016). Past and future of non-*Saccharomyces* yeasts: From spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity. *Frontiers in Microbiology*, 7, 411.
27. Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donéche, B; & Lonvaud, A. (2006). White Winemaking. In *Handbook of enology Vol. 1: The microbiology of wine and vinifications*, (2nd ed.) (pp. 397-439). West Sussex, England: John Wiley & Sons Ltd. Nepal.
28. Tsakiris, A., Sipsas, V., Bekatorou, A., Mallouchos, A., & Koutinas, A.A. (2004). Red wine making by immobilized cells and influence on volatile composition. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 52(5):1357-1363.
29. Varela, C., Dry, P., Kutyna, D., Francis, I., Henschke, P., Curtin, C., 6 Chambers, P. (2015). Strategies for reducing alcohol concentration in wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21, 670–679, doi:10.1111/ajgw.12187.

7. ANEXOS

Anexo 1. Protocolos de inmovilización

Protocolo nº1: Autor: J. Hidalgo

Concentración final: levaduras 2 % peso seco, alginato Na 2.5%

- 1) Resuspender 1 g levadura LSA en 10 ml agua (aprox 1 g = 6×10^9 , concentración final 6 x cel/ml), o 25 ml de mosto en plena actividad fermentativa.
- 2) Disolver 0.5 g alginato de sodio en 10 ml agua estéril (Alginic acid sodium salt from brown algae)
- 3) Mezclar suavemente las levaduras con el alginato (concentración final 3 x 10^8 cel/ml)
- 4) Calcular el volumen necesario para inocular cada fermentador a unos 5 x cel/ml.
- 5) Con una jeringa de 10 ml y aguja de 1 mm, tirar la preparación gota a gota, desde 20 cm alto, a un vaso de precipitados con 200 ml de CaCl₂ 2% y agitación magnética suave.
- 6) Gelificación y formación de perlas de aproximadamente 3 mm
- 7) Dejar unos 30 minutos en agitación, sacarlas y lavarlas con agua estéril.

Doble inclusión:

- Introducir las perlas en una solución estéril de formaldehído al 5%, y mantenerlas en agitación durante 3-4 minutos, para que el formaldehído penetre ligeramente en las perlas e inactive las levaduras de la periferia.
- Sacar las perlas y lavarlas con abundante agua estéril.
- Lavar las perlas con una solución de CaCl₂ al 2%, y de nuevo con agua.
- Introducir las perlas en una solución estéril de alginato de sodio al 0,2% durante 5 minutos, en agitación, formándose un recubrimiento estéril de alginato cálcico.
- Introducir las perlas en una solución de CaCl₂ 2%, y tenerlas en agitación durante 30 minutos para endurecer el recubrimiento.

Protocolo nº2: Diferentes concentraciones de alginato

- 1) Se preparan soluciones con diferentes concentraciones de alginato: 0,8% (0,04 g), 2% (0,10 g) y 4% (0,20 g) respectivamente.
- 2) El alginato se disuelve en 5ml de agua estéril a temperatura ambiente
- 3) De igual forma, se homogenizan 5 ml de agua estéril con la cantidad de levadura a inocular
- 4) Con una jeringa de 10 ml y aguja de 1 mm, tirar la preparación gota a gota, desde 20 cm alto, a un vaso de precipitados con 200 ml de CaCl₂ 2% y agitación magnética suave
- 5) Se forma una gelificación de aproximadamente 3 mm
- 6) Dejar 30 minutos en agitación suave, con CaCl₂ 2%
- 7) Sacar las perlas y lavarlas con agua destilada estéril
- 8) Dejar con formaldehído 5% en agitación durante 3- 4 minutos
- 9) Lavar con agua destilada estéril
- 10) Lavar con CaCl₂ al 2%
- 11) Lavar con agua destilada estéril

- 12) Ponerlas en solución estéril de alginato de sodio 0,2%, y dejar en agitación suave por 5 minutos
- 13) Poner perlas en solución CaCl₂ al 2%, en agitación suave por 30 minutos
- 14) Lavar en agua destilada estéril
- 15) Vaciar las perlas a los fermentadores con la cantidad de mosto correspondiente

Protocolo n°3: Mix de técnicas autores: Kreigel, 2013/Duarte, 2013

- 1) Se preparó una solución al 4% de alginato de sodio (0,2 gramos + 5 ml de agua destilada estéril), más la cantidad correspondiente de levadura + 5ml de agua destilada estéril
- 2) Con una jeringa de 10 ml y aguja de 1 mm, tirar la preparación gota a gota, desde 20 cm alto, a un vaso de precipitados con 40 ml de CaCl₂ 2% y agitación magnética suave.
- 3) Dejar 30 minutos en agitación suave, con CaCl₂ 2%.
- 4) Dejar en formaldehído al 5%, con 5 minutos de agitación suave
- 5) Lavar con agua destilada estéril
- 6) Añadir el alginato al 1% con 5 minutos de agitación suave
- 7) Añadir CaCl₂ al 2% con 30 minutos de agitación suave
- 8) Lavar en agua destilada estéril
- 9) Vaciar las perlas a los fermentadores con la cantidad de mosto correspondiente

Protocolo n° 4.a: Duarte, 2013

- 1) En un tubo falcon añadir la cantidad correspondiente de levadura
- 2) Se centrifuga a 1000 rpm por 5 minutos
- 3) Se elimina el sobrenadante, dejando el pellet
- 4) Se agregan 5 ml de agua estéril, para luego homogenizar
- 5) Se añade 3% (0,15 gramos) de alginato de sodio + 5 ml de agua destilada estéril
- 6) Se vierte el contenido en una jeringa estéril de 10 ml y aguja de 1 mm, tirar la preparación gota a gota, desde 20 cm alto, a un vaso de precipitados con 40 ml de CaCl₂ 2% y agitación magnética suave.
- 7) Dejar las perlas en agitación por 1 hora con CaCl₂ 2%
- 8) Sacar las perlas y lavar con agua destilada estéril
- 9) Poner las perlas en formaldehído al 5%, por 5 minutos
- 10) Lavar con agua destilada estéril
- 11) Vaciar las perlas a los fermentadores con la cantidad de mosto correspondiente

Protocolo nº4.b: Duarte, 2013+ doble inclusión

- 1) En un tubo falcon añadir la cantidad correspondiente de levadura
- 2) Centrifugar a 1000 rpm por 5 minutos
- 3) Eliminar el sobrenadante, dejando el pellet
- 4) Agregar 5 ml de agua estéril, y homogenizar
- 5) Añadir 3% de alginato de sodio (0,15 gramos + 5 ml de agua destilada estéril)
- 6) Se vierte el contenido en una jeringa estéril de 10 ml y aguja de 1 mm, tirar la preparación gota a gota, desde 20 cm alto, a un vaso de precipitados con 40 ml de CaCl₂ 2% y agitación magnética suave.
- 7) Dejar las perlas en agitación por 1 hora con CaCl₂ 2%
- 8) Sacar las perlas y lavar con agua destilada estéril
- 9) Poner las perlas en formaldehído al 2%, por 5 minutos
- 10) Lavar con agua destilada estéril
- 11) Doble inclusión:
 - Introducir las perlas en una solución estéril de alginato sódico al 0,2% durante 5 minutos, en agitación, formándose un recubrimiento estéril de alginato cálcico
 - Añadir a una solución de CaCl₂ 2% y agitar durante 30 minutos, para endurecer el recubrimiento.
- 12) Lavar con agua destilada estéril
- 13) Vaciar las perlas a los fermentadores con la cantidad de mosto correspondiente.

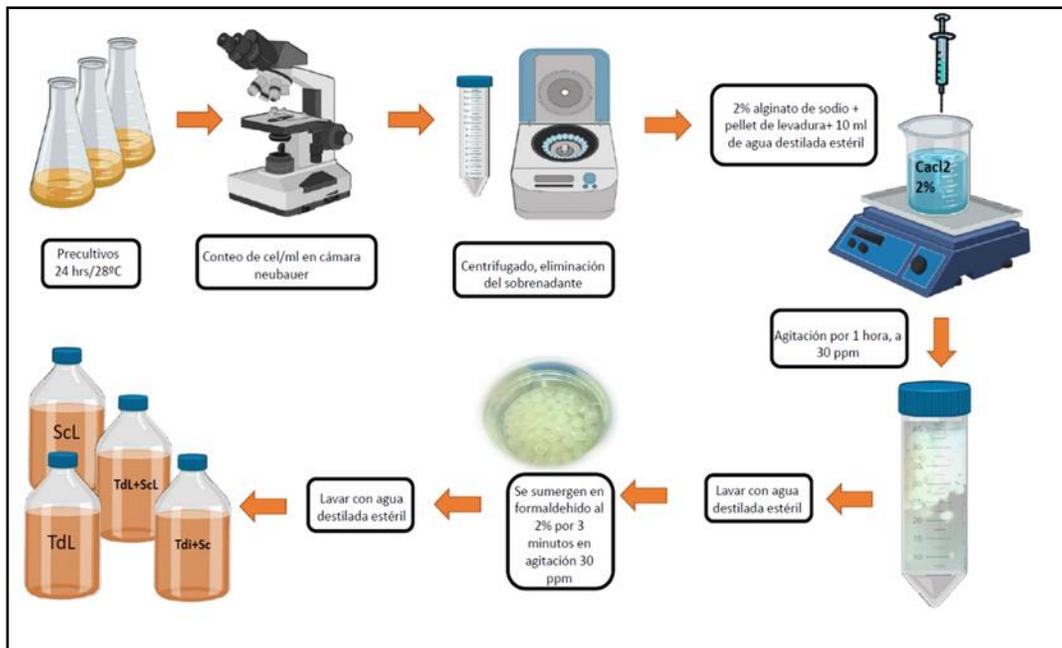


Figura 15. Protocolo nº 4.a de inmovilización de perlas de alginato de sodio.

Anexo 2. Preparación de mosto sintético

1. Pesares reactivos (Tabla 4) y añadir agua destilada sin llenar completamente la probeta.
2. Poner en la autoclave.
3. Pasar a un vaso de precipitados. Añadir vitaminas, aminoácidos, oligoelementos y factores de anaerobiosis (Tabla 5).
4. Ajustar el pH a 3,3, con una solución de NaOH
5. Añadir agua destilada hasta el volumen final deseado
6. Filtrar (utilizando filtros S-Pack de poro de 0,22 μm) usando una bomba de vacío.

Cantidades de reactivos de mosto sintético

Tabla 4. Reactivos para agregar en la primera etapa, antes de autoclavar.

I.	Reactivo	g/L
	Glucosa	100
	Fructosa	100
	Ácido málico	5
	Ácido cítrico monohidratado	0,5
	Ácido tartárico	3
	KH_2PO_4	0,75
	K_2SO_4	0,5
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,16
	NaCl	0,2
	NH_4Cl (300 mg/L)	0,46

Tabla 5. Reactivos para agregar en la segunda etapa, después de autoclavar.

II.	Reactivo	mL/L
	Oligoelementos	1
	Vitaminas	10
	Factores de anaerobiosis	1
	Aminoácidos (300mg/L)	10

Anexo 3. Preparación de los medios de cultivo, diferenciales y selectivos

1. Medio de cultivo: líquido de levadura, peptona, dextrosa (YPD), compuesto por:

Para el cultivo de levaduras se preparó medio “Yeast extract, peptone, dextrose” (YPD, Panreac, Barcelona, Spain)

- a) Añadir Glucosa en polvo (Panreac) 20 g/L
- b) Añadir Peptona en polvo (Panreac) 20 g/L
- c) Añadir Extracto de levadura en polvo (Panreac) 10 g/L
- d) Disolver en agua destilada 1000 ml

El medio fue esterilizado a 121°C en autoclave, posteriormente se almacenó a temperatura ambiente

2. Medio de cultivo: sólido de levadura-peptona-dextrosa (YPD):

- a) Añadir Glucosa en polvo (Panreac) 20 g/L
- b) Añadir Peptona en polvo (Panreac) 20 g/L
- c) Añadir Extracto de levadura en polvo (Panreac) 10 g/L
- d) Añadir Agar en polvo (Panreac) 17 g/L
- e) Disolver en agua destilada 1000 ml

Este medio se preparó de forma similar al medio líquido YPD, incorporando el agar una vez homogenizado el resto de material. El medio se esterilizó a 121°C en autoclave. A continuación, el medio se vertió en una cantidad determinada en placas Petri, una vez ya gelificado, las placas fueron almacenadas a temperatura ambiente.

3. Medio selectivo: Agar Lisina:

- a) Añadir Yeast carbon base (Difco) 11,75 g
- b) Añadir Lisina.HCl en polvo (Sigma) 2,5 g
- c) Añadir agar bacteriológico en polvo (Panreac) 20 g
- d) Disolver en agua destilada 1000 ml

Este medio se preparó y se homogeneizó, para luego autoclavar a 121°C. A continuación, el medio se vertió en una cantidad determinada en placas Petri, una vez ya gelificado, las placas fueron almacenadas a temperatura ambiente.

4. Medio diferencial: “Wallerstein nutrient”:

- a) Medio Wallerstein (Difco) 80 g
- b) Agua destilada 1000 ml

Se homogeneizó, y para luego autoclavar a 121°C. A continuación, el medio se vertió en una cantidad determinada en placas Petri, una vez ya gelificado, las placas fueron almacenadas a temperatura ambiente.

8. AUTOEVALUACIÓN

Mi experiencia con el sector microbiológico había sido más bien lejana, y siempre me llamó mucho la atención, ya que en esta área están muchas respuestas de las interrogantes que aparecen en los procesos de elaboración de las bebidas fermentadas.

Al principio del trabajo de máster, tuve dificultades para mantener un ambiente de esterilidad, por lo que se presentaron contaminaciones en los experimentos. Transcurrido el tiempo, fui mejorando, de tener cuidado al momento de manipular los instrumentos, y material ocupado. Como también en poder comprender el comportamiento de las levaduras con las que trabajé.

Tras realizadas varias pruebas de fermentación, en las que algunas obtenían buenos resultados, como en otras pruebas fallidas, pude lograr cumplir con el objetivo de mi trabajo final de máster.

Por lo que la experiencia obtenida desde los resultados fallidos me sirvió para poder adquirir experiencia, y poder desarrollar el trabajo con más confianza.

Para concluir, puedo decir que la microbiología es un campo muy interesante, de arduo trabajo, en conjunto con mucha perseverancia para poder obtener resultados concisos. Esta experiencia ha sido muy enriquecedora para mi aprendizaje, consiguiendo complementar las materias teóricas del máster, en particular de la especialidad de enología, con la práctica en el laboratorio. Debido a esto, me interesaría orientar mi carrera a este sector de la investigación.

9. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a mis tutoras del trabajo fin de máster, María Jesús Torija y Gemma Beltran por ayudarme, tanto en el trabajo de laboratorio como en el escrito. Por su paciencia y por todos los conocimientos que me entregaron.

A los miembros del laboratorio de Biotecnología Enológica, muchísimas gracias por su ayuda para poder realizar los experimentos.

A mis amigos, por estar siempre, por su cariño y ayuda en estos meses, sobre todo a ti Lili. A las personas que conocí en este camino, en particular a Kathe y Michelle, muchas gracias por su compañía, y por esas conversaciones con un café o una cañita.

Finalmente, a mi familia, a Mamá y Emilio, gracias por su amor y apoyo incondicional que me han dado. Y especialmente, gracias a ti Papá, que donde quiera que estés, sé que siempre estuviste conmigo, en cada instante.