



fcefn



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGÍA
Facultad de Ciencias Exactas
Físicas y Naturales • UNSJ



INSTITUTO DE
BIOTECNOLOGÍA

Universidad Nacional de San Juan

Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Departamento de Biología

**“Selección de levaduras autóctonas aisladas del Paraje Hilario
- Calingasta para elaboración de vinos base para espumantes”.**

Trabajo Final de Licenciatura en Biología.

Autor: Mario Ricardo Cáceres Sander.

Directora: Dra. Yolanda Paola Maturano.

Codirector: Lic. Diego Bernardo Pettrignani.

Codirector: Dr. Fabio Vázquez.

San Juan, 2026

Agradecimientos:

Para empezar estas páginas agradezco a mis directores, Paola Maturano, Diego Pettrignani y Fabio Vazquez, por guiarme en este proceso con paciencia y vocación. Paola en cada corrección, cada trámite que tuve que realizar y ante cualquier duda; Diego por ser un tutor en el laboratorio, por enseñarme y confiar en mi forma de trabajar y Fabio por ser ese profesor que supo transmitir su amor a la profesión y me ayudó a confirmar que había elegido bien mi camino.

Gracias al tribunal examinador, por los consejos y sugerencias realizadas y de alguna forma darle cierre al manuscrito. Al personal del Instituto de Biotecnología que desde el primer día me recibieron con la mejor energía y con quien compartí muchas horas de laboratorio, siempre dispuestos a ayudar y a compartir una charla. A los profesores de la carrera, profesionales que supieron transmitir conocimiento con pasión, dedicación y humanidad, gracias por hacer de las clases y salidas experiencias de disfrute.

Gracias a mi familia, pilar fundamental en este proceso, a mi madre Carola, mi padre Mario, mi hermano Ignacio, mi hermana Romina, mis sobrinas Anto y Brenda, mi ahijada Delfina y mi cuñado Matias. Gracias por confiar ciegamente en mis elecciones, siguiendo y apoyando cada paso dado, gracias por ser las personas que más bancaron mis cambios de humor y mis emociones previas a cada rendida, este logro también es por y para ustedes.

Amigas y amigos de la facultad, Sara, Vale, Juan B., Juan L., Agos, Ceci, Ro, Sofi, Juampi, Franco, Flor, Magu y cada persona que conocí en estos años. Gracias por ser la grupalidad que sostuvo y que sostiene, que se alegra por cada logro, por compartir juntadas y salidas al campo llenas de risas, debates y comidas ricas.

Leandro, ese compañero que se convirtió en familia, gracias por las caminatas, viajes, cervezas, mates, música, lecturas, charlas y materias rendidas, cada decisión aconsejada, proyectos, risas y silencios. Gracias por el tiempo y siempre abrirme las puertas de tu casa. Gracias por ser y por enseñarme a ser un poco más yo.

Guada, gracias a ese viaje en primer año que nos hizo amigos para hoy llegar a planear juntos, reírnos, emocionarnos y disfrutar cada paso que damos, ayudarnos a tomar decisiones y acompañarnos cuando no todo sale como queremos. Gracias por ser colmena y la compañera de estudio que hizo posible que retome la carrera y que pueda disfrutar cada materia rendida.

Peqi, siempre atenta, preguntando, apoyando y acompañando cada paso que dí, gracias por cada comida compartida entre estudios, por ser la mejor copiloto y por tener la sinceridad necesaria en momentos clave.

Eli, gracias por ser motivación, guía y siempre hacer que confíe en mí, gracias por estar pendiente para ayudar y también para dejarse ayudar, gracias por las charlas, consejos y risas.

Gracias al circo, que me hizo conocer personas que con el tiempo se volvieron amigos y super importantes en este camino, Jorge, Jose, Lali, Juli, Poli, Cande, Coti, siempre predispuestos para ser espacio de despeje, relajo y consejos, gracias por esos tiempos de calidad. A la familia del club slackline San Juan, gracias por ser espacio clave de entrenamiento que no solo me deja el equilibrio en la cinta sino en la vida, gracias por llevarme a la montaña y hacer que mis problemas se vean pequeños desde la altura.

También agradezco a las familias de Peqi y Leandro, que siempre me recibieron, haciendo que me sienta parte de la casa y compartiendo muchas cosas aparte de las horas de estudio.

Martín, amigo desde la infancia hasta hoy. Gracias por tanto compartir, por ser familia por tantos años y por esos encuentros cada tanto que traen charlas, anécdotas y proyectos futuros.

Gracias a esas dos prácticas de laboratorio del secundario que fueron suficiente para despertar mi vocación y un mundo nuevo por descubrir.

Gracias a la música, al sol, la luna, vientos, ríos, mares, montañas, árboles, cada atardecer y ruta transitada, por ser lugar de conexión y de escape, donde puedo ser más yo y llegar a pensamientos más claros.

Gracias a la universidad pública, que me dio la posibilidad de elegir mi profesión y poder formarme, me dio el sentido de pertenencia y me abrió un montón de puertas, me dio la chance de equivocarme, parar y continuar y me dio personas que hoy son eje fundamental en mi vida profesional y personal.

Por último, gracias a mi, por no rendirme y saber seguir el corazón, con la convicción de estar en el camino correcto.

*No somos más
Que una gota de luz
Una estrella fugaz
Una chispa tan solo en la edad del cielo
No somos lo que quisiéramos ser
Solo un breve latir
En un silencio antiguo con la edad del cielo
Calma, todo está en calma
Deja que el beso dure
Deja que el tiempo cure
Deja que el alma
Tenga la misma edad que la edad del cielo
No somos más
Que un puñado de mar
Una broma de Dios
Un capricho del sol del jardín del cielo
No damos pie entre tanto tic tac
Entre tanto big bang
Solo un grano de sal en el mar del cielo
Calma, todo está en calma
Deja que el beso dure
Deja que el tiempo cure
Deja que el alma
Tenga la misma edad que la edad del cielo
La misma edad que la edad del cielo...*

Jorge Drexler, 1999. *La edad del cielo*.

Índice

Resumen	6
1. Introducción	7
1.1 Historia y desarrollo de la industria vitivinícola Argentina	7
1.2 Vitivinicultura en San Juan	10
1.3 Calingasta - Paraje Hilario	11
1.4 La uva	13
1.5 Las levaduras	14
1.6 Microbiología enológica	16
1.7 Fermentación alcohólica	19
1.7.1 Fermentación espontánea vs fermentación inducida	20
1.8 Vino	22
1.8.1 Vino espumoso - vino base	23
1.9 Justificación	26
1.10 Hipótesis	28
1.11 Objetivos	28
1.11.1 Objetivo general	28
1.11.2 Objetivos específicos	28
2 Metodología	29
2.1 Sitio de estudio	29
2.2 Microorganismos	30
2.3 Identificación a nivel molecular de las levaduras autóctonas.	31
2.3.1 Extracción de ADN	31
2.3.2 Identificación molecular a nivel especie	31
2.3.3 Identificación molecular a nivel cepa de <i>S. cerevisiae</i>	32
2.3.4 Identificación molecular a nivel cepa de levaduras no convencionales	33
2.4 Caracterización fisiológica de interés enológico de levaduras autóctonas.	34
2.4.1 Rasgos fisiológicos no deseados en enología:	34
2.4.1.1 Producción de H ₂ S.	34

2.4.1.2 Producción de ácidos volátiles.	34
2.4.1.3 Precusores de aminas biógenas.	34
2.4.2 Características fisiológicas deseadas en el ámbito enológico.	35
2.4.2.1 Actividad ureasa.	35
2.4.2.2 Tolerancia al SO ₂ .	35
2.4.2.3 Tolerancia a baja temperatura y pH.	36
2.4.2.4 Tolerancia al etanol.	36
2.4.2.5 Determinación de la resistencia al molibdato.	36
2.4.2.6 Capacidad de floculación	37
2.4.2.7 Posesión del factor <i>killer</i> .	37
2.4.2.8 Evaluación del poder fermentativo y la cinética de fermentación.	37
2.5 Análisis estadístico de los datos	38
3 Resultados y discusión	39
3.1 Identificación a nivel molecular de levaduras autóctonas de la zona de Hilario-Calingasta:	40
3.2 Detección de rasgos negativos en las levaduras aisladas del Paraje Hilario.	43
3.3 Caracterización fenotípica de las levaduras autóctonas de acuerdo con propiedades de interés enológico.	49
4 Conclusiones	61
5 Referencias bibliográficas	62
6 Anexos	73

Resumen

La vitivinicultura es una industria que evoluciona constantemente y es impulsada por la demanda de vinos con mayor calidad y tipicidad. Las levaduras desempeñan un papel clave en la fermentación alcohólica y en la definición del perfil sensorial del vino. El estudio de levaduras autóctonas permite aprovechar su adaptación a las condiciones agroecológicas locales y a las variedades de uva, favoreciendo la elaboración de productos diferenciados.

El objetivo de este trabajo fue seleccionar levaduras autóctonas, tanto de *Saccharomyces* como no convencionales, aisladas del Paraje Hilario (Calingasta), con aptitud para conducir fermentaciones de vinos base para espumantes. Se analizaron 77 aislamientos de *Saccharomyces cerevisiae* y 117 de especies no convencionales, pertenecientes al cepario del Instituto de Biotecnología (FI-UNSJ). Los aislamientos fueron caracterizados molecular y fisiológicamente, evaluando rasgos negativos (producción de H₂S, acidez volátil y precursores de aminas biógenas) y positivos (actividad ureasa, tolerancia a SO₂, pH ácido, baja temperatura, etanol, resistencia a molibdato y factor *killer*).

S. cerevisiae se asoció a la producción de H₂S y a la tolerancia al etanol; *Metschnikowia pulcherrima* con acidez volátil y *Hanseniaspora uvarum* con actividad ureasa y tolerancia a condiciones ácidas y de baja temperatura. Se seleccionaron seis cepas de *H. uvarum* (14, 32, 34, 106, 135, 136) y tres de *S. cerevisiae* (138, 172, 175) como potenciales cultivos iniciadores. La evaluación en microvinificaciones evidenció diferencias en el desempeño fermentativo entre cepas de *S. cerevisiae*, destacándose las cepas 138 y 172 por alcanzar mayores grados alcohólicos y mejores parámetros enológicos, mientras que la cepa 175 presentó menor eficiencia y mayor acidez volátil. La caracterización de levaduras autóctonas para ser empleadas como *starter* constituye una alternativa sustentable a las fermentaciones espontáneas no controladas, al uso exclusivo de levaduras comerciales, y confirma la importancia de la selección a nivel de cepa y no sólo de especie.

1. Introducción

1.1 Historia y desarrollo de la industria vitivinícola Argentina

El cultivo de vid y la historia de la vitivinicultura en Argentina se remonta a la época de la colonización, ya que se relacionaba con prácticas agrícolas españolas. Se estima que la implantación de los primeros viñedos fue en Mendoza y San Juan y se realizó entre los años 1569 y 1589 (Pandolfi *et al.*, 2004). Actualmente, la industria del vino en Argentina, está representada principalmente por estas dos provincias debido a sus particulares condiciones tanto edáficas como climáticas. Es por esto que desde hace seis décadas poseen la mayor superficie cultivada con vid del país, Mendoza con el 71,4% y San Juan con el 19,8%. El resto de los cultivos y producción se distribuye entre La Rioja, Salta, Catamarca, Neuquén, Río Negro, entre otras (Figura N°1) (Pandolfi *et al.*, 2004; INV, 2024; Gutiérrez-Gamboa *et al.*, 2025).

La implantación de los cultivos funcionó como puntapié inicial fundamental de una gran industria que transformó esta región, conocida en aquel entonces por su aridez, montañas abruptas y soledad inhóspita, con condiciones climáticas y de suelo particulares, óptimas para estas plantas. La vitivinicultura, en sus comienzos, se fue extendiendo principalmente entre las provincias andinas, ya que, estas zonas serían convenientes para garantizar la energía solar necesaria para una maduración óptima de la uva (Pandolfi *et al.*, 2004; Gutiérrez-Gamboa *et al.*, 2025).

Al comienzo la producción de vinos fue de volúmenes reducidos, basándose en las necesidades de las pequeñas comunidades de la población. Con una elaboración rudimentaria y doméstica, un procedimiento generalizado entre los viñateros, quienes llegaron a obtener productos de buena calidad. El crecimiento económico de la región se dio gracias al ferrocarril que vinculaba Mendoza y San Juan con Buenos Aires. En 1884 dichas provincias asumen el papel de proveedoras de productos frutihortícolas y, especialmente de vino para abastecer al mercado nacional y, a través del puerto de Buenos Aires, al internacional (Pandolfi *et al.*, 2004).

La gran corriente de inmigración europea del siglo XX trajo personas conocedoras del quehacer vitivinícola, esto posibilitó un cambio sustancial en el cultivo de la vid, impulsando la industria. Estos inmigrantes trajeron consigo nuevas técnicas de cultivo, otras variedades de vid aptas para la elaboración de vinos de calidad y la

innovación de las prácticas enológicas utilizadas en las bodegas (Pandolfi *et al.*, 2004).

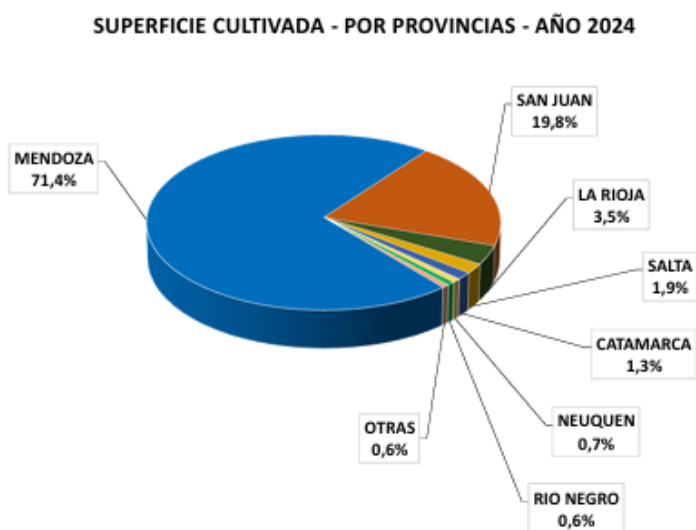


Figura N°1: Porcentaje de superficie cultivada con vid por provincias (INV, 2024).

Desde los orígenes de esta industria su desarrollo depende tanto de la iniciativa empresarial individual como de las acciones de organizaciones de la sociedad civil y del Estado. La capacitación y perfeccionamiento de los técnicos que llevaban a cabo la actividad fue un hecho que aportó al crecimiento vitivinícola y, con la creación de la Bodega de la Escuela de Enología de la Quinta Agronómica en Mendoza, que comienza a funcionar a principios de 1900, pasó de ser un impulso de la voluntad y la experiencia, a un movimiento basado en la ciencia y el estudio (Pandolfi *et al.*, 2004; Hernández, 2021).

En Argentina el destino de la uva es principalmente la vinificación, registrando menor volumen en la producción de pasas y consumo en fresco. Según datos del INV del año 2024, 18.798.000 qq se destinaron a bodegas y/o fábricas de mosto y 391.740 qq a secaderos de pasas y establecimientos productores de uva en fresco. En los últimos años, se incrementó la importancia de la logística y comercialización, a través de grandes cadenas de supermercados, especialmente en el segmento de vinos comunes para el mercado interno. Esto sumó un actor clave a la cadena productiva para el cual los productos vitivinícolas son tan solo uno de los tantos que se comercializan. Mendoza es la principal provincia que aporta al mercado interno del país, siguiéndole San Juan, La Rioja y Salta. Estas cuatro provincias concentran el 99% del total de los despachos de vino al mercado interno (Figura N°2) (Hernández, 2021; INV, 2024).

MERCADO INTERNO DE VINO 2024 - POR PROVINCIA

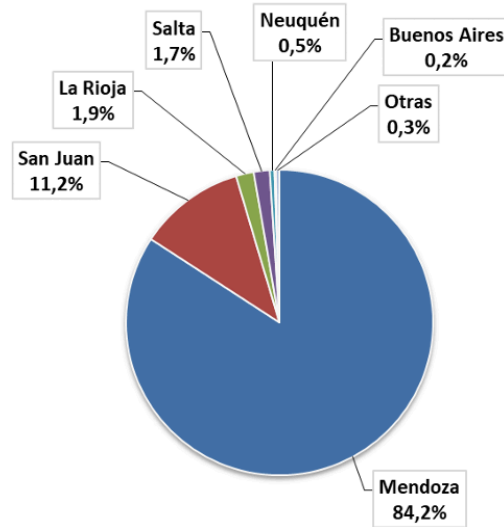


Figura N°2: Principales destinos de mercado interno (INV, 2024).

Económicamente, la vitivinicultura argentina se extiende a lo largo de 199.946 ha cultivadas con vid, distribuidas en 22.039 viñedos. Esto posiciona al país como el 7° del mundo con la mayor superficie cultivada con vid. La actividad vitivinícola se encuentra en 18 provincias argentinas, con 856 bodegas elaboradoras activas al cierre del año 2024. En la vitivinicultura mundial, Argentina es el 9° mayor consumidor, el 8° productor de vinos del mundo y el 11° mayor exportador mundial de vinos en volumen. Los principales países destino de las exportaciones pueden apreciarse en la Figura N°3 (INV, 2024; COVIAR, 2025).

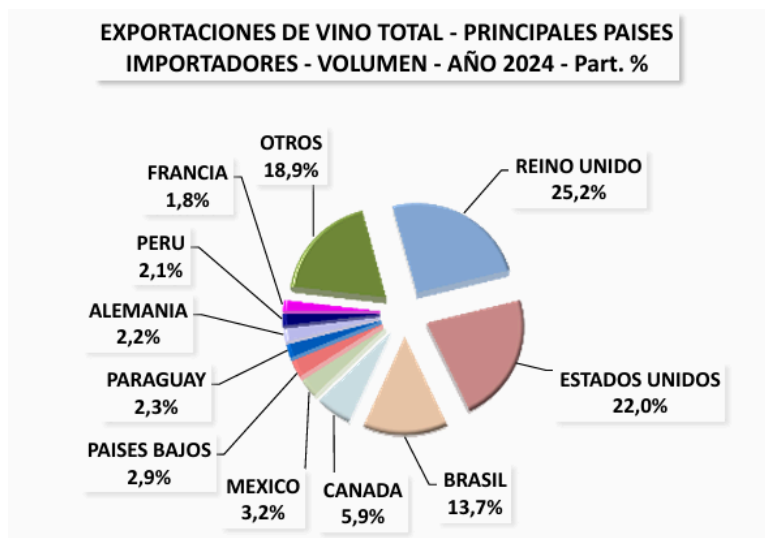


Figura N°3: Principales países destino de mercado externo (INV 2024).

1.2 Vitivinicultura en San Juan

Como se mencionó previamente, la región de Cuyo se relaciona con los viñedos, el vino y las bodegas. Se podría decir que el vino es parte de la idiosincrasia y el folclore de la región, destacando entre las distintas industrias agropecuarias y siendo un eje estructurador de la economía y la vida provincial (Ferrari, 2014).

San Juan cuenta con 43.595 ha cultivadas distribuidas en 4.583 viñedos. El 71% de la superficie corresponde a variedades aptas para elaboración de vino y/o mosto y el restante 29% son variedades con otra aptitud, consumo en fresco y/o pasas. En 2024 se cosechó el 23,1% de la cosecha total del país. Se trata de la provincia argentina con mayor diversidad de variedades implantadas y comercialización de productos vitivinícolas. En San Juan hay 158 bodegas inscriptas, 7 fábricas de mosto y 7 fábricas de vinos espumosos. En el año 2022 se elaboraron en 103 establecimientos (INV, 2022; COVIAR, 2025).

Con una serie de valles donde se ubican sus 25 Indicaciones Geográficas, San Juan empieza a destacar gracias a su diversidad, combinada con su historia (Wines of Argentina, 2024). Una indicación geográfica (IG) es una denominación utilizada para identificar productos originarios de una región o zona determinada, cuyos atributos, calidad o reputación se relacionan directamente con su lugar de origen. Para constituir una IG, se debe identificar un producto como originario de un lugar determinado. Además, es preciso que las cualidades, características o reputación del producto se deban esencialmente al lugar de origen. Puesto que las cualidades dependen del lugar geográfico de producción, existe un claro vínculo entre el producto y su lugar original de producción (Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (OMPI), 2023).

1.3 Calingasta - Paraje Hilario

El valle de Calingasta cuenta con 100 km de extensión, está ubicado entre la Cordillera de los Andes y la precordillera y se caracteriza por sus viñedos de uvas criollas. Las condiciones climáticas del lugar se destacan de otros valles por su peculiaridad tal como se detalla en la Figura N°4 (Wines of Argentina, 2024).

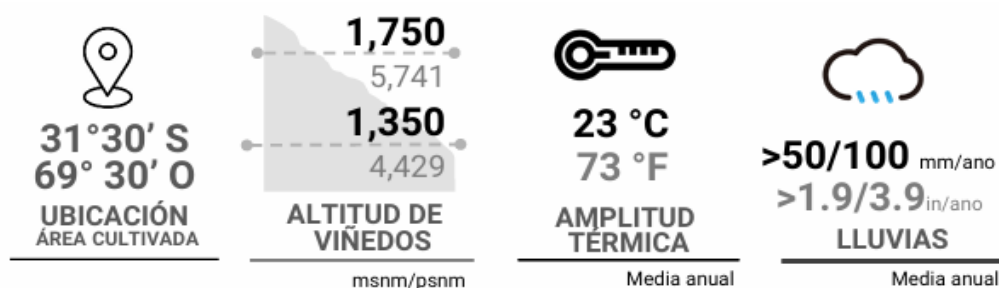


Figura N°4: Condiciones características del valle de Calingasta (Wines of Argentina, 2024).

Dentro del departamento se encuentra el Paraje Hilario, cuya climatología sigue la tendencia general de Calingasta. Se caracteriza por un clima árido, con bajas precipitaciones y un amplio rango térmico, que presenta variaciones tanto estacionales como diarias. Los suelos están fuertemente influenciados por la formación de la precordillera y el aporte de material del Río de Los Patos, se encuentran suelos formados a partir de sedimentos aluviales, fluviales y de depósitos lacustres (INTA, 2022; Wines of Argentina, 2024).

El Paraje está ubicado en el centro de Calingasta, a la derecha del Río de los Patos, entre la Quebrada de Hilario y la Quebrada del Carrizalito. Se destaca por la conservación de plantaciones que datan de la primera mitad del siglo XX, teniendo la mayor proporción de viñedos patrimoniales del departamento, con variedades criollas conducidas en parrales e irrigadas superficialmente (INTA, 2022).

Actualmente, la vitivinicultura sanjuanina atraviesa un proceso de modernización incorporando tecnologías de vinificación y prácticas de manejo sustentable orientadas a la mejora de la eficiencia productiva y la calidad enológica. Entre las estrategias implementadas se incluyen mejoras en los sistemas de riego, optimización del uso del agua e introducción de nuevas variedades adaptadas a las exigencias del mercado. Estas transformaciones reflejan la creciente importancia de la sostenibilidad y la innovación tecnológica dentro del sector vitivinícola regional (Wines of Argentina, 2024).

En febrero del 2024, se emite la resolución 37/2023 que oficializa la Indicación geográfica para los vinos del Paraje Hilario, situado en el valle de Calingasta (Enolife, 2024).

Gracias a la investigación de recursos genéticos vitivinícolas, se reportaron variedades autóctonas de vid tales como la Uva de pascual, Coco de Gallo, Moscatel

tinta y Criolla blanca chica, entre otras (Tornello *et al.*, 2022). A su vez el trabajo realizado sobre estas uvas generó un conocimiento a escala nacional e internacional de los vinos provenientes de variedades patrimoniales del Valle de Calingasta, ya que su tratamiento es diferente al resto (INTA, 2022).

Los cambios en los hábitos de consumo y creciente interés por productos con mayor identidad territorial, tanto a nivel nacional como internacional, han conducido a una valorización de vinos elaborados a partir de cepas patrimoniales. Desde el año 2009 se observa un proceso sostenido de revalorización de uvas y productos originarios del Paraje Hilario (INTA, 2022).

La viticultura es una actividad compleja, en la que interactúan de manera estrecha los aspectos naturales y culturales. Por un lado, está la vid con sus características genéticas y fisiológicas particulares, y por otro, el trabajo de las personas a lo largo de todo el proceso productivo (Lacoste *et al.*, 2010).

En el contexto de los países vitivinícolas en desarrollo, muchos buscaron posicionarse mediante la identificación de cepas propias y representativas. En este sentido, Argentina consolidó al Torrontés como su variedad emblemática para vinos blancos, siendo la única variedad criolla de alto valor enológico. Su origen se atribuye al cruce genético entre la uva negra y la Moscatel de Alejandría (también conocida como uva de Italia), variedades introducidas durante el período colonial. Este proceso, favorecido por la diversidad de materiales genéticos presentes en el territorio, permitió ampliar las posibilidades para la elaboración de distintos tipos de mostos, vinos y aguardientes (Lacoste *et al.*, 2010). Por esto, la identificación y caracterización de microorganismos autóctonos asociados a los viñedos argentinos adquiere especial relevancia para la valorización de la identidad regional y la expresión del *terroir*.

El terruño, o "*terroir*" es un concepto complejo que abarca el área delimitada de un viñedo y su interacción entre factores de suelo, climatología, relieve, geología, viticultura y actividad humana, los cuales le dan originalidad a la producción de la vid y, en consecuencia, características únicas al vino producido (Tinajero Castro *et al.*, 2023). En los últimos años, este concepto se ha ampliado incorporando el denominado "*terroir* microbiano", que considera a las comunidades microbianas autóctonas como componentes relevantes en la definición de la identidad regional del vino. Diversos estudios han demostrado que la composición microbiana de los viñedos presenta patrones biogeográficos asociados a cada región vitivinícola,

pudiendo influir sobre las características fermentativas y sensoriales del producto final (Gilbert *et al.*, 2014; Bokulich *et al.*, 2016).

La vid es una especie de cruzamiento abierto y altamente heterocigota, por lo que la única forma de conservar sus características genéticas y fenotípicas es mediante la propagación clonal de las nuevas cepas. Esto fue lo que sucedió con el Torrontés en sus inicios, un ejemplar con rasgos distintivos fue propagado por décadas mediante estacas hasta lograr un número lo suficientemente alto de individuos que permitiera su reconocimiento y diferenciación respecto de otras variedades. En cuanto a sus características organolépticas, la uva no tiene aroma, a excepción de la variedad Moscatel, en este sentido, el Torrontés presentaba un “aroma exquisito”, por lo tanto, se infería un parentesco con alguna variedad de Moscatel, como, Moscatel de Alejandría (Lacoste *et al.*, 2010).

1.4 La uva

Vitis vinifera, originaria de la región del Mediterráneo y de Asia Central, produce un fruto no climatérico, por lo que debe cosecharse en su punto óptimo de madurez. La baya, un fruto carnoso simple derivado de un ovario formado por la fusión de dos carpelos, desarrolla un pericarpio comestible y se integra en la inflorescencia del raquis, que presenta un eje principal con ramificaciones de distinto tamaño. Cada racimo, compuesto por aproximadamente un 97% de bayas y un 3% de raquis, se une a la vid mediante el pedúnculo, y cada baya al racimo por un pedicelo (Figura N°5 a) (Zoffoli *et al.*, 2011). La estructura del fruto comprende una cutícula externa, piel (exocarpio), pulpa (mesocarpio) y endocarpio que rodea las semillas (Figura N°5 b). En las células epidérmicas se acumulan pigmentos como antocianinas, carotenos y clorofilas, así como compuestos responsables del sabor y aroma característicos (Zoffoli *et al.*, 2011).

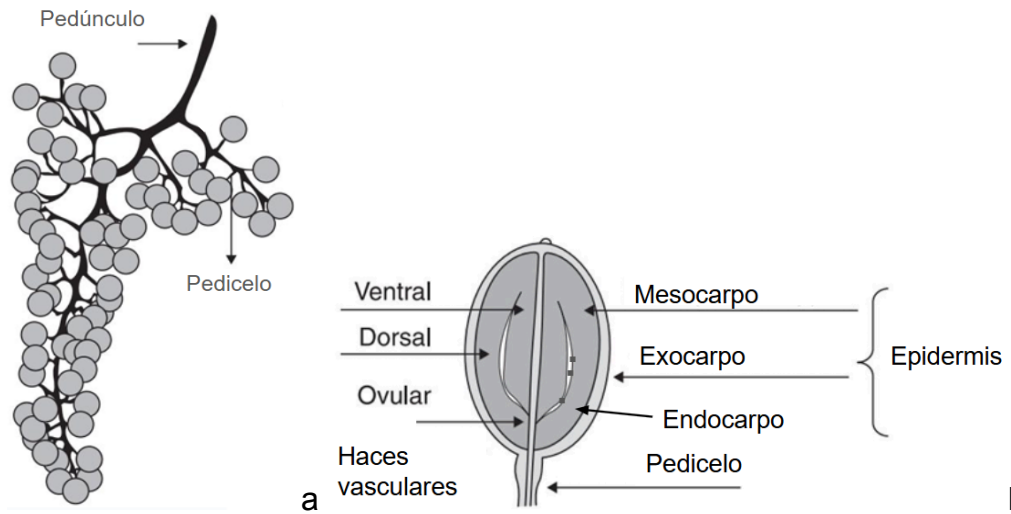


Figura N°5: Partes del racimo de uva (a) y tejidos de un grano de uva (b) (adaptado de Zoffoli *et al.*, 2011).

1.5 Las levaduras

Son organismos unicelulares pertenecientes al reino Fungi, clasificadas dentro de Ascomicetos y Basidiomicetos. Este grupo incluye especies fermentadoras, promotoras y/o patógenas para plantas y animales, así como especies inocuas y de alto valor biotecnológico. Desde la antigüedad, han sido empleadas para elaboración de cervezas, pan y vino, pero los fundamentos científicos de su cultivo y producción para uso en grandes cantidades fueron descubiertos por el microbiólogo francés Louis Pasteur en el siglo XIX (Uribe, 2007; Suárez-Machín *et al.*, 2016).

Son organismos eucariotas que presentan una notable diversidad en tamaño, forma y color de sus colonias, siendo más grandes que las bacterias, alcanzan un diámetro máximo de entre 4 y 5 μm . Su reproducción asexual ocurre por fisión binaria o gemación y el número máximo que una célula se puede dividir se denomina límite de Hayflick, generalmente se trata de 10 a 33 células hijas a partir de una célula madre. Superado este límite, las células dejan de dividirse y entran en fase de senescencia (Russell, 2003).

En términos generales, las levaduras toleran un rango de pH entre 3 y 10, siendo su intervalo óptimo ligeramente ácido, entre 4,5 a 6,5 (Suárez-Machín *et al.*, 2016). Su temperatura de crecimiento varía entre 5 y 37°C, con un óptimo en torno a los 28°C, sin embargo, estas condiciones pueden modificarse en función del ambiente natural en el que se desarrollan (Uribe, 2007). Son microorganismos aerobios facultativos, es decir que utilizan el oxígeno cuando está disponible, metabolizando carbohidratos

para producir biomasa y dióxido de carbono (CO₂) mediante la respiración. En ausencia de oxígeno cambian su metabolismo a fermentativo, generando menor cantidad de biomasa y produciendo alcohol como producto principal. El metabolismo de las levaduras es una característica distintiva que les permite alternar entre respiración y fermentación (Rusell, 2003; Uribe, 2007).

La ploidía constituye una característica relevante en las levaduras, ya que la poliploidía les confiere ventajas adaptativas frente a condiciones ambientales variables debido a la mayor variabilidad genética que presenta. Mientras que la mayoría de las cepas utilizadas en laboratorio son haploides o diploides, las cepas industriales suelen ser diploides o poliploides (Pettrignani, 2022).

En el ambiente las levaduras se encuentran ampliamente distribuidas, participando activamente en la dinámica biológica y química de suelos, plantas, animales y agua donde compiten por nutrientes, actúan como antagonistas y en asociaciones simbióticas. Sus hábitats principales son donde existen fuentes naturales de azúcares como frutas, flores y corteza de los árboles (Uribe, 2007).

Tienen gran relevancia en el sector biotecnológico e industrial, siendo esenciales en la producción de algunos alimentos y bebidas, también pueden estar involucradas en la degradación de algunos alimentos, por procesos de fermentación o contaminación durante la poscosecha de frutas (Suárez-Machín *et al.*, 2016).

El término levadura suele asociarse principalmente a *S. cerevisiae*, especie ampliamente utilizada tanto en panificación como fermentación alcohólica. La obtención de la secuencia completa de su genoma permite la manipulación genética de los casi 6600 genes que lo codifican (Rusell, 2003; Suárez-Machín *et al.*, 2016). Dicho genoma se compone principalmente de guanina y citosina, con pocos elementos repetitivos y pocos intrones, esto lo hace más compacto y manipulable en contraste con otras células eucariotas (Pettrignani, 2022) (Figura N°6).

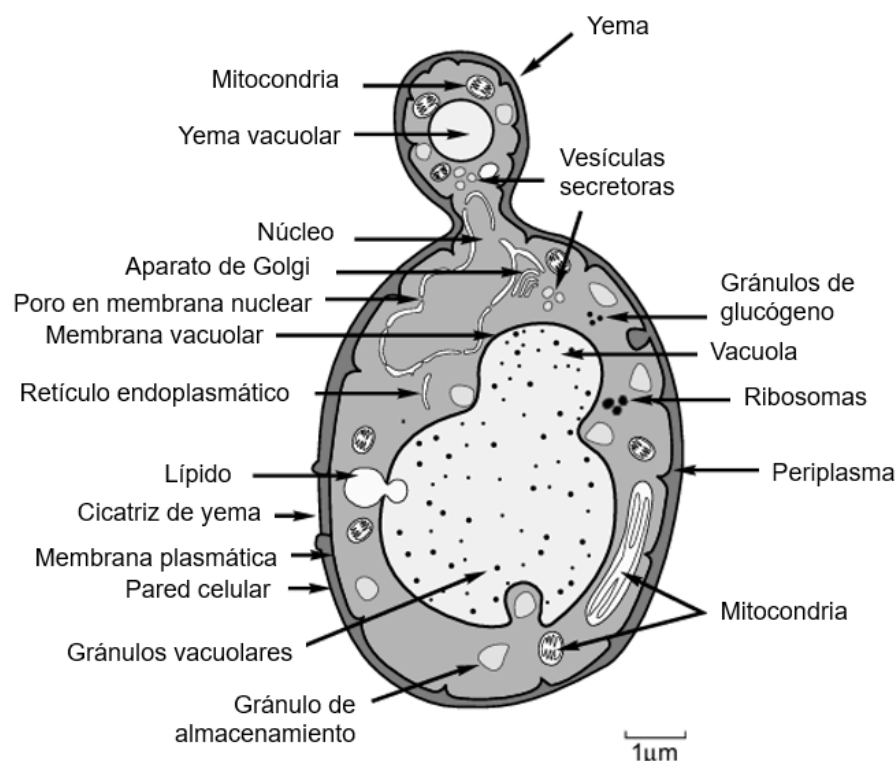


Figura N°6: Levadura en gemación y sus organelas (Adaptada de Rusell, 2003).

1.6 Microbiología enológica

El estudio de la microbiología enológica comenzó con Louis Pasteur, quien demostró que las levaduras tienen la responsabilidad de la fermentación alcohólica del mosto y que ciertas especies son causantes del deterioro de los vinos. Básicamente, el proceso de vinificación de los mostos es un proceso en el cual pueden intervenir diversos microorganismos (levaduras, hongos filamentosos, bacterias lácticas y acéticas) y virus. La capacidad para determinar la presencia de estas especies en uvas, vinos y bodegas es fundamental para poder entender el proceso de elaboración de un vino, mejorar su calidad y prevenir las alteraciones de origen microbiano (Artigas *et al.*, 2017).

Esta rama de la microbiología ha tomado especial relevancia gracias a la información que existe sobre los atributos y beneficios que otorgan las levaduras autóctonas cuando se utilizan adecuadamente. La microbiota de una zona se caracteriza por estar plenamente adaptada a las condiciones agroecológicas, así como a la variedad de uva sobre la cual se encuentra, durante la fermentación las levaduras en crecimiento tienen distintas fases de desarrollo (Figura N°7):

1. Latencia, la tasa de crecimiento tiende a cero ya que la comunidad de levaduras se adapta a las condiciones del medio.
2. Aceleración, comienza la división aumentando la población y finaliza cuando se satura de CO₂.
3. Crecimiento exponencial, la biomasa aumenta considerablemente.
4. Ralentización, debido al agotamiento de los nutrientes del medio o generación de compuestos que en concentraciones elevadas son tóxicas, el crecimiento disminuye.
5. Estacionaria, no hay división por lo tanto no hay crecimiento, tasa de crecimiento se torna nuevamente a cero.
6. Declive, el tamaño poblacional comienza a disminuir y las células por autólisis liberan al medio sus componentes (Escribano Viana, 2021).

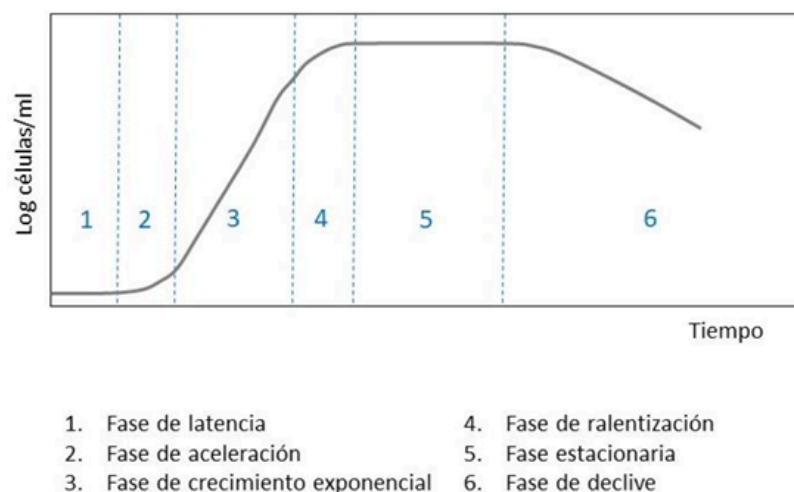


Figura N°7: Fases de desarrollo de las levaduras (Escribano Viana, 2021)

Durante la fermentación alcohólica también tiene lugar una sucesión microbiana entre diferentes especies de levaduras. En la primer etapa fermentativa, las especies predominantes son las conocidas como no convencionales, generalmente con baja tolerancia al etanol y baja capacidad fermentativa, luego van aumentando las más resistentes y finalizando la fermentación dominan las del género *Saccharomyces*, ya que, las características fisiológicas y metabólicas de cada cepa determinan su capacidad de permanencia en el medio (Jolly et al., 2014; Petrignani, 2022).

Según Belda *et al.* (2025) y Benito *et al.* (2025), los géneros de levaduras no convencionales más comunes suelen ser *Metschnikowia*, *Lachancea*, *Starmerella*, *Kazachstania*, *Hanseniaspora*, *Aureobasidium*, *Candida*, *Pichia*, *Meyerozyma*,

Wickerhamomyces, *Torulaspota*. Las especies de levaduras no convencionales desempeñan un papel importante a la hora de la obtención del producto, dependiendo del tipo de vino o de los problemas que se presenten se pueden seleccionar para lograr los distintos objetivos.

Debido a su rápida implantación, *S. cerevisiae* se inoculaba de forma masiva y las levaduras no convencionales solían ser desplazadas, esto influye en la fermentación, ya que no se creía en la funcionalidad de los géneros no convencionales. Actualmente se comercializan cepas de *Saccharomyces* industriales, y a la vez se están realizando estudios para analizar las propiedades de las no convencionales y usarlas en combinación con *Saccharomyces* (Benito *et al.*, 2019; Benito *et al.*, 2025). Las principales especies involucradas en este proceso y su dinámica sucesional se muestran en la Figura N°8.

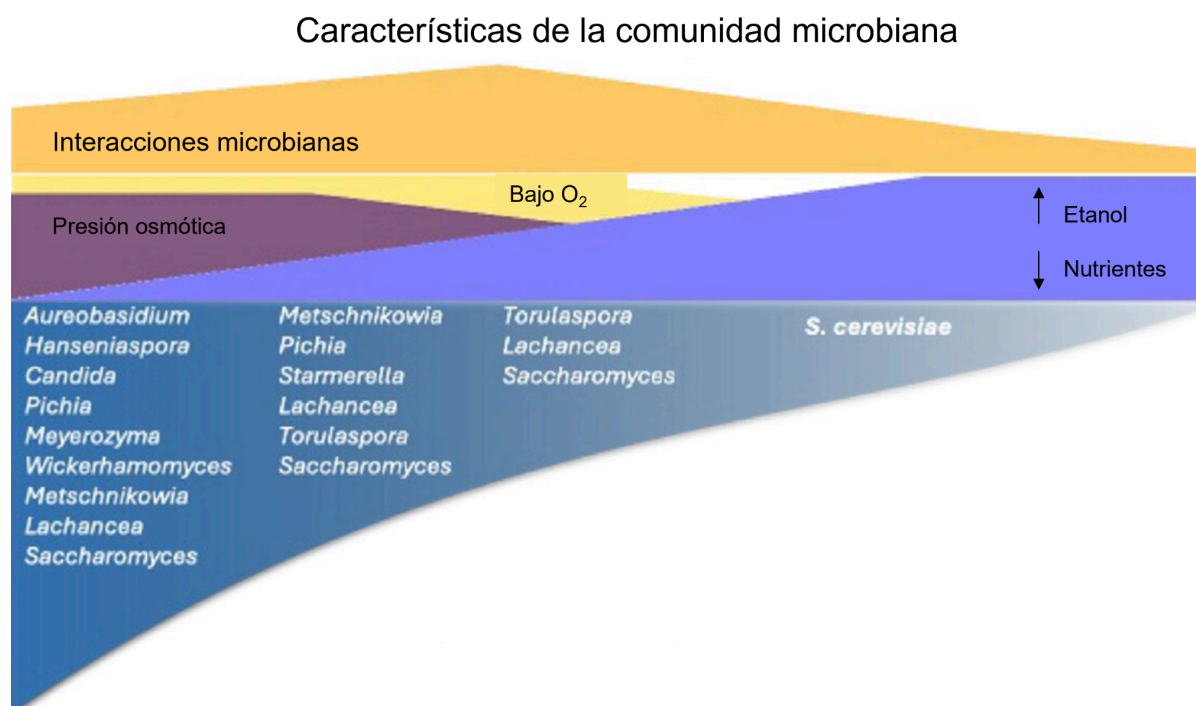


Figura N°8: Sucesión de especies de levaduras en el proceso fermentativo (Adaptada de Belda, 2025).

Las levaduras autóctonas de un lugar puntual representan un componente importante del microbioma de un viñedo. Existen distintos factores que influyen en dicho microbioma y consecuentemente en los vinos obtenidos, ya sea en el perfil químico y sensorial, como en la tipicidad del vino, de una manera única, reproducible

y reconocible. Estos factores pueden ser la ubicación geográfica, el sistema de cultivo, el suelo, el cultivar, la cosecha y el clima (Belda *et al.*, 2017; Pretorius, 2020). La composición de las comunidades microbianas asociadas a las uvas depende de distintos aspectos, como el método de cosecha, la temperatura y el estado sanitario de la uva, la adición de sulfitos y el tiempo transcurrido entre la cosecha y la molienda y el estrujado de la uva. El perfil poblacional de levaduras presente en el mosto de uva también puede verse significativamente influenciado por el método y la intensidad del despallado y estrujado de la uva, la higiene de la bodega, el pretratamiento del mosto y la inoculación con cultivos de levaduras iniciadoras (Jolly *et al.*, 2014; Pretorius, 2020).

En este entorno, la pruina de las bayas de la uva y las superficies de las instalaciones y equipos de la bodega se consideran los principales nichos donde las levaduras relacionadas con el vino conforman comunidades (Jolly *et al.*, 2014).

Resulta indispensable el conocimiento de la microbiota autóctona, ya que tienen efecto directo en la calidad del producto final, juegan un rol central en el proceso fermentativo durante la vinificación, tanto como su diversidad y composición y la dinámica y frecuencia con la que estos aparecen (Artigas *et al.*, 2017).

1.7 Fermentación alcohólica

La fermentación es un proceso natural que ha sido utilizado durante miles de años para crear bebidas alcohólicas y distintos alimentos. Desde el punto de vista metabólico, consiste en la conversión de carbohidratos, como el almidón o azúcares, en alcohol o ácidos por la acción de microorganismos. En particular, las levaduras son las responsables de fermentar los azúcares, en ausencia de oxígeno, para producir etanol y dióxido de carbono, en un proceso conocido como fermentación alcohólica (Artigas *et al.*, 2017; Maicas, 2020).

Esta práctica probablemente surgió de manera accidental durante la transición de comunidades nómadas a sociedades agrícolas. Los granos recolectados se almacenaban y se exponían a condiciones ambientales que favorecen la germinación y fermentación natural. Se estima que las primeras bebidas fermentadas se elaboraban hace aproximadamente 13.000 a 15.000 años en la región de los Natufienses, en la Mesopotamia, mientras que las primeras evidencias de vino datan de entre 7.000 y 6.000 años atrás en zonas de Mesopotamia y Egipto

(McGovern *et al.*, 2004; Hornsey, 2012). La comprensión científica de la fermentación comenzó recién en el siglo XIX, cuando Gay-Lussac formuló la ecuación de la fermentación alcohólica, Pasteur demostró el rol esencial de las levaduras y Buchner evidenció su naturaleza enzimática (Blouin *et al.*, 2006).

La ecuación básica, según Gay-Lussac, se expresa como:

Glucosa ($C_6H_{12}O_6$) + 2 ADP + 2 Pi = 2 Etanol (C_2H_6O) + 2 CO_2 + 2 ATP + 2 H_2O (Blouin *et al.*, 2006).

Debido al metabolismo facultativo de las levaduras, la transformación de los azúcares depende de la concentración de oxígeno disponible en el medio. Cuando las condiciones son ideales y el oxígeno está disponible (aerobiosis), las levaduras se multiplican exponencialmente con un rendimiento en biomasa de 1 g de levadura por cada 4 g de azúcares consumidos. Cuando no hay oxígeno disponible o es muy escaso (anaerobiosis), el rendimiento en biomasa es de tan solo 1 g de levadura por cada 100 g de azúcares consumidos (Ribéreau Gayon *et al.*, 2006; Mestre, 2019).

La fermentación alcohólica tiene muchos cambios bioquímicos debido a la acción de las levaduras y de factores externos, si bien sus productos principales son el etanol y el dióxido de carbono, se producen otros compuestos que influyen en el sabor y color de los productos (Gerard *et al.*, 2023).

1.7.1 Fermentación espontánea vs fermentación inducida

La fermentación espontánea, tal como lo indica su nombre, hace alusión al proceso cuando ocurre de manera natural o espontánea. Es el método más antiguo y tradicional de vinificación, el cual se caracteriza por una mínima intervención tecnológica y por la acción de las levaduras autóctonas que se encuentran presentes en la superficie de la uva y en el entorno de la bodega. En este proceso intervienen comunidades microbianas naturales constituidas tanto por especies de *Saccharomyces* como de levaduras no convencionales. Esta diversidad microbiana puede dar lugar a vinos con mayor complejidad aromática y con una marcada impronta del *terroir*, reflejando las particularidades regionales y varietales del viñedo. Sin embargo, la alta variabilidad de la microbiota autóctona, sumada a la influencia de factores como la composición química de la uva y las condiciones de fermentación, hacen que este método sea poco predecible y difícil de reproducir. En consecuencia, pueden presentarse riesgos tecnológicos, como fermentaciones lentas o detenidas, desarrollo de microorganismos indeseables y desviaciones

sensoriales, que impactan negativamente tanto en el proceso como en la calidad final del vino (Pretorius, 2000; Padilla *et al.*, 2016; Pretorius, 2020; Benito-Castellanos *et al.*, 2025).

El crecimiento de la industria vitivinícola llevó a la necesidad de tener control sobre los procesos; con esto surgió la fermentación inducida mediante la inoculación masiva de cepas seleccionadas de *S. cerevisiae* (cultivos *starter*). De esta práctica se obtienen fermentaciones más rápidas, confiables y homogéneas, lo que garantiza una estabilidad y reproducibilidad de los resultados a escalas industriales. No obstante, diversos estudios destacan que las fermentaciones con cultivos *starter* masivos de *S. cerevisiae*, tienden a reducir la complejidad sensorial y la expresión regional del vino en comparación con las fermentaciones espontáneas, donde la diversidad microbiana cumple un papel determinante en la generación de compuestos aromáticos y en la diferenciación del producto final (Jolly *et al.*, 2014; Padilla *et al.*, 2016). En este contexto, las levaduras no convencionales han pasado a considerarse aliados biotecnológicos de interés, ya que son capaces de modular atributos enológicos y aportar valor agregado en la elaboración de vinos con identidad propia (Benito-Castellanos *et al.*, 2025).

La especie de levadura fermentativa por excelencia es *S. cerevisiae*, capaz de producir una diversidad de compuestos en el vino, lo que demuestra que los microorganismos regionales influyen en el *terroir*. Dicha especie es aceptada como la levadura protagonista del vino, cuya función principal es convertir los azúcares presentes en la uva en vino. Además, se busca que no aporte sabores ni olores desagradables, y cuente con otras propiedades las cuales van a diferir dependiendo del tipo de vino y requisitos de la bodega, aportando a la tipicidad (Pretorius, 2000; Bokulich *et al.*, 2016).

El aislamiento y la selección de levaduras iniciadoras para vinificación se remonta a principios del siglo XX, cuando Müller-Thurgau logró aislar y caracterizar la primera cepa de *S. cerevisiae* utilizada en fermentaciones controladas. A partir de esto, diversos institutos europeos comenzaron a implementar el uso de cultivos iniciadores con el fin de estandarizar la fermentación alcohólica y garantizar la calidad del vino. No obstante, fue durante la segunda mitad del siglo XX cuando esta práctica pasó a usarse a nivel industrial, con la introducción de levaduras secas activas (LSA) y la expansión de una industria dedicada al estudio, producción y comercialización de cepas seleccionadas para uso enológico. En las fermentaciones inducidas, debe

asegurarse que el inóculo incorporado domine sobre las especies autóctonas presentes en el mosto, lo cual se logra aplicando una tasa de inoculación que suele situarse entre 1×10^6 y 3×10^6 ufc/ml (Belda *et al.*, 2014).

Durante el proceso fermentativo los consorcios microbianos están interactuando constantemente, aunque muchos de estos mecanismos aún no se comprenden completamente, es posible ejercer cierto control sobre el proceso. Esto permite diseñar de manera estratégica y creativa las cualidades del vino, mediante la gestión del uso de levaduras adaptadas tanto al ambiente como a las demandas del mercado (Fleet, 2008; Bokulich *et al.*, 2016).

Diversos estudios han reportado el uso de cultivos iniciadores basados en cepas autóctonas provenientes de diferentes regiones del mundo, los cuales mejoran los perfiles sensoriales del vino y contribuyen a conferir un carácter distintivo asociado a su origen geográfico, reflejando así el concepto de *terroir* (Comitini, 2017; Garofalo, 2018; Parapouli *et al.*, 2020) (Figura N°9).

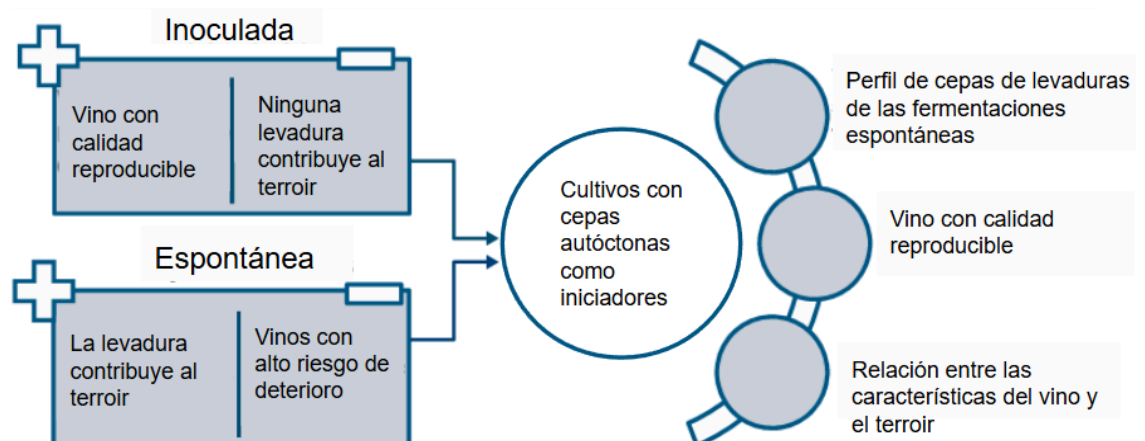


Figura N°9: Ventajas de una simulación de fermentación espontánea mediante inóculos de cepas autóctonas (adaptada de Comitini, 2017).

1.8 Vino

Según la Resolución N.º C.71 del Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV) 24/01/1992 se define como vino al producto obtenido por la fermentación alcohólica total o parcial de los azúcares naturales de la uva fresca o del mosto virgen, previamente limpiado y mantenido en frío. Estas uvas deben provenir de la especie *Vitis vinifera* con o sin partes sólidas, y el producto final que tenga un tenor alcohólico real superior a 5° v/v (INV, 1992).

Existen vinos blancos, rosados y tintos; los blancos provienen de uvas blancas fermentadas sin hollejos, los rosados se obtienen de uvas blancas, tintas o la mezcla de ambas fermentadas con hollejos durante un periodo corto de tiempo, y los vinos tintos se realizan con uvas tintas y su fermentación es con hollejos hasta su finalización (Artigas *et al.*, 2017).

Respecto al contenido de azúcar se pueden clasificar en vinos secos, en los cuales quedan 4 g o menos de azúcar por litro en el producto final, vinos semi secos o abocados, que contienen entre 4 y 25 g de azúcar por litro y dulces con azúcar desde 25 a 80 g por litro (Artigas *et al.*, 2017).

De acuerdo con el contenido alcohólico, se definen vinos livianos los que presentan un volumen entre 7% y 8,5%, los vinos de mesa y vinos varietales entre 8,6% y 14% y vinos licorosos entre 14% y 18% (Artigas *et al.*, 2017).

El anhídrido carbónico puede ser incorporado al vino de manera natural mediante una segunda fermentación, para obtener vinos espumosos. Si el gas carbónico es incorporado de manera exógena se obtiene un vino gasificado o espumante (Artigas *et al.*, 2017).

Para la obtención de vino con perfiles destacables, la calidad de la uva es el elemento clave, su madurez es un factor importante que determina en gran medida la composición de azúcares y compuestos antioxidantes. Estas propiedades impactan directamente en las características sensoriales de los vinos y, por lo tanto, en su valoración y calidad. Por eso, es importante llevar el control de la madurez del fruto y estudiar y seleccionar el momento óptimo para la vendimia de las uvas (Tinajero Castro *et al.*, 2023).

1.8.1 Vino espumoso - vino base

Un vino espumoso se obtiene de la segunda fermentación de un vino tranquilo o vino base. Dependiendo de la tecnología utilizada se clasifican en espumosos fermentados en botella y fermentados en grandes cubas o granvas. Las diferencias más relevantes entre los productos obtenidos se dan por la variedad de uva, las zonas de producción y el tiempo de maduración del vino con levaduras (Pozo Bayón *et al.*, 2009).

El vino base se elabora generalmente a partir de varietales blancos, teniendo en cuenta factores como la madurez de la uva (17-20 brix), la acidez (pH 2.92-3.5) y las fuentes de nitrógeno fácilmente asimilables (140 mg/L FAN) (Velázquez *et al.*, 2019).

Se inicia con la vendimia de la uva y el prensado para la extracción del mosto, seguido de la adición de SO₂ y la clarificación. Posteriormente, para llevar a cabo la fermentación, el mosto se inocula con levaduras (comerciales o seleccionadas) o se permite el desarrollo de las levaduras presentes de forma natural. El proceso se realiza a temperatura controlada (15–18 °C). Una vez finalizada la fermentación, se procede a la estabilización tartárica y, finalmente, a la filtración (Pozo Bayón *et al.*, 2009) (Figura N°10).

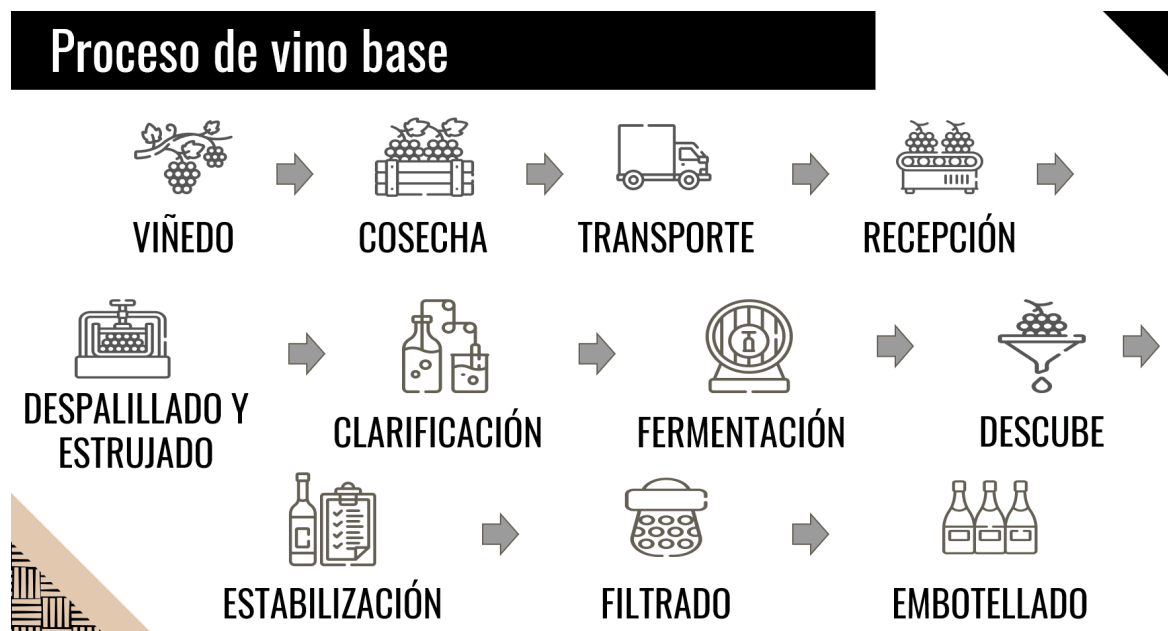


Figura N°10: Pasos del proceso de obtención de un vino base.

Una vez obtenido el vino base, se procede a realizar la segunda fermentación, la cual comprende la adición del inóculo de levadura, sacarosa y clarificantes al vino base. Posteriormente, el producto se puede someter a dos procesos distintos:

- Método *champenoise*, proceso de crianza en botella, seguido del removido, mediante el cual el sedimento de levadura se traslada al cuello de la botella. A continuación, se efectúa la extracción de la levadura de la botella (degüelle), la adición de licor de dosificación, encorchado y envasado del vino espumoso (Pozo Bayón *et al.*, 2009) (Figura N°11).
- Método *charmat*, proceso realizado en granvas o cubas de acero inoxidable y resistentes a la presión, el licor de tiraje se añade al tanque con el vino base y la mezcla se agita. La temperatura baja durante la segunda fermentación

resulta en un producto final más afrutado y con burbujas finas, esta etapa suele durar de 20 a 30 días. Luego, el vino espumoso está listo para la filtración y los procedimientos finales (Simonaggio *et al.*, 2014) (Figura N°11).



Figura N°11: Pasos del proceso de obtención de un vino espumoso.

1.9 Justificación

La vitivinicultura está en continuo cambio adaptándose a las demandas del mercado. La microbiología enológica ha tomado protagonismo gracias a la información existente sobre levaduras autóctonas y los beneficios que se alcanzan cuando son empleadas adecuadamente. La microbiota de una zona se caracteriza por su adaptación a las condiciones agroecológicas, así como a la variedad de uva sobre la cual se encuentra. Conducir fermentaciones espontáneas resulta riesgoso debido a la variabilidad microbiológica influenciada principalmente por factores externos. Existe la posibilidad de seleccionar levaduras de una zona vitivinícola y utilizarlas como cultivo iniciador (*starter*), simulando, en cierta manera, una fermentación espontánea, pero conociendo la/las cepas autóctonas que están actuando y de esta manera lograr el control del proceso.

Bajo este contexto, durante la vendimia 2021 - 2022, el equipo de microbiología de bebidas fermentadas "IBT fermenta" del Instituto de Biotecnología - UNSJ en conjunto con el grupo de trabajo de la agencia de extensión rural de Calingasta AER- INTA, comenzaron con la exploración microbiológica del Paraje Hilario. El mismo cuenta con 50 ha cultivadas con vid y representa el Paraje donde se resguarda el patrimonio vitivinícola del Valle de Calingasta con viñas de variedades autóctonas (criollos) implantados desde 1930. Particularmente, el varietal Torrontés Sanjuanino con 1309,4 ha cultivadas en San Juan, es uno de los variedades que predominan en dicho Paraje (INTA, 2017; Wines of Argentina, 2024).

Hilario se caracteriza por una vitivinicultura con baja intervención de prácticas agrícolas tradicionales, lo que convierte a esta zona en un punto de elevada riqueza microbiológica. En la mayoría de los cultivos no se realiza más de una curación y en muchos casos se trabaja en forma orgánica y natural. También, una particularidad a rescatar de la zona en estudio es que la mayoría de los elaboradores de vino optan por llevar a cabo sus fermentaciones de manera espontánea. Actualmente, en la zona se elaboran vinos tintos y blancos, sin embargo, no se producen vinos espumosos. Destacando el poder enológico que tiene el varietal Torrontés Sanjuanino, es posible conducir fermentaciones para la producción de vinos con segunda fermentación. De esta manera se lograría diversificar y agregar valor a la producción vitivinícola de la zona.

La selección de cepas autóctonas se lleva a cabo analizando un gran número de cultivos puros aislados directamente de las uvas, viñedos y de los mostos de la región vitivinícola correspondiente. Posterior al aislamiento, es necesario un proceso de caracterización enológica que asegure el buen comportamiento de cara a su uso, aquellas que presenten las mejores características enológicas, serán seleccionadas (Artigas *et al.*, 2017; Petrucci, 2022).

Los rasgos que generalmente se analizan y caracterizan en los aislamientos a seleccionar se pueden observar en la Tabla N°1:

Tabla N°1:

Características a tener en cuenta para la selección de levaduras (Mestre, 2019; Escribano Viana, 2021).

Rasgos deseables		Rasgos indeseables	
Elevada tolerancia de etanol.	Síntesis de compuestos aromáticos positivos.	Producción de SO ₂ .	Producción de polifenol oxidasa.
Total consumo de azúcares fermentables.	Síntesis de enzimas de interés enológico.	Producción de H ₂ S.	Requerimiento excesivo de nitrógeno.
Resistencia al SO ₂ .	Formación de ácido láctico.	Producción de etil fenoles.	Formación de biofilms.
Capacidad de fermentar a bajas temperaturas.	Formación de acetato de isoamilo.	Producción de carbamatos.	Formación de espuma/velo.
Poder de floculación al final del proceso.	Degradación de ácido málico.	Formación de turbidez.	Producción de ácidos volátiles.
Fenotipo <i>killer</i> .	Inicio rápido de fermentación.	Producción de aminas biógenas.	

1.10 Hipótesis

La caracterización genotípica y fenotípica del cepario de levaduras autóctonas del Paraje Hilario - Calingasta permite seleccionar cepas óptimas para la elaboración de vinos base para espumosos.

1.11 Objetivos

1.11.1 Objetivo general

Seleccionar levaduras autóctonas *Saccharomyces* y no convencionales aisladas del Paraje Hilario (Calingasta) aptas para conducir fermentaciones de vino base para espumantes.

1.11.2 Objetivos específicos

1. Identificar a nivel molecular levaduras autóctonas de la zona del Paraje Hilario, Calingasta.
2. Detectar rasgos negativos que las levaduras puedan aportar al proceso de fermentación.
3. Caracterizar fenotípicamente a las levaduras autóctonas de acuerdo con propiedades de interés enológico.

2 Metodología

2.1 Sitio de estudio

De acuerdo con los últimos datos registrados en 2022, el Valle de Calingasta cuenta con 171 ha cultivadas con vid. Con respecto a la actividad productiva, principalmente se trata de cultivos de vid, se asocia con producción hortícola, frutícola, apícola y producción de rumiantes menores que se integran a las labores de la vid para mantener baja la cobertura vegetal de los parrales (INTA, 2017; INTA, 2022; Tornello *et al.*, 2022).

El Paraje Hilario está ubicado a 31° 48` 56" S y 69° 40` 47" O, con un promedio de altitud de 1550 msnm (Figura N°12). Es irrigado por el río Los Patos y está al costado de la ruta nacional 149. Este Paraje posee gran proporción de viñedos patrimoniales y se calcula que las plantaciones datan de la primera mitad del siglo XX. Algunas condiciones son típicas de Calingasta, como su altura que se encuentra entre 1550 y 1700 msnm, las bajas precipitaciones, entre 50 y 100 mm anuales y el clima favorable, ya que se dan 350 días soleados al año y 23° de amplitud térmica (INTA, 2017; INTA, 2022).

Cabe destacar que el Paraje Hilario - Calingasta fue denominado por el INV como Indicación Geográfica de Argentina en el año 2023, mediante la resolución 37/2023 (INV, 2024), otorgándole un valor adicional a sus productos.

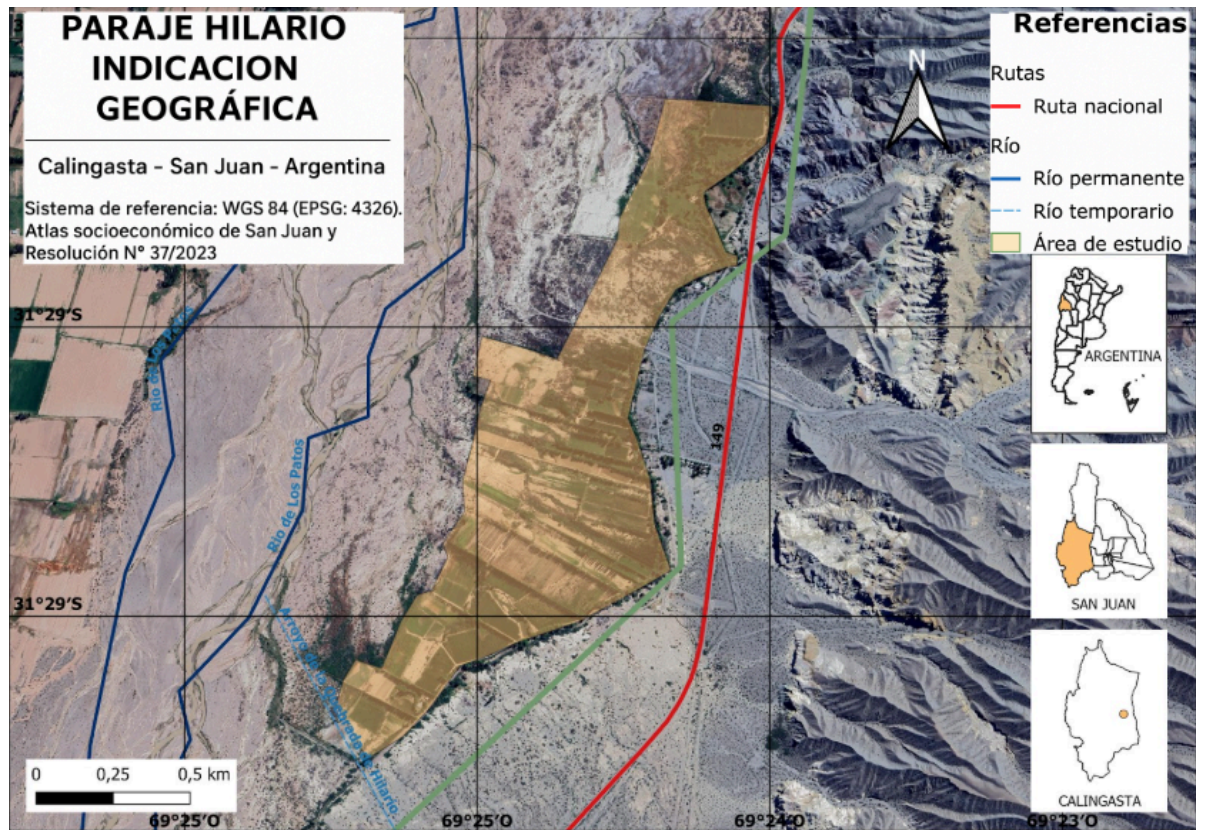


Figura N°12: Sitio de estudio puntos de muestreo Paraje Hilario- Calingasta- San Juan

2.2 Microorganismos

Las levaduras del presente estudio fueron aisladas del Paraje Hilario (Calingasta) y forman parte del cepario del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de San Juan. La colección consta de 77 aislamientos de levaduras de la especie *S cerevisiae* y 117 aislamientos del grupo de no convencionales. Todas las muestras se encuentran conservadas en ultrafreezer a -80°C . Previo a cada ensayo las levaduras se repicaron en medio diferencial Wallerstein Differential Agar (WLN) para comprobar su pureza y luego se repicaron en medio Yeast Extract Peptone Dextrose (YEPD) caldo (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% dextrosa, pH 4,6) a 25°C , 110 revoluciones por minuto (rpm), para el crecimiento de biomasa a utilizar en los ensayos.

2.3 Identificación a nivel molecular de las levaduras autóctonas.

2.3.1 Extracción de ADN

Previo a la caracterización molecular, se realizó la extracción de ADN siguiendo la metodología de Hoffman y Winston (1987) modificada. Para ello, las levaduras se cultivaron en medio YEPD caldo para obtener biomasa y posteriormente se sometieron a lisis mecánica y química mediante perlas de vidrio y una mezcla de fenol/cloroformo/isoamílico. Los ácidos nucleicos se recuperaron mediante precipitación alcohólica, tratamiento con RNAsa y sucesivos lavados con etanol. Finalmente, el ADN se resuspendió en solución TE y se conservó a -20 ± 1 °C hasta su utilización (Petrignani, 2022).

La integridad del ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,7 % en buffer TBE 0,5X durante 60 min a 90 V, utilizando como marcador de peso molecular I EcoRI/Hind III (Fermentas Inc., Hanover, USA). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador UV (Chimeno, 2015; Petrignani, 2022).

2.3.2 Identificación molecular a nivel especie

La identificación a nivel de especie de cada aislamiento se realizó mediante secuenciación del fragmento amplificado del dominio D1/D2 del gen ribosomal 26S (Valente *et al.*, 1999) modificado por nuestro grupo de trabajo (Maturano *et al.*, 2015). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo empleando los cebadores universales **NL1** (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') y **NL4** (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'), utilizados para la amplificación de esta región. La mezcla de reacción (50 µL) contenía: 34,55 µL de agua miliQ, 5 µL de buffer 1X, 2,5 µL MgCl₂ 1,5 mM, 4 µL dNTPs 0,2 mM, 1 µL de cada cebador a 0,4 µM, 0,25 µL de Taq ADN polimerasa (1U) y aproximadamente 50 ng de ADN molde.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

1. Desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min.
2. 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 min.
3. Alineamiento a 55,5 °C durante 2 min.

4. Extensión a 72 °C durante 2 min.
5. Extensión final de 10 min a 72 °C.

Los productos amplificados se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,4 %, teñido con bromuro de etidio y visualizados bajo luz UV. Las bandas correspondientes a ~600 pb fueron posteriormente purificadas y enviadas para su secuenciación por método de Sanger a INTA Castelar, Buenos Aires. El marcador utilizado fue de 100 pb (K 0177) Inbio Highway, Tandil, Argentina.

Las secuencias obtenidas se compararon con las depositadas en la base de datos GenBank (NCBI) mediante el algoritmo BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*), considerando como criterio de identificación una similitud ≥ 99 % con secuencias de referencia.

2.3.3 Identificación molecular a nivel cepa de *S. cerevisiae*

Con el fin de diferenciar a nivel cepa a los aislamientos identificados como *S. cerevisiae*, y, a su vez, para comparar con los patrones de las levaduras comerciales más popularmente usadas, se llevó a cabo la diferenciación molecular intraespecífica mediante la metodología de PCR Interdelta (Legras & Karst, 2003).

Cada reacción de amplificación PCR tuvo como volumen final 30 μ L con los siguientes componentes: 3 μ L de buffer 10x con $MgCl_2$, 6 μ L de dNTP's 2 mM, 2 μ L del primer $\delta 12$ (5'-TCAACAATGGAATCCCAAC-3') 15 μ M, 2 μ L del primer $\delta 21$ (5'-CATCTTAACACCGTATATGA-3') 15 μ M, 0,6 μ L de Taq Polimerasa 5U/ μ L, 5 μ L de ADN (250 ng) y 11,4 μ L de agua miliQ para completar el volumen final. Para llevar a cabo el proceso se utilizó el termociclador Eppendorf AG 22331, donde se programaron los siguientes pasos:

1. Desnaturalización inicial: 95°C durante 4 min;
2. Desnaturalización: 95°C durante 0,3 min;
3. Hibridación: 46°C durante 0,3 min;
4. Extensión: 72°C durante 1,3 min;
5. Repetición de los pasos 2, 3 y 4: 35 ciclos;
6. Extensión final: 72°C durante 10 min.

Los productos de la reacción fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa 1,2% en TBE 0,5 X con Bromuro de etidio durante 60 min a 90 V. Las

imágenes fueron captadas al exponer los geles a transiluminador de UV en fotodocumentador con cámara CCD acoplada y analizadas con el software Gel Doc XR (*Bio Rad Laboratories Limited*, Hemel Hempstead, UK) (Chimeno, 2015; Petriagnani, 2022).

2.3.4 Identificación molecular a nivel cepa de levaduras no convencionales

La identificación a nivel cepa de las especies de levaduras no convencionales, se realizó mediante la técnica de Análisis de PCR de ARNt con repetición en tándem (Barquet *et al.*, 2011).

Los cebadores utilizados para el análisis fueron: ARNt Sc (5'-GCTTCTATGGCCAAGTTG-3'), ISSR-MB (5'-CTCACAACAACAACA-3') y 5CAG (5'-CAGCAGCAGCAGCAG-3'). Las amplificaciones por PCR se realizaron en un termociclador Thermo PXE 0.2, combinando el cebador ARNt Sc con el cebador ISSR-MB o 5CAG. Las mezclas de reacción de PCR consistieron en 5 µL de ADN genómico (10-20 ng), 1 µL de cada cebador 1 µM, 3 µL de dNTP 0,2 mM, 3 µL de MgCl₂ 2,5 mM, 5 µL de Taq buffer 10 X, 0,3 µL de ADN polimerasa Taq y 31,7 µL de agua miliQ en un volumen final de reacción de 50 µL.

La amplificación se realizó de la siguiente manera:

1. 5 min a 95 °C.
2. 35 ciclos de 60 seg a 95 °C.
3. 60 seg a 50 °C.
4. 90 seg a 72 °C.
5. Extensión final de 10 min a 72 °C.

Los productos de PCR se separaron a 50 V en geles de agarosa al 1,8 - 2 %. (Barquet *et al.*, 2011).

2.4 Caracterización fisiológica de interés enológico de levaduras autóctonas.

2.4.1 Rasgos fisiológicos no deseados en enología:

2.4.1.1 Producción de H₂S.

El ácido sulfhídrico es un compuesto considerado indeseable en fermentaciones alcohólicas por su característico olor a huevo podrido. Con el fin de determinar las cepas productoras de este compuesto, se sembró a partir de un cultivo puro de cada cepa en medio comercial BigGy agar (Difco). Las placas se incubaron 48-72 h a 28 ± 1 °C y posteriormente se analizó la coloración alcanzada por las colonias de cada cepa. Este medio de cultivo posee Citrato amónico de Bismuto, el cual en presencia de H₂S va oscureciendo las colonias. Esto permite estimar el potencial de cada cepa para producir H₂S por acción de la enzima sulfito reductasa en un medio con deficiencias de nitrógeno (Massera *et al.*, 2012). La producción cualitativa de H₂S se determinó mediante la comparación de la coloración de la colonia con la escala propuesta por Mendez - Ferreira *et al.*, 2012.

2.4.1.2 Producción de ácidos volátiles.

El ácido acético se considera compuesto indeseable por otorgar sabor y olor avinagrados al vino. Su producción por parte de las levaduras en estudio se determinó mediante la técnica propuesta por Sidari *et al.* (2017). Una pequeña alícuota de levadura previamente activada se siembra sobre el medio Chalk agar (g/L: extracto de levadura 3, glucosa 10, carbonato de calcio 3, agar 15). Las placas se incubaron a 25 ± 1 °C por 7 días. La presencia de un halo translúcido alrededor del crecimiento de levaduras indicó producción de ácido acético. Mediante el índice llamado parámetro Z, que compara el radio de la siembra levuriana con el del halo translúcido se determinaron las cepas productoras. Los valores de Z más próximos a 1 corresponden a cepas con menor producción de ácido acético.

2.4.1.3 Precursores de aminas biógenas.

Los compuestos nitrogenados cadaverina, putrescina, histamina, son considerados indeseables por su potencial efecto cancerígeno. Se evaluó la capacidad de las

levaduras para descarboxilar aminoácidos y producir aminas biógenas siguiendo el protocolo de Zullo y Ciafardini (2019). Alícuotas de levaduras previamente activadas se sembraron sobre (g/L): glucosa 0,1, púrpura de bromocresol 0,06, Yeast Nitrogen Base (YNB) 6,7, agar agar 20 y aminoácido 1 (L-tirosina, L- histidina, L- arginina) y se ajustó el pH a 5,3 con HCl. Las placas se incubaron a 25 ± 1 °C por 4 días. La producción de aminas biógenas se asocia a la formación de halo de color púrpura alrededor del desarrollo levuriano.

2.4.2 Características fisiológicas deseadas en el ámbito enológico.

2.4.2.1 Actividad ureasa.

La urea es un reconocido precursor de etilcarbamatos (compuesto potencialmente cancerígeno) que en ocasiones puede encontrarse en el mosto de uva. Con el objetivo de detectar levaduras con capacidad de hidrolizar urea, se evaluará la actividad ureasa mediante la técnica propuesta por Vergara *et al.* (2023). El medio de cultivo (agar base urea) consistió en (g/L) peptona 10, glucosa 10, cloruro de sodio 5, fosfato monosódico de potasio 2, rojo fenol 0,012, agar 15; el pH final fue de $6,8 \pm 0,2$. El medio de cultivo se distribuyó en tubos de ensayo y fueron esterilizados en autoclave durante 15 min a 121 °C, a cada tubo se le agregó 0,15 mL de solución de urea filtrada al 40 %, y se dejaron solidificar en pico de flauta. Las levaduras previamente activadas se sembraron en forma de estría sobre el medio de cultivo que originalmente es de color amarillo. La presencia de actividad ureasa positiva, se evidenció por un cambio de color del medio a fucsia intenso.

2.4.2.2 Tolerancia al SO₂.

El anhídrido sulfuroso es un compuesto comúnmente empleado en el ámbito enológico porque cumple funciones como antiséptico, antioxidante, disolvente y clarificante, entre otras. Por lo tanto, resulta importante evaluar la tolerancia a las concentraciones generalmente aplicadas en las vinificaciones de las bodegas de la región. Para tal fin se siguieron los protocolos establecidos por Vigentini *et al.* (2017) con modificaciones. Una alícuota de levaduras previamente activadas se inocularon en medio YEPD- agar con dosis de SO₂ de 50, 100 y 200 mg/L incluida en el medio. Las levaduras se sembraron puntualmente sobre los medios con diferentes concentraciones de SO₂ y se incubaron por 3 días a 27 ± 1 °C. Posteriormente, el

desarrollo de las colonias de levaduras se comparó con el control positivo, YEPD-agar sin SO₂.

2.4.2.3 Tolerancia a baja temperatura y pH.

El sustrato que se utilizó en el ensayo fue mosto a 21 °Bx y pH 3 o pH 3.5. Los tubos inoculados con 1×10^6 cel/mL se incubaron en condiciones estáticas a $15 \pm 1^\circ\text{C}$. Cada tubo contenía en su interior una campana Dürham invertida, para evidenciar la acumulación de gases (CO₂) producido durante el proceso fermentativo de las levaduras. Los tubos fueron monitoreados durante los primeros tres días cada 24 h para detectar el entrapamiento de gas en las campanas. Las levaduras que presentaron el llenado completo de la campana de Dürham con CO₂ durante los primeros tres días, se seleccionaron como tolerantes a los factores analizados (Mestre *et al.*, 2017).

2.4.2.4 Tolerancia al etanol.

Las levaduras previamente activadas se contaron en cámara de Neubauer con el fin de inocular 1×10^6 cel/mL. El sustrato para el presente ensayo fue (g/L): glucosa 10, fructosa 20 y extracto de levadura 1. Se esterilizó a 0,5 atm por 10 min y luego se agregó etanol para alcanzar las concentraciones de 6, 9 y 12% v/v para no convencionales y 11 y 13% v/v para *S. cerevisiae*. Los tubos inoculados conteniendo campana Dürham invertida fueron incubados en condiciones estáticas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por tres días. El ensayo fue monitoreado cada 24 h, la acumulación de gases (CO₂) indicó el proceso fermentativo de las levaduras. (Mestre *et al.*, 2017).

2.4.2.5 Determinación de la resistencia al molibdato.

El glutatión es un antioxidante que evita la oxidación y pardeamiento del mosto o vino, también previene la formación de olores desagradables, por este motivo es un rasgo deseable. Como medición indirecta de la producción del antioxidante mencionado, se evaluó el crecimiento de las levaduras en un rango de concentraciones de molibdato según la metodología detallada por Mezzetti *et al.* (2017). La coloración azulada de las colonias indica la resistencia al molibdato.

2.4.2.6 Capacidad de floculación

Se evaluó mediante el protocolo propuesto por Soares *et al.* (2000). Las células previamente activadas en medio YEPD caldo, se recolectaron por centrifugación y se lavaron con agua desionizada. Posteriormente, se resuspendieron en una solución de CaCl₂ a 80 mg/L, ajustada a pH 4. Las suspensiones se agitaron brevemente y se dejaron reposar a temperatura ambiente. La formación de flóculos y la sedimentación celular se evaluaron visualmente durante 30 min, registrando el tiempo de sedimentación a intervalos de 10 min.

2.4.2.7 Posesión del factor *killer*.

El factor *killer* corresponde a una actividad antimicrobiana ejercida por ciertas levaduras frente a otros microorganismos presentes en el medio, resultando especialmente relevante durante las etapas iniciales de la fermentación. Esta interacción involucra la acción de una toxina proteica/glicoproteica producida por determinadas especies de levaduras (fenotipo *killer*), capaz de eliminar a aquellas que poseen receptores específicos (fenotipo *sensible*). El ensayo se realizó según la metodología descrita por Buzzini *et al.* (2004). Las levaduras, previamente activadas, se sembraron de manera puntual sobre placas con medio KM. La presencia de un halo translúcido de inhibición alrededor de la siembra levuriana indicó actividad antimicrobiana sobre la levadura sembrada como *lawn* en el medio de cultivo.

2.4.2.8 Evaluación del poder fermentativo y la cinética de fermentación.

Se realizaron microvinificaciones con las cepas de *S. cerevisiae* que cumplieron con los requisitos analizados previamente. Cada microvinificación se realizó en frascos Erlenmeyer de 2000 mL de capacidad con 1400 mL de mosto de uva a 22 °Bx, 15±1 °C, en condiciones estáticas. El monitoreo de las fermentaciones se realizó mediante la pérdida de peso de los sistemas fermentantes. Durante el proceso, se tomaron muestras periódicas para analizar el consumo de azúcares reductores mediante la técnica colorimétrica de DNS (Miller, 1959) y de fuentes nitrogenadas fácilmente asimilables con el método de Sorensen citado por Ribéreau-Gayon *et al.* (2006). El seguimiento de las poblaciones de levaduras se llevó a cabo mediante siembra en medio diferencial WLN.

2.5 Análisis estadístico de los datos

Cada ensayo se realizó por triplicado de forma independiente y los resultados se expresaron como el valor medio de dichas determinaciones junto con sus respectivas desviaciones estándar. El análisis estadístico de la caracterización de las levaduras se llevó a cabo mediante tablas de contingencia a nivel de especie, aplicadas a los rasgos no deseados (producción de ácido sulfhídrico y acidez volátil) evaluando la asociación entre las variables mediante la prueba de chi-cuadrado de Pearson. En los casos en que fue pertinente, se consideraron las frecuencias relativas para facilitar la interpretación de los resultados. Por otro lado, los rasgos positivos se analizaron mediante un Análisis de Correspondencias Múltiples (ACM) con el fin de describir las asociaciones entre dichos caracteres y las cepas o especies. Estos análisis se realizaron utilizando el software InfoStat® (versión profesional 2020). Asimismo, se aplicó Análisis de Varianza de Medidas Repetidas por Bloques (ANOVA) al conjunto de datos que se obtuvieron durante el desarrollo de las fermentaciones, esto permitió evaluar el efecto del tiempo y de la cepa sobre la variable medida. El análisis se realizó en el entorno estadístico RStudio® (versión 4.5.1).

Si bien algunas etapas experimentales, particularmente la caracterización fisiológica, se llevaron a cabo de manera paralela a la identificación molecular a nivel de cepa en levaduras no convencionales, la presentación de los resultados se organiza de acuerdo con la secuencia lógica de los objetivos planteados. Esta estrategia permite integrar la información taxonómica y funcional de manera coherente, facilitando la interpretación global del comportamiento de las cepas estudiadas.

3 Resultados y discusión

Entre los avances de la industria vitivinícola, el control microbiológico de la fermentación mediante la inoculación del mosto con cultivos iniciadores de levaduras seleccionadas está entre los más relevantes, esto permite obtener procesos seguros, predecibles y de calidad constante. Las levaduras no solo intervienen en la conversión de azúcares en etanol y dióxido de carbono, sino que determinan gran parte del perfil sensorial del vino produciendo compuestos aromáticos y metabolitos secundarios. Por ello, las investigaciones actuales se orientan a comprender el comportamiento fisiológico y metabólico de diferentes especies para seleccionar aquellas que respondan a las necesidades tecnológicas de vinificación y aporten características distintivas (Suarez-Lepe *et al.*, 2012; Bernardi, 2013; Escribano Viana *et al.*, 2021).

En este contexto, la selección de cepas autóctonas, tanto de *Saccharomyces* como de levaduras no convencionales, representa una estrategia sustentable para preservar la tipicidad regional y evitar la homogeneización sensorial asociada al uso global de cultivos comerciales. Estas levaduras, propias del *terroir* del viñedo, pueden potenciar los atributos varietales y conferir mayor singularidad e identidad al producto final (Fleet, 2008; Suarez-Lepe *et al.*, 2012; Pretorius, 2020; Escribano Viana *et al.*, 2021).

El presente trabajo se enmarca en esta línea, se buscó seleccionar levaduras autóctonas del Paraje Hilario, Calingasta con potencial enológico para la elaboración de vinos base para espumosos, con el propósito de aportar al conocimiento microbiológico regional y al desarrollo de biotecnologías enológicas adaptadas al *terroir* local.

Los resultados se presentan siguiendo el orden de los objetivos específicos. En este sentido, se expone en primer lugar la identificación molecular de las levaduras y posteriormente su caracterización fisiológica. Cabe resaltar que algunos ensayos se realizaron de manera paralela durante el desarrollo del trabajo, sin afectar la interpretación conjunta de los resultados.

3.1 Identificación a nivel molecular de levaduras autóctonas de la zona de Hilario- Calingasta:

De acuerdo con los objetivos, se realizaron ensayos para la caracterización de los aislamientos de levaduras provenientes del Paraje Hilario que forman parte del cepario del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de San Juan.

La identificación molecular a nivel especie de los 194 aislamientos permitió caracterizar la diversidad de levaduras presentes en los aislamientos del Paraje Hilario, Calingasta. Los porcentajes más altos se dieron principalmente entre tres especies: *S. cerevisiae*, *H. uvarum* y *M. pulcherrima*. En menor medida *Naganishia albidus*, *Cryptococcus uzbekistanensis*, *Starmerella bacilaris*, *Aureobasidium melanongenium*, *Zygoascus meyeriae*, *Cryptococcus albidus* (Figura N°13).

La especie *H. uvarum* se encuentra con más frecuencia en las primeras etapas de la fermentación a nivel global, mientras que *Metschnikowia* constituye otro de los géneros habitualmente dominantes en la microbiota inicial del viñedo, esto confirma el patrón ampliamente descrito para uvas *Vitis vinifera* en otras regiones vitivinícolas (Godoy, 2013; Drumonde-Neves *et al.*, 2021).

Por su parte, *S. cerevisiae* aparece en menor proporción en la superficie de las bayas, al inicio de fermentación, no está presente, y a medida que avanza aumenta su proporción. Por lo que su detección en fases tempranas sugiere una adaptación local de esta especie, posiblemente asociada al manejo del viñedo o la historia microbiológica de la bodega. Esto coincide con lo reportado en distintos estudios sobre microbiota autóctona de uvas y mostos (Bezerra, 2012; Godoy, 2013; Franco *et al.*, 2019; Drumonde-Neves *et al.*, 2021).

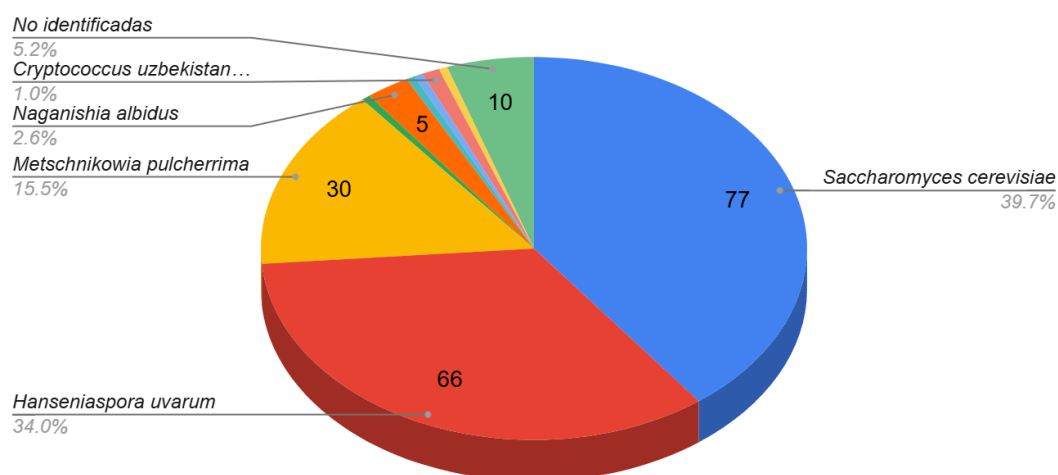


Figura N°13: Biodiversidad de especies presentes en el Paraje Hilario, Calingasta.

De los 77 aislamientos identificados como *S. cerevisiae*, se diferenciaron 31 cepas con perfiles genéticos únicos (Figura N°14), lo que evidencia una alta diversidad intraespecífica en la población estudiada. Este hallazgo coincide con numerosos estudios sobre comunidades de esta especie en vinos y viñedos, que suelen reportar una diversidad alta incluso dentro de un viñedo o fermentación. En un estudio realizado en Galicia (España) y estudios más recientes en el Líbano, utilizando técnicas moleculares, identificaron múltiples genotipos de *S. cerevisiae* en fermentaciones espontáneas, lo que pone de manifiesto una estructura poblacional muy variada (Blanco, P. *et al.*, 2006; Feghali, N. *et al.*, 2019).

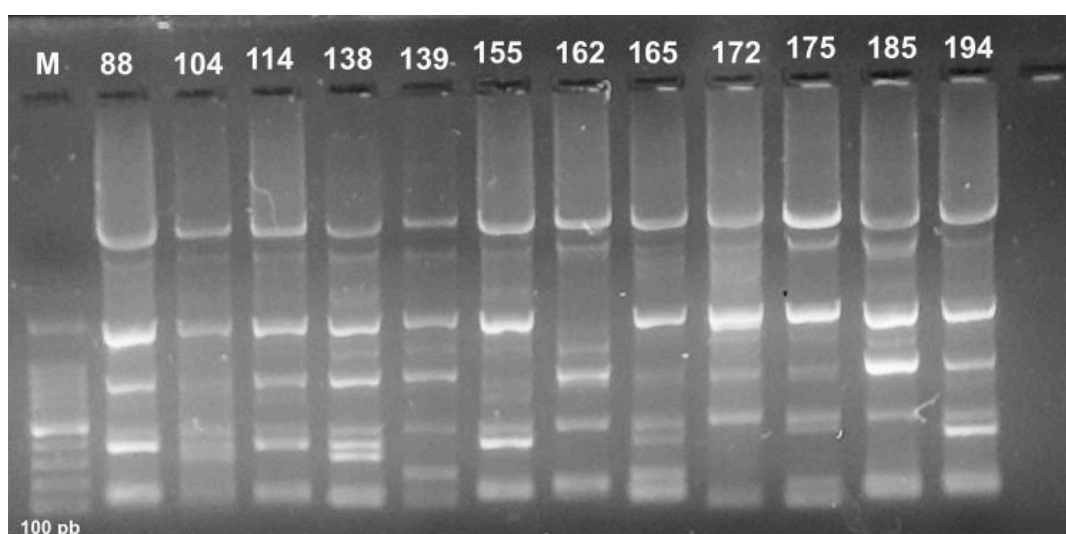


Figura N°14: Perfiles genéticos de aislamientos de levaduras *S. cerevisiae* realizados con la técnica PCR Interdelta (cada número representa distintos aislamientos y M corresponde al marcador).

La identificación a nivel de cepa de los aislamientos de *H. uvarum*, permitió obtener los patrones genéticos observados en la Figura N°15.

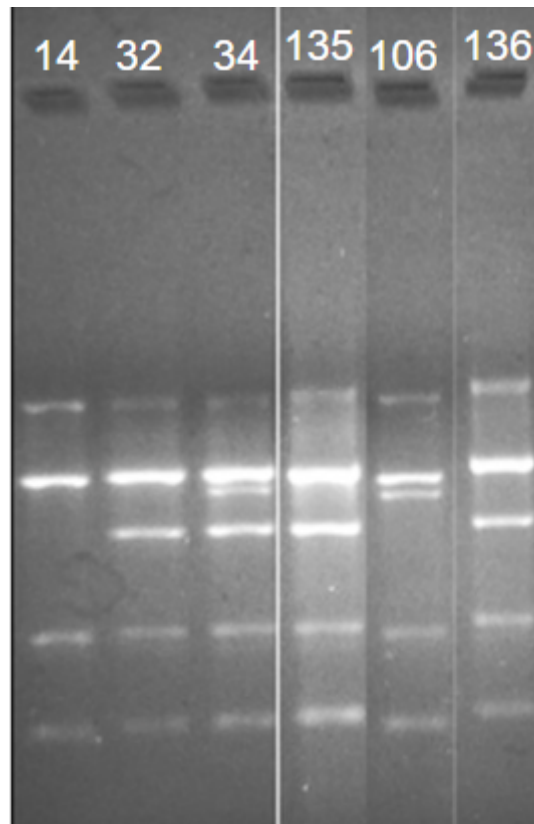


Figura N°15: Perfiles genéticos de aislamientos de levaduras *H. uvarum* realizados con la técnica PCR de ARNt con repetición en tándem (cada número representa distintos aislamientos).

La discriminación a nivel de cepa es esencial para seleccionar microorganismos con potencial enológico específico. Como plantean Drumonde-Neves *et al.* (2021), muchas de las nuevas aplicaciones en vinificación dependen de identificar perfiles metabólicos particulares más que diferencias taxonómicas amplias.

Las levaduras que no pertenecen al género *Saccharomyces* suelen predominar durante las etapas iniciales de la fermentación alcohólica, luego son desplazadas por especies del género *Saccharomyces*, debido a que las primeras presentan menor tolerancia al etanol y limitada capacidad de adaptación a condiciones adversas, como con baja concentración de oxígeno, bajo pH o presencia de SO₂. Por lo tanto, los géneros con baja resistencia al etanol predominan al inicio del proceso, mientras que *S. cerevisiae* se impone en las etapas finales cuando la concentración de etanol alcanza su valor máximo (Di Maro *et al.*, 2007; Manzanares *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2016; Padilla *et al.*, 2016; Röcker *et al.*, 2016; Benito *et al.*, 2019).

Aun así, ciertas cepas de especies como *Hanseniaspora* pueden mantenerse hasta el final de la fermentación, especialmente cuando se trabaja a bajas temperaturas, contribuyendo positivamente a las propiedades y complejidad del vino (Di Maro *et al.*, 2007). En este sentido, estudios recientes han investigado y reevaluado el rol de *H. uvarum*, que tradicionalmente era considerada perjudicial, destacando su potencial enológico (Gobbi *et al.*, 2013; Benito *et al.*, 2025).

3.2 Detección de rasgos negativos en las levaduras aisladas del Paraje Hilario.

El total de cepas y aislamientos productores de H₂S fue de 29,3% de *S. cerevisiae*, 18,4% de *H. uvarum* y 43,3% de *M. pulcherrima*. Se observa en la Figura N°16 las placas de Petri y la coloración de los cultivos con la que se determinó la producción de H₂S.

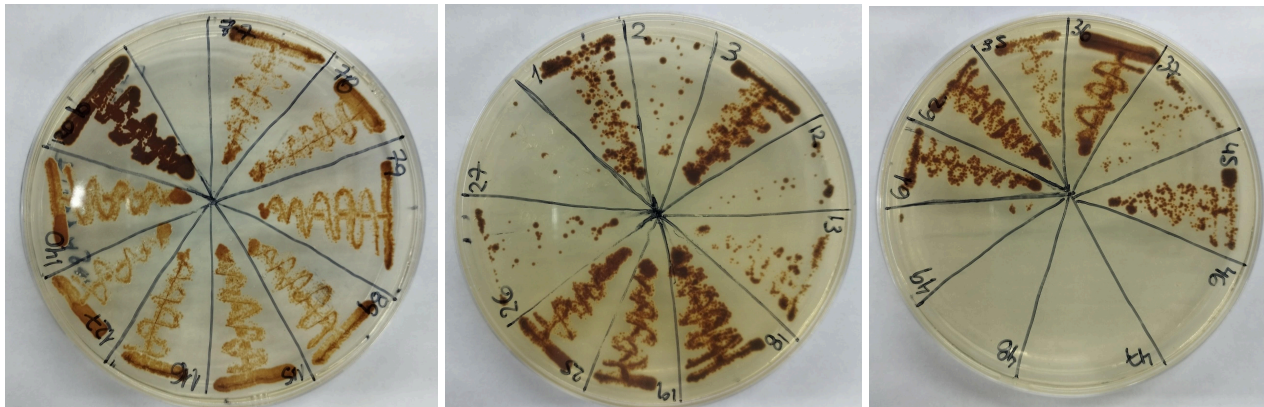


Figura N°16: Producción de H₂S basándose en la coloración de las colonias, las más oscuras son las más productoras.

Con respecto a la producción de ácidos volátiles, *S. cerevisiae* presentó un 9,67% de cepas productoras, *H. uvarum* 7,89% y *M. pulcherrima* 23,33%, las placas de la Figura N°17 muestran el halo translúcido formado por las siembras de levaduras para determinar la producción.



Figura N°17: Producción de ácido acético, el halo transparente alrededor de la colonia indica la producción

La Figura N°18 muestra a la única colonia, perteneciente a la especie *Aureobasidium melanongenium*, que resultó ser productora de aminas biógenas.

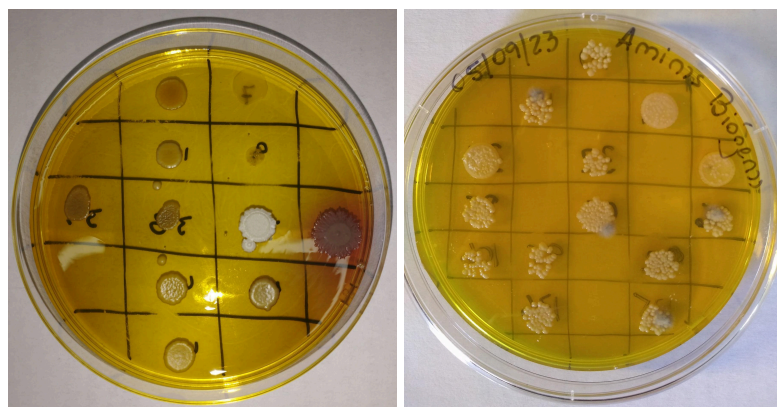


Figura N°18: Placas para observar la producción de aminas biógenas, la coloración violeta indica la producción.

En la matriz binaria generada para los siguientes gráficos (Figura N°19), se asignó “1” a los aislamientos que no presentaron rasgo negativo y “0” a los que sí presentaron, siguiendo criterios similares a los aplicados por Mestre *et al.* (2017) y Tzamourani *et al.* (2023). Por lo tanto, las cepas que más apilen rasgos son las preseleccionadas para los siguientes ensayos.

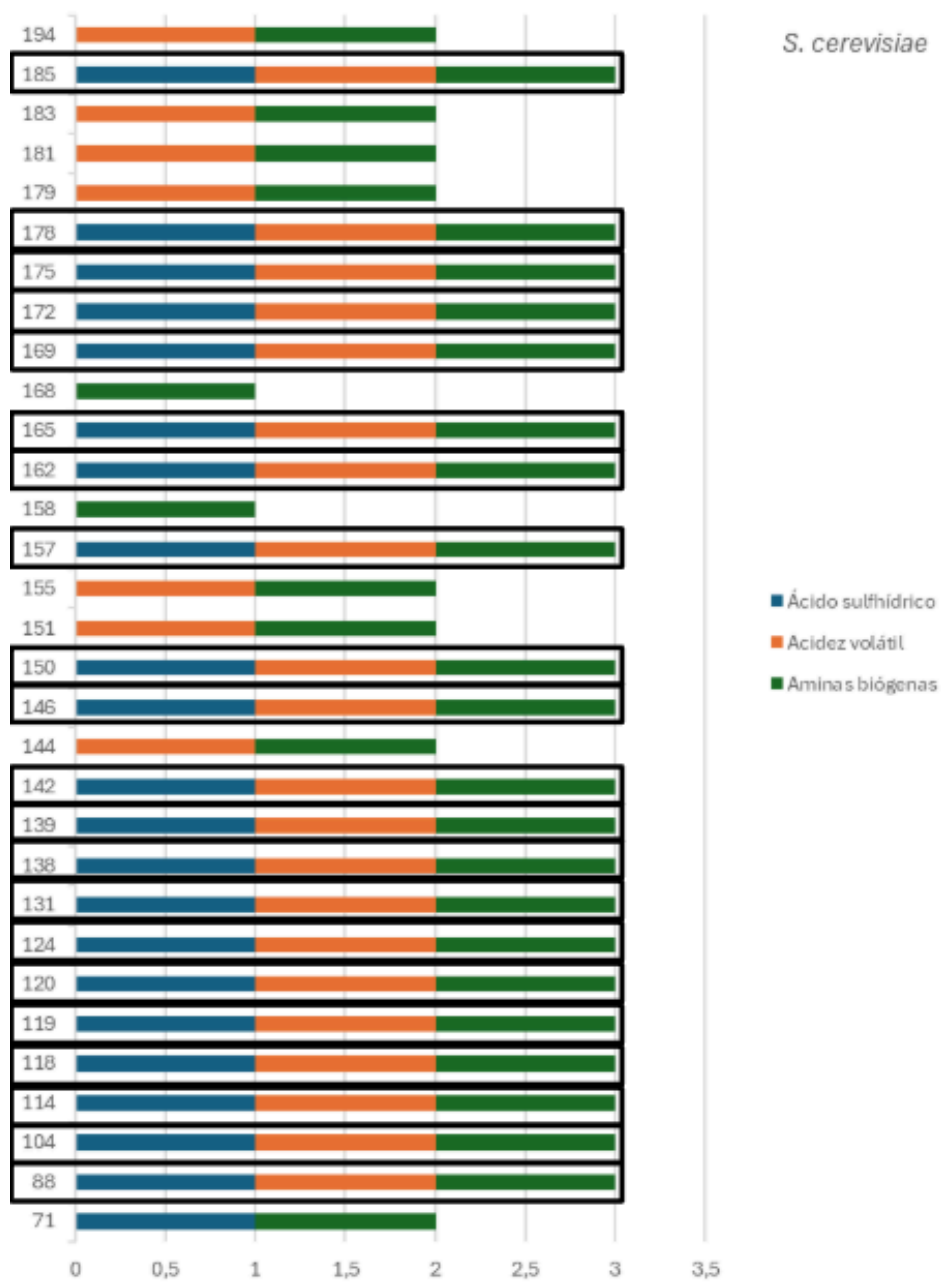


Figura N°19 a: Resultados por cepas de *S. cerevisiae* de rasgos no deseados (recuadro indica que no presenta rasgos).

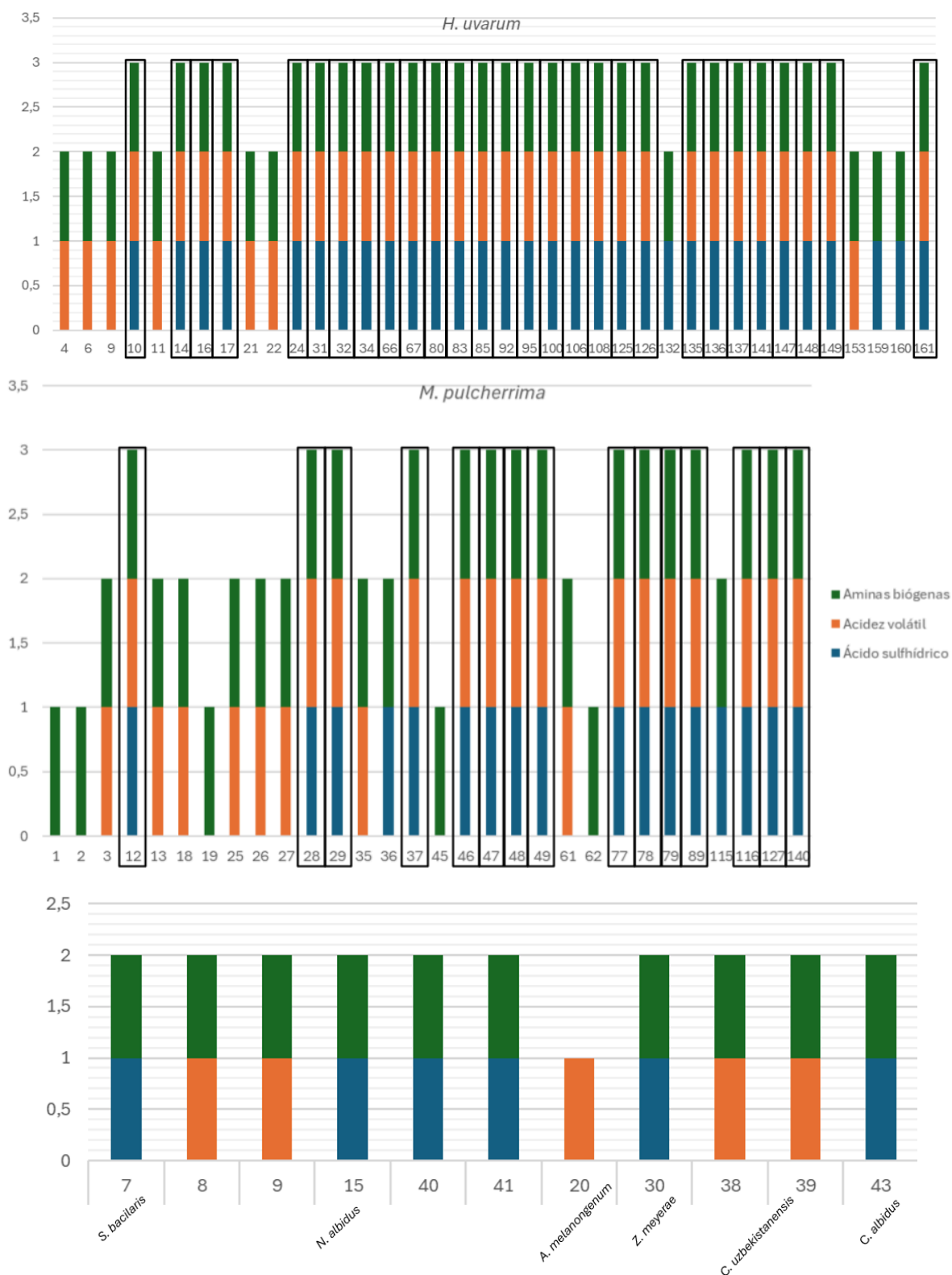


Figura N°19 b: Resultados por cepas y aislamientos de especies no convencionales a: *H. uvarum*, b: *M. pulcherrima*, c: otras especies, de rasgos no deseados (recuadro indica que no presenta rasgos).

Los resultados reflejan una variabilidad intraespecífica que generalmente se reporta para levaduras de un *terroir* específico. Estudios como los de Davies *et al.* (2023) y Drumonde-Neves *et al.* (2021) sostienen que las poblaciones autóctonas pueden incluir perfiles fisiológicos con diferencias aún dentro de una misma especie, lo que explica la coexistencia de cepas aptas e inapropiadas dentro de un mismo grupo taxonómico.

En función de los resultados obtenidos para los rasgos no deseados, se realizó un análisis mediante tablas de contingencia a nivel de especie, con el objetivo de evaluar la posible asociación entre las especies de levaduras y la presencia de producción de ácido sulfhídrico (H₂S) y acidez volátil elevada. Este enfoque permitió cuantificar las frecuencias observadas y contrastarlas estadísticamente, proporcionando una interpretación más directa de la distribución de estos rasgos. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla N°2.

Tabla N°2:

Frecuencias absolutas y relativas de cepas con producción de ácido sulfhídrico (H₂S) y acidez volátil (AV) elevada según especie de levadura.

Especie	H ₂ S (+)	AV (+)	Total cepas	Proporción H ₂ S	Proporción AV
<i>M. pulcherrima</i>	13	7	30	0,43	0,23
<i>S. cerevisiae</i>	9	3	31	0,29	0,10
<i>H. uvarum</i>	7	3	38	0,18	0,08

Los resultados indicaron que la proporción de cepas productoras de H₂S varió entre especies, siendo mayor en *M. pulcherrima* (43%), seguida de *S. cerevisiae* (29%) y *H. uvarum* (18%). Sin embargo, el análisis de chi-cuadrado no evidenció diferencias estadísticamente significativas entre especies ($p > 0,05$), aunque se observó una tendencia a la asociación ($p \approx 0,057$). Este patrón sugiere una mayor frecuencia de producción de H₂S en ciertas especies, particularmente en *M. pulcherrima*, aunque con una variabilidad que impide establecer diferencias concluyentes a nivel estadístico. En este sentido, diversos estudios han señalado que distintas especies presentes en la microbiota vínica, incluidas levaduras no convencionales, pueden contribuir a la generación de compuestos azufrados indeseables durante la

fermentación alcohólica (Tzamourani *et al.*, 2023). La distribución de este rasgo se representa gráficamente en la Figura N°20 (a).

En relación con la acidez volátil, se observó una mayor proporción de cepas con este rasgo en *M. pulcherrima* (23%), en comparación con *S. cerevisiae* (10%) y *H. uvarum* (8%). No obstante, al igual que en el caso del H₂S, el análisis estadístico no detectó diferencias significativas entre especies ($p > 0,05$). A pesar de ello, la tendencia observada refuerza la posible asociación entre ciertas levaduras no convencionales y una mayor producción de compuestos que incrementan la acidez del medio. Estos resultados resultan consistentes con lo reportado en la literatura, donde se describe que algunas especies no convencionales pueden aumentar la producción de ácidos orgánicos bajo determinadas condiciones fermentativas, afectando la calidad del producto final (Zhong *et al.*, 2020). La distribución de este rasgo se muestra en la Figura N°20 (b).

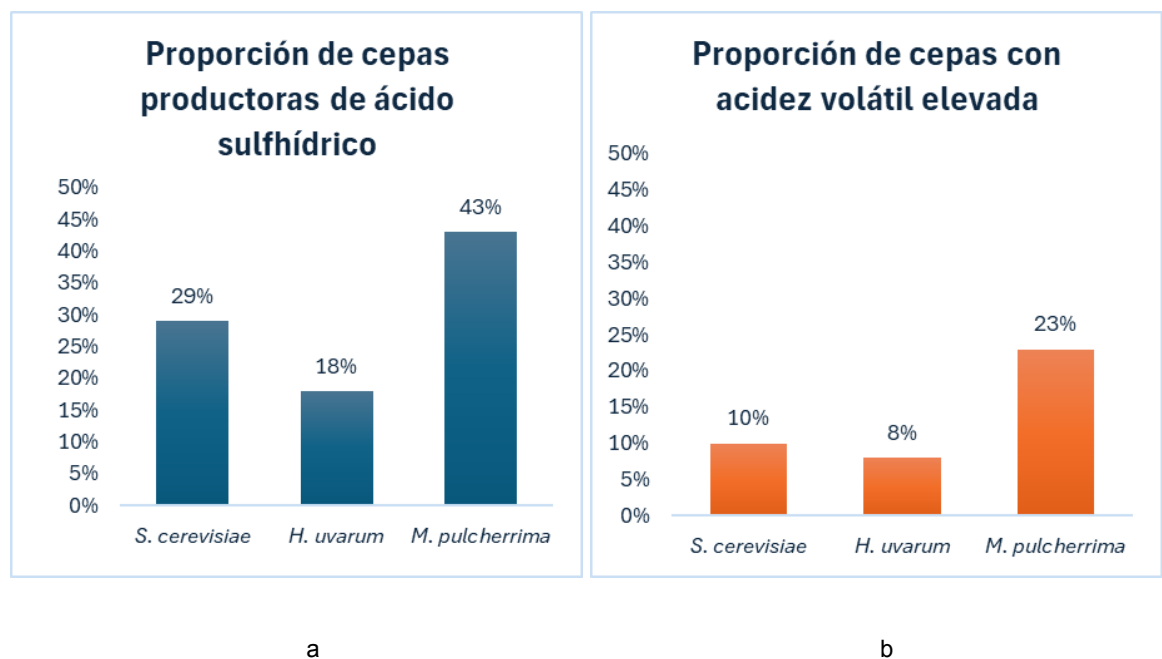


Figura N°20: Proporciones de cepas con características enológicas negativas según especie; a) Producción de H₂S; b) Acidez volátil elevada.

En conjunto, los resultados obtenidos indican que, si bien no se detectaron asociaciones estadísticamente significativas entre las especies y los rasgos negativos evaluados, se evidencian tendencias diferenciales en la distribución de estos caracteres. La ausencia de significancia podría estar relacionada con la

variabilidad intraespecífica y el tamaño muestral, lo que sugiere que estos rasgos no dependen exclusivamente de la especie, sino también de características propias de cada cepa. En este sentido, los resultados refuerzan la importancia de la selección a nivel de cepa en estudios enológicos, ya que dentro de una misma especie pueden coexistir perfiles tecnológicos contrastantes, lo cual resulta clave para la optimización del proceso fermentativo.

De los 31 aislamientos iniciales de *S. cerevisiae* 21 fueron preseleccionados para realizar la caracterización de rasgos positivos, ya que no presentaron producción de los tres rasgos negativos analizados, y del grupo de las no convencionales se preseleccionaron 28 aislamientos de *H. uvarum* y 15 de *M. pulcherrima* por el mismo motivo. Por el contrario, los aislamientos de las demás especies pertenecientes al grupo de no convencionales (*Starmerella bacilaris*, *Naganishia albidus*, *Aureobasidium melanogenum*, *Zygoascus meyeriae*, *Cryptococcus uzbekistanensis*, *Cryptococcus albidus*) fueron descartados ya que presentaron producción de rasgos negativos.

Los resultados detallados alcanzados para cada cepa se encuentran en el apartado de Anexos: *S. cerevisiae* Anexo I, *H. uvarum* Anexo II, *M. pulcherrima* Anexo III, *S. bacilaris*, *N. albidus*, *A. melanogenum*, *Z. meyeriae*, *C. uzbekistanensis* y *C. albidus* Anexo IV.

3.3 Caracterización fenotípica de las levaduras autóctonas de acuerdo con propiedades de interés enológico.

La actividad ureasa fue detectada en el 14,28 % de las cepas de *S. cerevisiae* y en el 21,42 % de *H. uvarum*, mientras que no se observaron aislamientos positivos en *M. pulcherrima*, evidenciando diferencias en el metabolismo del nitrógeno. Este rasgo enológico resulta particularmente relevante debido a su implicancia en la degradación de urea que puede formarse durante la fermentación, mejorando la seguridad del producto final. La urea es el principal precursor de etilcarbamato, compuesto regulado en varios países debido a su reconocida toxicidad y su potencialidad cancerígena. En este contexto, el uso de levaduras con actividad ureasa adquiere especial interés en la elaboración de vinos (Benito *et al.*, 2016;

Vilela, 2020). Los tubos que se observan en la Figura N°21 muestran la coloración del medio de cultivo que indica actividad positiva (fucsia) o negativa (amarillo).

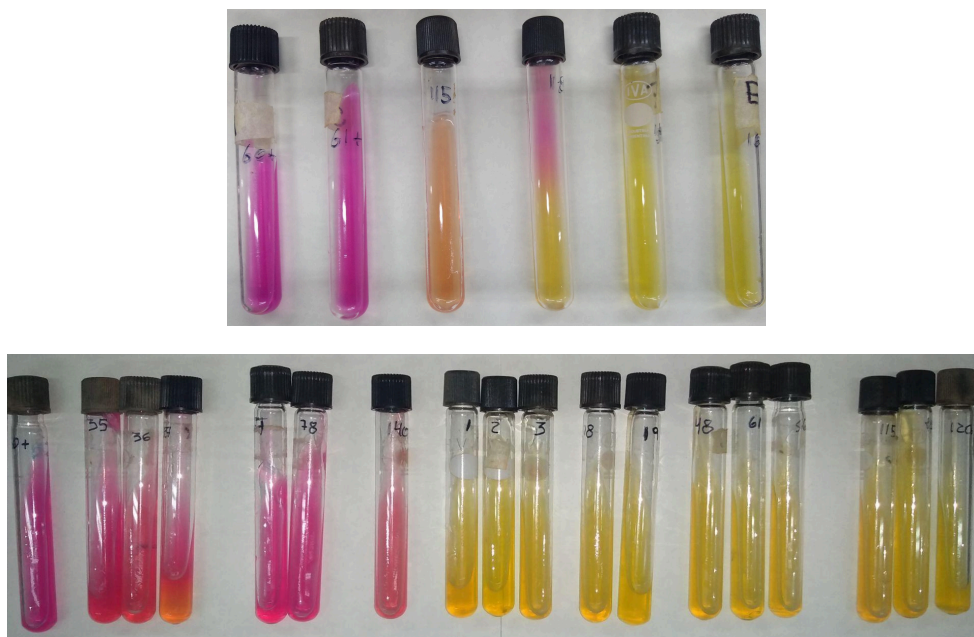


Figura N°21: Detección de actividad ureasa en medio Cristensen. La coloración fucsia indica actividad positiva, amarilla negativa.

Con respecto al ensayo de tolerancia a SO_2 , todos los aislamientos y cepas evaluados demostraron tolerancia a las distintas dosis de dióxido de azufre añadidas en el medio (50, 100 y 200 mg/L) (Figura N°22). Esta resistencia a SO_2 constituye un rasgo tecnológico favorable en levaduras vínicas, ya que este compuesto se utiliza ampliamente como conservante y agente antimicrobiano durante la vinificación para controlar poblaciones indeseables y proteger contra la oxidación. Se ha documentado que la resistencia al SO_2 en levaduras de vino, particularmente en *S. cerevisiae*, está mediada por mecanismos moleculares complejos y respuestas globales al estrés celular inducidas por la exposición al compuesto (Nadai *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017; García-Ríos *et al.*, 2019). Por otro lado, distintas revisiones han enfatizado en que la capacidad de tolerar el SO_2 es uno de los rasgos que han evolucionado en levaduras utilizadas en vinificación debido a la presión selectiva del entorno enológico, aunque también exhibe variación intra e interespecífica (FAO/AGRIS, 2013; Zara *et al.*, 2021). Por lo tanto, los resultados obtenidos no solo confirman la robustez de las cepas estudiadas frente a factores estresantes

presentes en la fermentación, sino que también las levaduras estudiadas poseen perfiles fisiológicos adaptados para comenzar a fermentar en presencia de SO₂.

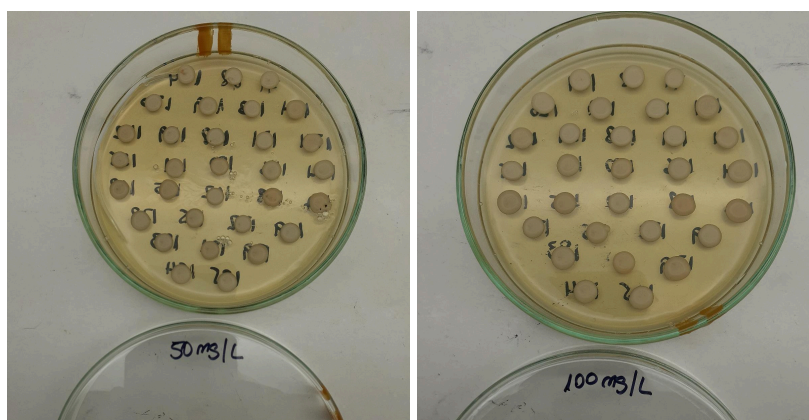


Figura N°22: El desarrollo de colonias indica la tolerancia al SO₂.

Cuando se analizó la tolerancia a bajas temperaturas (15 °C) y pH ácidos (3; 3,5) se evidenció diferencias interespecíficas en la capacidad de crecimiento y actividad fermentativa bajo dichas condiciones. A pH 3, el 21,4 % de las cepas de *H. uvarum* iniciaron la fermentación, mientras que a pH 3,5 se observó tolerancia en el 66,66 % de *S. cerevisiae* y en el 50 % de *H. uvarum*. Ningún aislamiento de *M. pulcherrima* resultó positivo en este ensayo. La acumulación de CO₂ en la campana de Dürham (Figura N°23) constituyó una medida indirecta de tolerancia, ya que la producción de gas indica no solo supervivencia celular, sino mantenimiento de la actividad fermentativa bajo estas condiciones. Desde el punto de vista enológico, la capacidad de fermentar a pH y temperaturas bajas es un rasgo tecnológico deseable, dado que los mostos vínicos presentan naturalmente valores de pH entre 3 y 3,5 y que las fermentaciones a temperaturas reducidas se emplean para preservar compuestos aromáticos y mejorar la calidad sensorial del vino. Estudios realizados en otras regiones vitivinícolas han reportado que *H. uvarum* puede mostrar adaptación parcial a estos rangos de pH dependiendo del origen ecológico de los aislamientos (Belda *et al.*, 2016; García-Ríos *et al.*, 2019). En este contexto, los resultados obtenidos son concordantes con la literatura, que señala que la robustez frente al estrés ácido y térmico constituye un criterio clave en la selección de levaduras para fermentaciones controladas, ya que asegura la implantación del cultivo iniciador y reduce el riesgo de fermentaciones incompletas (Combina *et al.*, 2008)

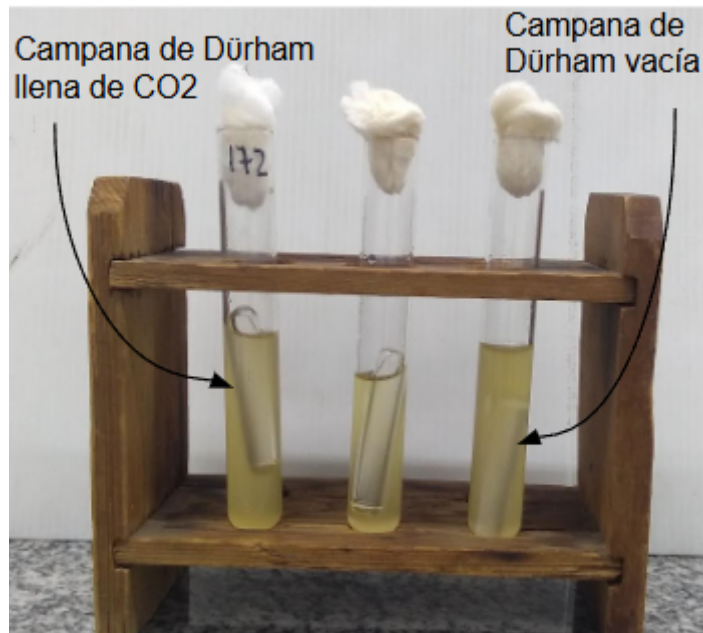


Figura N°23: Fermentación en mosto de uva con pH3.5 a 15°C. La campana de Dürham con acumulación de CO₂ indica fermentación.

El ensayo de tolerancia a etanol reveló que el 66,66% y el 42,85% de *S. cerevisiae* y *H. uvarum* respectivamente, son tolerantes, con respecto a *M. pulcherrima* no se registraron aislamientos tolerantes. La producción de CO₂ en las campanas de Dürham (Figura N°24) se utilizó como indicador indirecto de tolerancia, ya que implica que la levadura no solo sobrevive sino que mantiene actividad fermentativa en presencia de etanol. Esta evaluación es biotecnológicamente relevante porque el etanol acumulado durante la fermentación alcohólica es uno de los principales factores de estrés que enfrentan las levaduras; su acumulación altera la fluidez y la integridad de la membrana celular y puede comprometer funciones vitales como el transporte de nutrientes y la estabilidad metabólica (Aiello *et al.*, 2024). Desde el punto de vista enológico, una mayor tolerancia al etanol permite a las levaduras completar la fermentación incluso en etapas tardías cuando la concentración de alcohol es alta, asegurando una fermentación eficiente. Estudios comparativos han demostrado consistentemente que *S. cerevisiae* supera en tolerancia al etanol a muchas levaduras no convencionales, que típicamente soportan entre 5–7 % (v/v) de etanol antes de mostrar una marcada reducción en crecimiento, lo que explica la menor proporción de aislamientos tolerantes de especies como *H. uvarum* y la ausencia de tolerancia en *M. pulcherrima* (Ge *et al.*, 2023; Mukherjee *et al.*, 2017; Ochoa *et al.*, 2024).

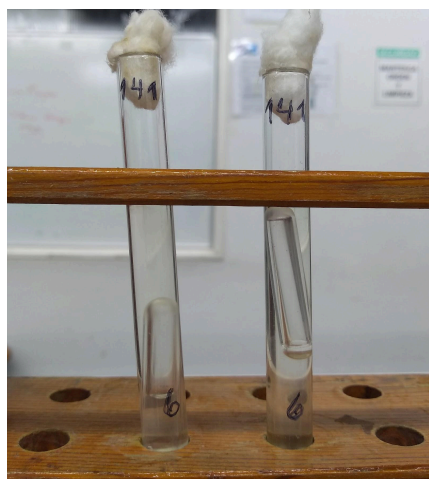


Figura N°24: Fermentación en presencia de etanol. La campana de Durham con acumulación de CO₂ indica fermentación.

El 23,8 % de las cepas de *S. cerevisiae* y el 3,57 % de *H. uvarum* demostraron resistencia a molibdato, mientras que *M. pulcherrima* no presentó aislamientos positivos para este ensayo (Figura N°25). En el contexto enológico, la resistencia a compuestos como el molibdato no solo podría reflejar una mayor robustez fisiológica frente a agentes inhibitorios presentes en mostos y vinos, sino que también se ha vinculado con la capacidad de generar metabolitos beneficiosos como glutatión, que protege contra la oxidación y puede contribuir a la estabilidad aromática del vino. Un estudio previo utilizó la selección con molibdato para obtener cepas de *S. cerevisiae* con características fenotípicas mejoradas, por lo cual la presencia de este rasgo puede ser aprovechada como criterio adicional en la selección de levaduras con mejores atributos tecnológicos para la vinificación (Mezzetti et al., 2017).

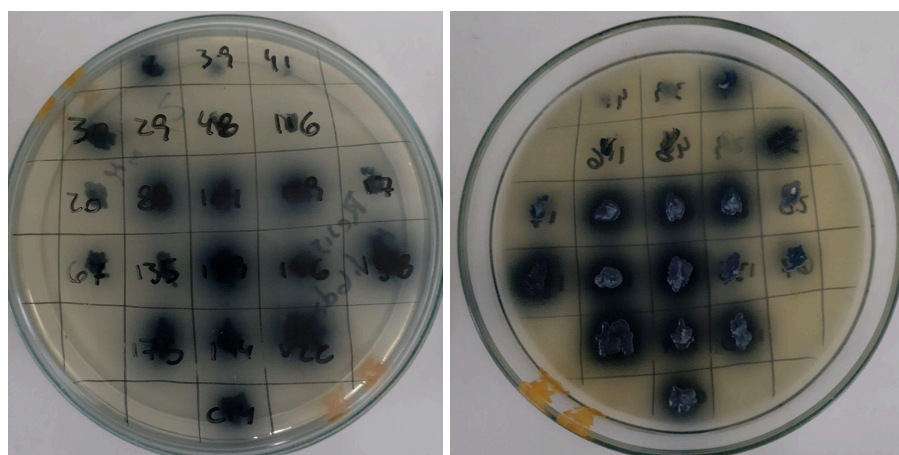


Figura N°25: Determinación de resistencia al molibdato como determinante de la producción de glutatión. La coloración azul de las siembras indican resistencia a molibdato.

En el ensayo de floculación realizado sobre las 21 cepas de *S. cerevisiae* preseleccionadas a partir de los rasgos negativos, solo tres cepas (14,28 %) mostraron poder de floculación antes de los 20 min. La floculación es un fenómeno de agregación celular en el que las células de levadura se adhieren entre sí formando flóculos que sedimentan desde el medio, un proceso que puede facilitar la clarificación natural del vino al final de la fermentación y reducir la necesidad de tratamientos costosos como filtración o centrifugación. Aunque la floculación no es común en la mayoría de las levaduras vínicas debido a la selección histórica hacia otros rasgos, su presencia tardía al final de la fermentación constituye un rasgo tecnológico deseable que puede mejorar la eficiencia de remoción de biomasa y favorecer la estabilidad del producto final (Chambers *et al.*, 2010; Varela *et al.*, 2020). Estudios recientes han demostrado que levaduras con capacidad floculante adecuada pueden sedimentar rápidamente al concluir la fermentación, facilitando el trasiego y disminuyendo la turbidez del vino, aunque también se ha observado que la floculación extremadamente temprana puede aumentar el riesgo de fermentaciones lentas o incompletas (Varela *et al.*, 2020). En este contexto, la baja proporción de cepas capaces de flocular observada en este trabajo concuerda con la literatura, que describe a la floculación como una característica relativamente poco frecuente entre levaduras de vino pero de alto valor tecnológico cuando se expresa en el momento adecuado del proceso fermentativo, pero con gran relevancia para la industria vinícola, ya que puede proporcionar una forma eficaz, sencilla y rentable de separar la biomasa de levadura del vino al final de la fermentación (Chambers *et al.*, 2010; Varela *et al.*, 2020).

En la Figura N°26 se muestran los rasgos positivos de la caracterización de *S. cerevisiae* y *H. uvarum*.

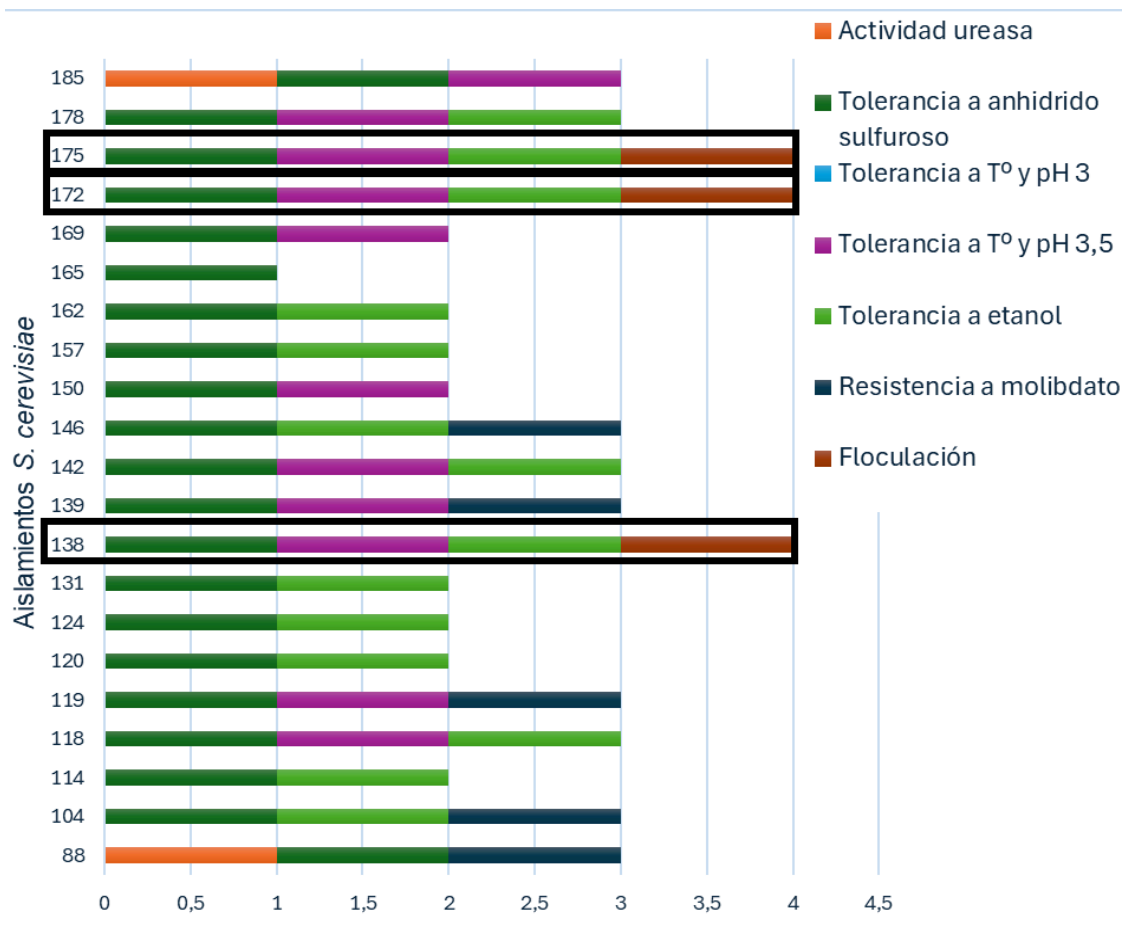


Figura N°26 a: Resultados de cepas de *S. cerevisiae* para rasgos positivos (recuadro indica cepas seleccionadas).

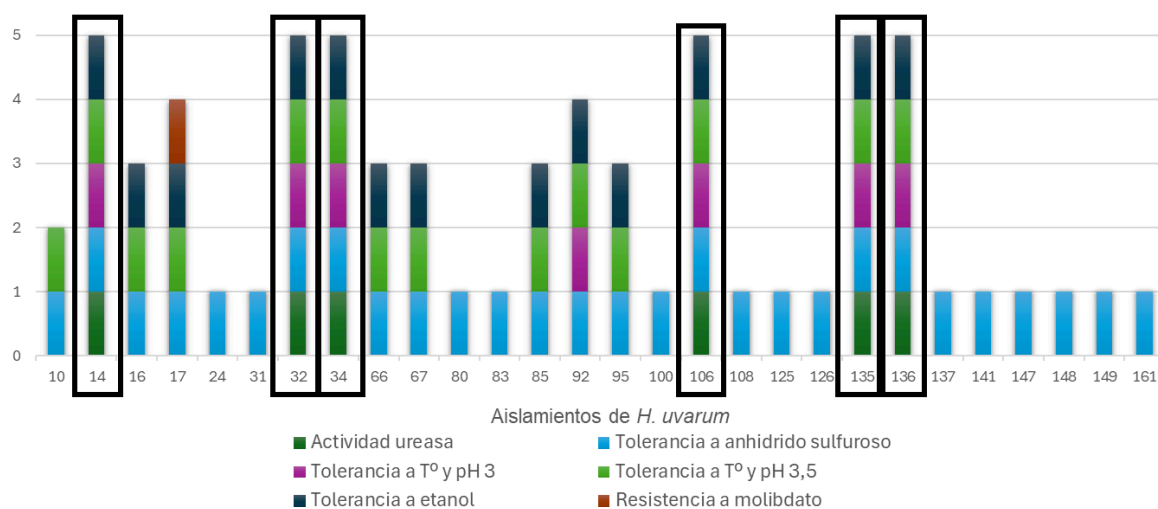


Figura N°26 b: Resultados de cepas de *H. uvarum* para rasgos positivos (recuadro indica cepas seleccionadas).

De las 21 cepas de *S. cerevisiae* se seleccionaron tres, 138, 172 y 175, debido a que presentaron mayor cantidad de rasgos positivos en comparación a las demás cepas (Figura N°26 a). En cuanto a las no convencionales, de la especie *H. uvarum* se seleccionaron seis cepas de las veintiocho analizadas, 14, 32, 34, 106, 135 y 136 por el mismo motivo (Figura N°26 b). Con respecto a los aislamientos de *M. pulcherrima* ninguno quedó seleccionado por no cumplir con requisitos básicos de rasgos positivos.

El análisis de correspondencias múltiples (ACM) con respecto a los rasgos fisiológicos positivos se realizó a nivel de cepa, ya que existió variabilidad suficiente para discriminar asociaciones intraespecíficas. Los dos primeros ejes factoriales explicaron el 100% de la variabilidad (Eje 1: 71%; Eje 2: 29%), lo que asegura una representación fiel de los datos (Figura N°27).

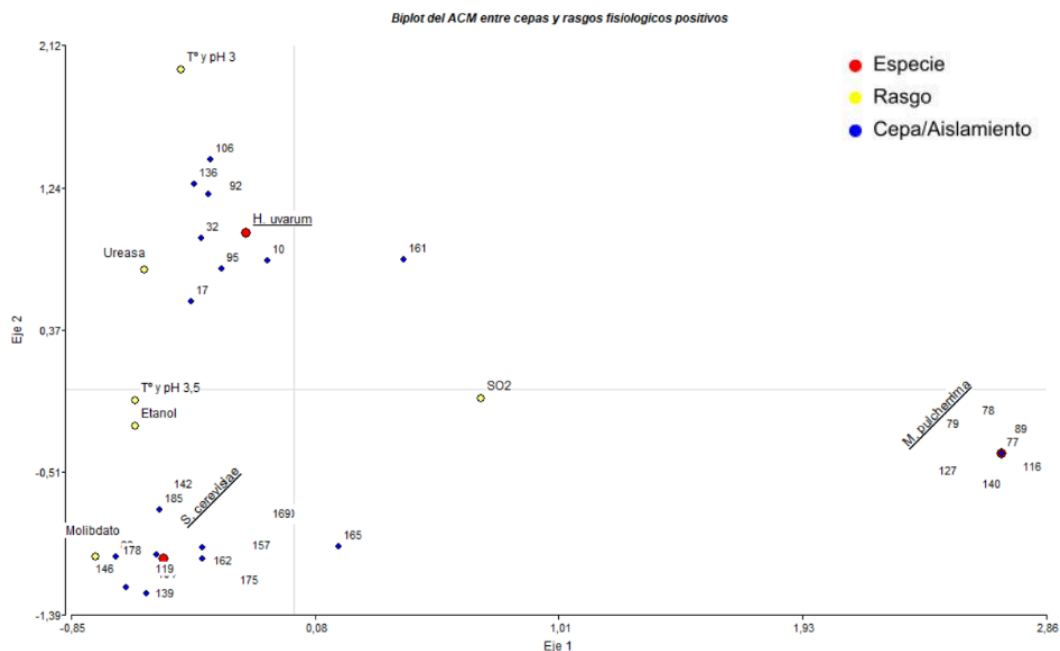


Figura N°27: Biplot obtenido del análisis de correspondencias múltiples ACM de rasgos enológicos positivos.

El análisis de correspondencias múltiples (ACM) de rasgos positivos evidenció un agrupamiento definido entre las cepas preseleccionadas, indicando que comparten atributos compatibles con los criterios enológicos establecidos. Los ejes principales discriminaron a *S. cerevisiae* como el grupo más robusto, mientras que algunas cepas de *H. uvarum* y *M. pulcherrima* se asociaron a rasgos complementarios,

vinculados a un metabolismo más oxidativo y menor eficiencia fermentativa, en concordancia con lo descrito por Mestre *et al.* (2017). Asimismo, se observaron asociaciones específicas entre especies y rasgos fisiológicos: *H. uvarum* se relaciona con actividad ureasa y tolerancia a pH ácido y bajas temperaturas (15 °C); *S. cerevisiae* se destacó por su resistencia a molibdato y tolerancia al etanol; mientras que *M. pulcherrima* se posicionó de forma más aislada, manifestando únicamente tolerancia a SO₂ junto con las otras especies evaluadas (Figura N°27). En conjunto, estos hallazgos evidencian perfiles fisiológicos contrastados que pueden ser estratégicamente aprovechados para la selección de cepas con mayor potencial enológico.

En este sentido, tres cepas de *S. cerevisiae* (138, 172 y 175) presentaron el perfil esperado, mientras que algunas cepas de *H. uvarum* (14, 32, 34, 106, 135 y 136) mostraron características que permitirían su uso en co-inóculos en concordancia con otros estudios (Comitini *et al.*, 2017; Franco *et al.*, 2019; Tzamourani *et al.*, 2023).

En el apartado de Anexos se encuentra el detalle de los resultados a nivel de cepa y aislamiento, de cada ensayo realizado de rasgos positivos, *S. cerevisiae* Anexo V, *H. uvarum* Anexo VI, *M. pulcherrima* Anexo VII, ensayo de floculación Anexo VIII.

Sobre la base de las características previamente mencionadas (Figura 26a), se llevó a cabo la evaluación del factor *killer* mediante reacciones cruzadas entre las tres cepas de *S. cerevisiae* (Figura N°28), en el cual la cepa 175 resultó ser *killer* y las demás cepas neutras entre sí.

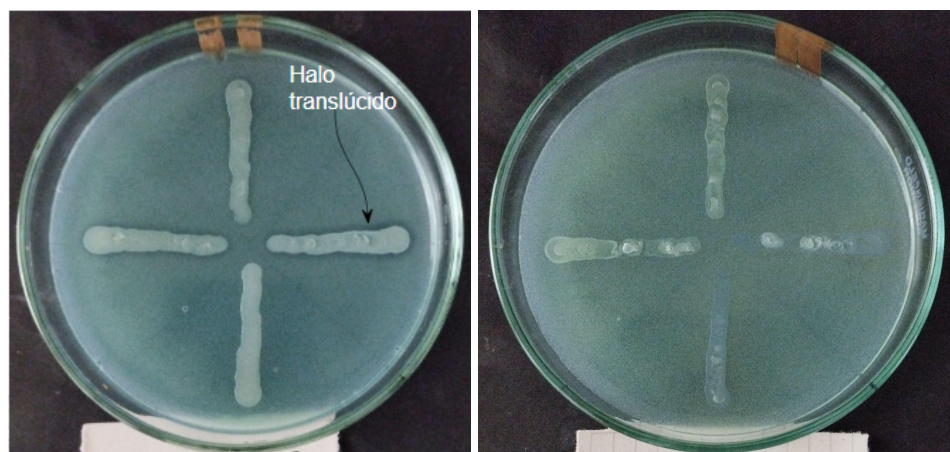


Figura N°28: Detección en placa del Fenómeno *killer*. En la imagen de la izquierda se observa la presencia de halo translúcido, en la derecha no se observa halo.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la caracterización fisiológica, las cepas 138, 172 y 175 de *S. cerevisiae* fueron seleccionadas para los ensayos de microvinificación por reunir la mayor cantidad de características de interés enológico. La evaluación de su comportamiento fermentativo mediante el seguimiento de la pérdida de peso de los sistemas fermentantes (Figura N°29) evidenció que las cepas 138 y 175 presentaron una mayor velocidad de fermentación que la cepa 172.

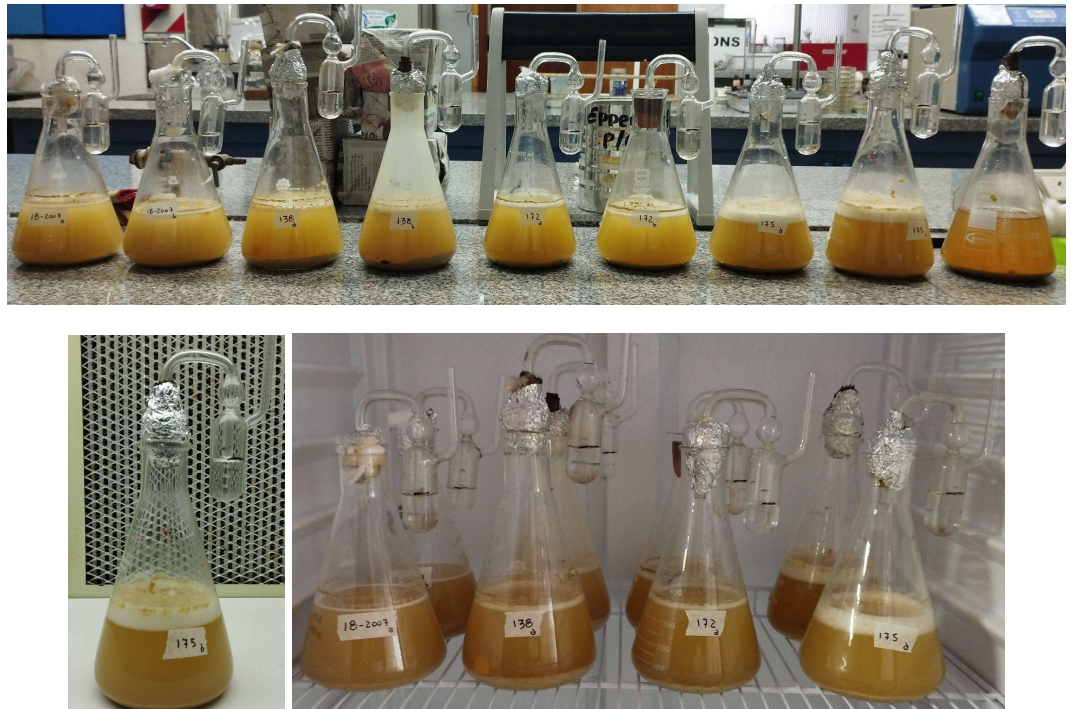


Figura N°29: Microvinificaciones con mosto uva Torrontés sanjuanino y las levaduras seleccionadas.

El análisis de varianza de medidas repetidas (ANOVA) (Tabla N°3) reflejó diferencias significativas, entre cepas y a lo largo de los días de fermentación. El tiempo fue un factor determinante por su impacto ($F(11,22) = 645.22, p < 0.001$), indicando variaciones marcadas en la pérdida de peso durante el ensayo (Figura N°30).

Tabla N°3:

Resultados del análisis de varianza (ANOVA) de la cinética fermentativa.

Efecto	Suma de cuadrados	gl num	Suma cuadrados error	gl den	F	p-valor
Intercepto	26298.0	1	86.722	2	606.49	0.001645
Día	6434.3	11	19.944	22	645.22	< 0.001

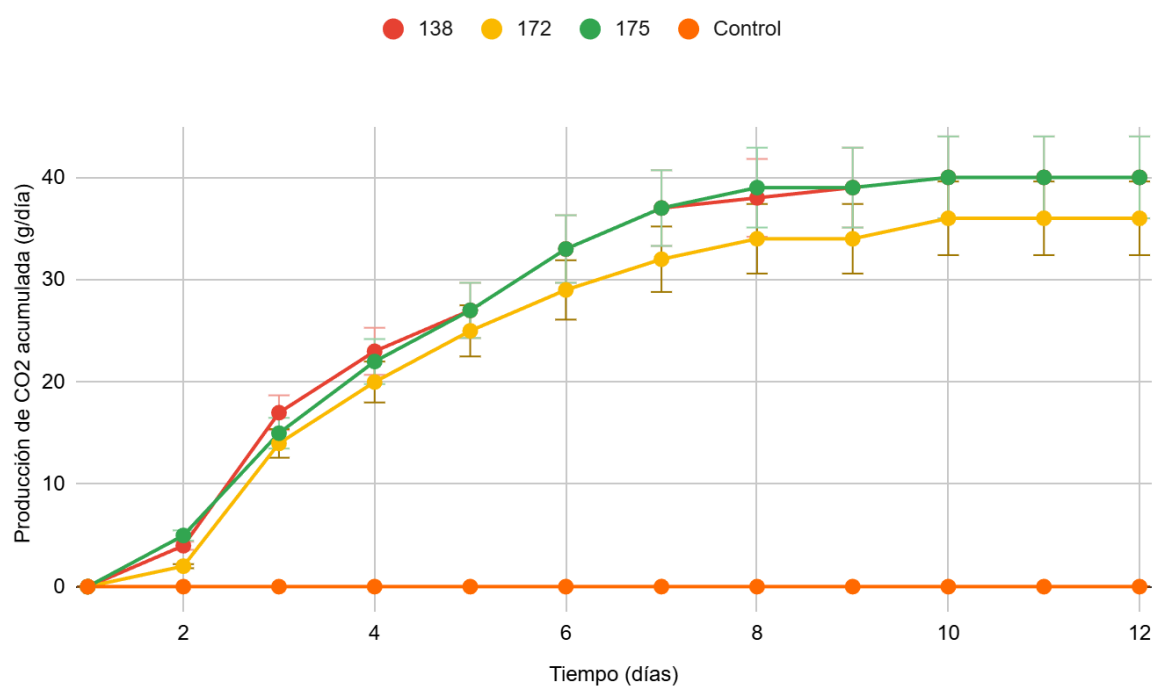


Figura N°30: Cinética fermentativa de las microvinificaciones conducidas por las levaduras *S. cerevisiae* (138, 172 y 175).

Entre las cepas de *S. cerevisiae*, las 138 y 175 mostraron una mayor velocidad fermentativa en comparación con la 172 (Figura N°30).

Los parámetros enológicos finales de las microvinificaciones (Tabla N°4) mostraron diferencias consistentes con la cinética fermentativa observada. Las cepas 138 y 172 alcanzaron mayor grado alcohólico (14,20% v/v), mientras que la cepa 175 terminó ligeramente por debajo (14,15% v/v), esto refleja su menor velocidad fermentativa.

La cepa 172 presentó la acidez total más baja (7,24 g/L), lo que indica una mayor eficiencia metabólica en la utilización de compuestos orgánicos, acorde con lo descrito para variabilidad intraespecífica de *S. cerevisiae* (Davies *et al.*, 2023). En contraste, la cepa 175 registró valores de acidez volátil más elevada (0,78 g/L), superando lo aceptable. El pH permaneció estable entre los tratamientos. Estos resultados refuerzan que las cepas 138 y 172 fueron más robustas, mientras que la 175 mostró menor desempeño global.

Tabla N°4:

Parámetros finales de las microvinificaciones de cada cepa.

Parámetro	138	172	175
Alcohol % v/v	14,20 ± 0,01	14,20 ± 0,01	14,15 ± 0,01
Ac. total g/L	7,87 ± 0,02	7,24 ± 0,02	7,76 ± 0,02
Ac. volátil g/L	0,30 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,78 ± 0,02
pH	3,35 ± 0,01	3,47 ± 0,01	3,48 ± 0,01

Las diferencias entre cepas coinciden con lo reportado por Davies *et al.* (2023) y Franco *et al.* (2019), quienes señalan que la eficiencia fermentativa es un rasgo altamente variable incluso dentro de la misma especie, lo que justifica la necesidad de una selección a nivel de cepa y no solo de especie.

El análisis y caracterización de rasgos negativos y positivos permite comprender la complementariedad entre especies o cepas durante la fermentación. *S. cerevisiae* aporta robustez fermentativa, *H. uvarum*, contribuye a la complejidad sensorial, acidez equilibrada y reducción de defectos. Este complemento justifica el creciente interés en el uso de co-inóculos, que permiten aprovechar los rasgos positivos de cada especie sin comprometer la cinética fermentativa (Liu *et al.*, 2016; Benito *et al.*, 2019; Binati *et al.*, 2020).

4 Conclusiones

En el presente trabajo se logró identificar y caracterizar levaduras autóctonas provenientes del Paraje Hilario, Calingasta con potencial enológico, aportando al conocimiento de la microbiota vínica regional. Los resultados permitieron establecer asociaciones entre especies y rasgos fisiológicos, tanto negativos como positivos, lo que refleja la relevancia que tiene considerar y estudiar la diversidad intra e interespecífica en la selección de cepas.

Las especies *S. cerevisiae*, *H. uvarum* y *M. pulcherrima* mostraron perfiles diferentes entre sí, que pueden ser aprovechados de manera complementaria en fermentaciones mixtas o secuenciales. Se seleccionaron tres cepas de *S. cerevisiae* (138, 172, 175) y seis de *H. uvarum* (14, 32, 34, 106, 135, 136), por sus capacidades y tolerancias que en conjunto resultan beneficiosas como alternativa viable a las fermentaciones espontáneas no controladas y al uso exclusivo de levaduras comerciales.

Las microvinificaciones permitieron validar el desempeño fermentativo de las cepas seleccionadas de *S. cerevisiae*, evidenciando diferencias significativas en sus cinéticas fermentativas y en los parámetros enológicos finales. En particular, las cepas 138 y 172 mostraron un comportamiento más robusto, con adecuada eficiencia fermentativa y mejores perfiles tecnológicos, mientras que la cepa 175 presentó menor desempeño relativo, asociado a una mayor producción de acidez volátil. Estos resultados confirman que la variabilidad intraespecífica tiene un impacto directo sobre el comportamiento fermentativo y la calidad del producto final.

En términos generales, estos hallazgos refuerzan la importancia que tiene la selección racional de levaduras autóctonas como herramienta biotecnológica para mejorar la calidad y la identidad de los vinos.

5 Referencias bibliográficas

- Aiello, E., Arena, M. P., De Vero, L., Montanini, C., Bianchi, M., Mescola, A., Alessandrini, A., Pulvirenti, A., & Gullo, M. (2024). Wine Yeast Strains Under Ethanol-Induced Stress: Morphological and Physiological Responses. *Fermentation*, 10(12), 631.
- Araujo, E. D., & Iuvaro, M. J. (2006). *Vitivinicultura y derecho*. Editorial Dunken.
- Artigas, F., & Machado, V. (2017). Aislamiento, selección e identificación de levaduras nativas con propiedades enológicas en uvas Tannat [Trabajo final de grado, Universidad ORT Uruguay, Facultad de Ingeniería].
- Barquet, M., Martín, V., Medina, K., Rockwell, R., & Head, B. (2012). Tandem repeat-tRNA (TRtRNA) PCR method for the molecular typing of non-*Saccharomyces* subspecies. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(2), 807–814.
- Belda, I., Navascués, E., Alfonso, A., & Marquina, D. (2014). Microbiología del proceso de vinificación: selección de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* autóctonas con óptimas propiedades enológicas. *Reduca (Biología)*. Serie Microbiología, 7(1), 1–14.
- Belda, I., Ruiz, J., Alastruey-Izquierdo, A., Navascués, E., Marquina, D., & Santos, A. (2016). Unraveling the Enzymatic Basis of Wine "Flavorome": A Phylo-Functional Study of Wine Related Yeast Species. *Frontiers in Microbiology*, 7, Artículo 12.
- 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, Artículo MAY.
- Belda, I., Izquierdo-Gea, S., Benitez-Dominguez, B., Ruiz, J. and Vila, J.C.C. (2025), Wine Fermentation as a Model System for Microbial Ecology and Evolution. *Environ Microbiol*, 27: e70092.
- Benito, Á., Calderón, F., & Benito, S. (2016). Combined Use of *S. pombe* and *L. thermotolerans* in Winemaking. Beneficial Effects Determined Through the Study of Wines' Analytical Characteristics. *Molecules*, 21(12), 1744.

- Benito, Á., Calderón, F., & Benito, S. (2019). The Influence of Non-*Saccharomyces* Species on Wine Fermentation Quality Parameters. *Fermentation*, 5(3), 54.
- Benito-Castellanos, A., Larreina, B., Banda, M. T. C. d. L., Santamaría, P., González-Arenzana, L., & Gutiérrez, A. R. (2025). Biodiversity of Yeast Species Isolated During Spontaneous Fermentation: Influence of Grape Origin, Vinification Conditions, and Year of Study. *Microorganisms*, 13(7), 1707.
- Bernardi, Analía Marcela. (2013). Selección de levaduras vínicas provenientes de la Provincia de Mendoza: (Tesis de grado). Mendoza, Universidad Nacional de Cuyo. Facultad de Ciencias Agrarias.
- Bezerra, C. D. S. (2012). Seleção de leveduras isoladas de uvas e mostos com atividade enzimáticas para melhoramento de vinhos.
- Binati, R. L., Lemos Junior, W. J. F., Luzzini, G., Slaghenaufi, D., Ugliano, M., & Torriani, S. (2020). Contribution of non-*Saccharomyces* yeasts to wine volatile and sensory diversity: A study on *Lachancea thermotolerans*, *Metschnikowia* spp. and *Starmerella bacillaris* strains isolated in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 318, 108470.
- Blanco, P., Ramilo, A., Cerdeira, M., & Orriols, I. (2006). Genetic diversity of wine *Saccharomyces cerevisiae* strains in an experimental winery from Galicia (NW Spain). *Antonie Van Leeuwenhoek*, 89(3), 351-357.
- Blouin, J., & Peynaud, É. (2006). *Enología práctica: Conocimiento y elaboración del vino* (4a ed.). Mundi-Prensa.
- Bokulich, N. A., Collins, T. S., Masarweh, C., Allen, G., Heymann, H., Ebeler, E. S., & Mills, D. A. (2016). Associations among wine grape microbiome, metabolome, and fermentation behavior suggest microbial contribution to regional wine characteristics. *mBio*, 7(3), e00631-16.
- Buzzini, P., Corazzi, L., Turchetti, B., Buratta, M., & Martini, A. (2004). Characterization of the in vitro antimycotic activity of a novel killer protein from *Williopsis saturnus* DBVPG 4561 against emerging pathogenic yeasts. *FEMS microbiology letters*, 238(2), 359-365.
- Chambers, P. J., & Pretorius, I. S. (2010). Fermenting knowledge: the history of winemaking, science and yeast research. *EMBO Reports*, 11(12), 914–920.

- Chen, Y., Jiang, J., Song, Y., Zang, X., Wang, G., Pei, Y., ... & Liu, Y. (2022). Yeast diversity during spontaneous fermentations and oenological characterisation of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* for potential as wine starter cultures. *Microorganisms*, 10(7), 1455.
- Chimeno, V., Sánchez, M. L., Paladino, S., Maza, M., Bernardi, M., Farrando, S., ... & Mercado, L. (2014). Caracterización de un cepario de levaduras para uso enológico mediante técnicas moleculares. In 37th World Congress of Vine and Wine and 12th General Assembly of the OIV (Part 2) (p. 06002). EDP Sciences.
- Combina, M., Massera, A., Mercado, L., & Sturm, M.E. (2008). *Caracterización enológica y selección de levaduras para fermentar mostos tintos a bajas temperaturas*. *Revista Enología – Edición Internacional*.
- Comitini, F., Capece, A., Ciani, M., & Romano, P. (2017). New insights on the use of wine yeasts. *Current Opinion in Food Science*, 13, 44–49.
- Corporación Vitivinícola Argentina. (2025). Plan Estratégico Vitivinícola. <https://coviar.ar/>.
- Davies, C., Gerard, L., Corrado, M. B., Soldá, C. A., Fernández, M. V., Dalzotto, M. G., & Esteche, S. (2023). Aislamiento, caracterización e identificación de levaduras de frutos de la vid (*Vitis vinifera*) de la región de Concordia. *Ciencia, Docencia y Tecnología Suplemento*, 13(15).
- Di Maro, E., Ercolini, D., & Coppola, S. (2007). Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the Catalanesca grape. *International Journal of Food Microbiology*, 117(2), 201–210.
- Drumonde-Neves, J., Fernandes, T., Lima, T., Pais, C., & Franco-Duarte, R. (2021). Learning from 80 years of studies: A comprehensive catalogue of non-*Saccharomyces* yeasts associated with viticulture and winemaking. *FEMS yeast research*, 21(3), foab017.
- Enolife. (s. f.). La vida del vino. <https://enolife.com.ar/es/>.
- Escribano-Viana, R., González-Arenzana, L., Garijo, P., López, R., Santamaría, P., & Gutiérrez, A. R. (2021). Selection process of a mixed inoculum of non-*Saccharomyces* yeasts isolated in the DO Ca. Rioja. *Fermentation*, 7(3), 148.
- FAO/AGRIS. (2013). SO₂ tolerance in non-*Saccharomyces* yeasts. AGRIS database.

- Feghali, N., Albertin, W., Tabet, E., Rizk, Z., Bianco, A., Zara, G., Masneuf-Pomarede, I., & Budroni, M. (2019). Genetic and Phenotypic Characterisation of a *Saccharomyces cerevisiae* Population of 'Merwah' White Wine. *Microorganisms*, 7(11), 492.
- Fernández-Espinar, T., Esteve-Zarzoso, B., Querol, A., & Barrio, E. (2000). RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8 S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78(1), 87-97.
- Ferrari, A. A., (2014). Borrachos eran los de antes... El vino como problema sociocultural y político en San Juan, Argentina, 1880-1910. *Revista Iberoamericana de Viticultura, Agroindustria y Ruralidad*, 1(3), 57-75.
- Fleet, G.H., "Wine yeasts for the future" *FEMS Yeast Research* 8 (2008), nº7, p. 979-995.
- Franco, W., Valencia, P., Ramírez, C., & Urtubia, A. (2019). Detección de levaduras y bacterias ácido-lácticas nativas de diferentes cultivares chilenos: Potenciales especies para la producción de vinos reducidos en alcohol. In *BIO Web of Conferences* (Vol. 12, p. 02022). EDP Sciences.
- García-Ríos, E., & Guillamón, J. M. (2019). *Sulfur dioxide resistance in Saccharomyces cerevisiae: Beyond SSU1*. *Microbial Cell*, 6(12), 527–530.
- Ge, X., Wang, J., Wang, X., Liu, Y., Dang, C., Suo, R., & Sun, J. (2023). Evaluación de levaduras autóctonas seleccionadas en viñedos chinos como posibles iniciadores para mejorar el aroma del vino. *Alimentos (Basilea, Suiza)*, 12(16), 3073.
- Gerard, L. M., Corrado, M. B., Davies, C. V., Soldá, C. A., Dalzotto, M. G., & Esteche, S. (2023). Isolation and identification of native yeasts from the spontaneous fermentation of grape musts.
- Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2013). *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiology*, 33(2), 271–281.
- Godoy, A. (2013). Aislamiento e identificación molecular de especies de levaduras No-*Saccharomyces* presentes en uvas.

- Gutiérrez-Gamboa, G., & Fourment, M. (2025). Research and Innovations in Latin American Vitiviniculture: A Review. *Horticulturae*, 11(5), 506.
- Gutierrez, Liz Alejandra Uribe (2007). Caracterización fisiológica de levaduras aisladas de la filósfera de Mora (Doctoral dissertation, Pontificia Universidad Javeriana).
- Guzzon, R., Paolini, M., Malacarne, M., Roman, T., Naselli, V., Francesca, N., & Larcher, R. (2024). Use of non-*Saccharomyces* yeasts in the prise de mousse of Lambrusco. Microbial evolution through alcoholic fermentation and effect on wine volatile profile. *OENO One*, 58(3).
- Hernández, J. J. (2021). The promotion of Argentine viticulture: Six decades, one role, multiple actors. *Mundo Agrario*, 22(50).
- Hoffman, C. S., & Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, 57(2-3), 267-272.
- Hornsey, I. S. (2012). *A History of Beer and Brewing*. Royal Society of Chemistry.
- INFORME TÉCNICO HILARIO – PARAJE HILARIO – VALLE DE CALINGASTA Tornello, S. (2022). Paraje Hilario: Informe técnico noviembre 2022.
- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. (2017). Variedades criollas de vid: diversidad genética y potencial enológico aún sin explotar.
- Instituto Nacional de Vitivinicultura. (2020). III informe del laboratorio del sector comercial. <https://www.argentina.gob.ar/inv>.
- Instituto Nacional de Vitivinicultura. (2022). Anuario de cosecha y elaboración 2022. <https://www.argentina.gob.ar/inv>.
- Instituto Nacional de Vitivinicultura. (2023). Resolución 37/2023 – RESOL-2023-37-APN-INV#MEC. <https://www.argentina.gob.ar/inv>.
- Instituto Nacional de Vitivinicultura. (2024). Informe anual de cosecha y elaboración 2024. <https://www.argentina.gob.ar/inv>.
- Ivit, N. N., & Kemp, B. (2018). The impact of non-*Saccharomyces* yeast on traditional method sparkling wine. *Fermentation*, 4(3), 73.
- Jiranek, V., Langridge, P., & Henschke, P. A. (1995). Amino acid and ammonium utilization by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from a

chemically defined medium. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46(1), 75-83.

- Jolly, N. P., Varela, C., & Pretorius, I. S. (2014). Not your ordinary yeast: Non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. In *FEMS Yeast Research* (Vol. 14, Issue 2).
- Lacoste, P., Yuri, J. A., Aranda, M., Castro, A., Quinteros, K., Solar, M., Soto, N., Gaete, J., & Rivas, J. (2010). Mundo agrario. *Mundo Agrario*, 10(20), 00–00.
- Legras, J. L., & Karst, F. (2003). Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS microbiology letters*, 221(2), 249-255.
- Ley General de Vinos, Ley N°14878. (1959).
- Liu, P., Lu, L., Duan, C., & Yan, G. (2016). The contribution of indigenous non-*Saccharomyces* wine yeast to improved aromatic quality of Cabernet Sauvignon wines by spontaneous fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, 71, 356–363.
- Liu, X. Z., Sang, M., Zhang, X. A., et al. (2017). *Enhancing expression of SSU1 genes in Saccharomyces uvarum leads to an increase in sulfite tolerance and a transcriptome profile change*. *FEMS Yeast Research*, 17(3).
- Maicas, S. (2020). The Role of Yeasts in Fermentation Processes. *Microorganisms*, 8(8), 1142.
- Manzanares, P., Vallés, S., & Viana, F. (2011). Chapter 4 - Non-*Saccharomyces* Yeasts in the Winemaking Process. *Molecular Wine Microbiology*, 85-110.
- Martín de la Higuera, S. (2022). Aislamiento y selección de levaduras no-*Saccharomyces* en Tempranillo.
- Massera, A., Assof, M., Sturm, M. E., Sari, S., Jofré, V., Cordero-Otero, R., & Combina, M. (2012). Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains to ferment red musts at low temperature. *Annals of microbiology*, 62, 367-380
- Maturano, Y. P., Mestre, M. V., Esteve-Zarzoso, B., Nally, M. C., Lerena, M. C., Toro, M. E., & Combina, M. (2015). Yeast population dynamics during prefermentative cold soak of Cabernet Sauvignon and Malbec wines. *International journal of food microbiology*, 199, 23-32

- McGovern, P. E., Zhang, J., Tang, Z., Zhang, Z., Hall, R. A., Moreau, R. A., Núñez, A., Butrym, E. D., Richards, M. P., Wang, C. S., Cheng, G., Zhao, Z., & Wang, C. (2004). Fermented beverages of pre-and protohistoric China. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(51), 17593–17598.
- Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A., & Leao, C. (2002). Survey of hydrogen sulphide production by wine yeasts. *Journal of food protection*, 65(6), 1033-1037.
- Mezzetti, F., Fay, J. C., Giudici, P., & De Vero, L. (2017). Genetic variation and expression changes associated with molybdate resistance from a glutathione producing wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *PloS one*, 12(7), e0180814.
- Mestre Furlani, M. V., Vazquez, F., & Mercado, L. A. (2019). Obtención de vinos con reducida concentración de etanol mediante el uso de levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.
- Mestre Furlani, María Victoria; Vazquez, Fabio; Mercado, Laura Analia; Obtención de vinos con reducida concentración de etanol mediante el uso de levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*; 25-3-2019.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.
- Miranda-Castilleja, D. E., Ortiz-Barrera, E., Arvizu-Medrano, S. M., Ramiro-Pacheco, J., Aldrete-Tapia, J. A., & Martínez-Peniche, R. A. (2015). Aislamiento, selección e identificación de levaduras *Saccharomyces spp.* nativos de viñedos en Querétaro, México. *Agrociencia*, 49(7), 759–773.
- Mukherjee, V., Radecka, D., Aerts, G. *et al.* Paisaje fenotípico de especies de levaduras no convencionales para diferentes características de tolerancia al estrés deseables en la fermentación con bioetanol. *Biotechnol Biofuels* 10, 216 (2017).
- Nadai, C., Treu, L., Campanaro, S., Giacomini, A., & Corich, V. (2016). *Different mechanisms of resistance modulate sulfite tolerance in wine yeasts*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(2), 797–813.
- Nisiotou, A., Gyftogianni, E., & Banilas, G. (2022). Evaluation of Different Molecular Markers for Genotyping Non-*Saccharomyces* Wine Yeast Species. *Microbiology Research*, 13(3), 643-654.

- Ochoa Flórez, D. E., Duran Osorio, D. S. ., & Trujillo Navarro, Y. Y. . (2024). Adaptación de levaduras: factores de incidencia de estrés fermentativo del género *saccharomyces* en vinificación. Una revisión . *Revista ION*, 37(1), 83–98.
- Organización Mundial de la Propiedad Intelectual. (2023). Indicaciones geográficas: Preguntas frecuentes. https://www.wipo.int/es/web/geographical-indications/faq_geographicalindications.
- Padilla, B., Gil, J., & 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, Art. 411.
- Pandolfi, C.; Cuello, I. *Acenología – Revista de enología científica y profesional. Ciencia y tecnología. “Reseña de la vitivinicultura argentina”.* (2004).
- Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A. S., & Hatziloukas, E. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS microbiology*, 6(1), 1–31.
- Petrignani, D. B. (2022). Selección de levaduras nativas *Saccharomyces cerevisiae* para vinificaciones en variedades blancas de viñedos de Pozo de los Algarrobos, San Juan [Tesis de grado, Universidad Nacional de San Juan].
- Pozo-Bayón, M. Á., Martínez-Rodríguez, A., Pueyo, E., & Moreno-Arribas, M. V. (2009). Chemical and biochemical features involved in sparkling wine production: from a traditional to an improved winemaking technology. *Trends in Food Science & Technology*, 20(6-7), 289-299.
- Pretorius, I.S., (2000) “Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking” *Yeast* 16. nº 8, p. 675-729.
- Pretorius, I. S. (2020). Tasting the terroir of wine yeast innovation. *FEMS yeast research*, 20(1), foz084.
- Rainieri, S., & Pretorius, I. S. (2000). Selection and improvement of wine yeasts. *Annals of microbiology*, 50(1), 15-32.
- Raymond Eder, M. L., & Rosa, A. L. (2021). Non-conventional grape varieties and yeast starters for first and second fermentation in sparkling wine production using the traditional method. *Fermentation*, 7(4), 321.

- 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.
- Rodríguez, M. E., Lopes, C. A., Van Broock, M., Valles, S., Ramon, D., & Caballero, A. C. (2004). Screening and typing of Patagonian wine yeasts for glycosidase activities. *Journal of Applied Microbiology*, 96(1), 84-95.
- Röcker, J., Strub, S., Ebert, K., & Grossmann, M. (2016). Usage of different aerobic non-*Saccharomyces* yeasts and experimental conditions as a tool for reducing the potential ethanol content in wines. *European Food Research and Technology*, 242(12), 2051–2070.
- Russell, I. (2003). Understanding yeast fundamentals. *The alcohol textbook*, 4(2003), 531-537.
- Sidari, R., Ženišová, K., Tobolková, B., Belajová, E., Cabicarová, T., Bučková, M. & Pangallo, D. (2021). Wine yeasts selection: Laboratory characterization and protocol review. *Microorganisms*, 9(11), 2223.
- Simonaggio, D., & Lehn, D. N. (2014). DIFERENTES MÉTODOS PARA ELABORAÇÃO DE VINHO ESPUMANTE. *Caderno Pedagógico*, 11(1).
- Soares, E.V. & Seynaeve, J. (2000). Induction of flocculation of brewer's yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae* by changing the calcium concentration and pH of culture medium. *Biotechnology Letters* 22, 1827–1832.
- Suárez-Lepe, J. A., & Morata, A. (2012). New trends in yeast selection for winemaking. *Trends in Food Science & Technology*, 23(1), 39–50.
- Suárez-Machín, C., Garrido-Carralero, N. A., & Guevara-Rodríguez, C. A. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 50(1), 20-28.
- Tinajero-Castro, C. M., Remigio-Vázquez, E. J., Ramirez-Manjarrez, M. F., Hernández-González, G. R., Ramirez-Ramirez, A., Frausto-Díaz, L. A., Ozuna, C. (2023). La vitivinicultura en el estado de Guanajuato: relación entre terruño, uva y vino. *JÓVENES EN LA CIENCIA*, 21, 1–7.
- Tornello, S., & Rojas, M. (2022). Variedades criollas de vid y transmisión generacional de los saberes locales en la localidad de Hilario, departamento de Calingasta (San Juan). En III Congreso Argentino de Agroecología (pp.

1369–1376). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) – Estación Experimental Agropecuaria San Juan.

- Toro, M. E., & Vazquez, F. (2002). Fermentation behaviour of controlled mixed and sequential cultures of *Candida cantarellii* and *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(4), 351-358.
- Tzamourani, A. P., Taliadouros, V., Paraskevopoulos, I., & Dimopoulou, M. (2023). Developing a novel selection method for alcoholic fermentation starters by exploring wine yeast microbiota from Greece. *Frontiers in Microbiology*, 14, Artículo 1301325.
- Valente, P., Ramos, J. P., & Leoncini, O. (1999). Sequence as a tool for the identification of *Saccharomyces* strains. *Canadian Journal of Microbiology*, 45(11), 949–958.
- Varela, C., Bartel, C., Nandorfy, D.E. *et al.* (2020). Identification of flocculant wine yeast strains with improved filtration-related phenotypes through application of high-throughput sedimentation rate assays. *Sci Rep* 10, 2738.
- Velázquez, R., Zamora, E., Álvarez, M. L., & Ramírez, M. (2019). Using *Torulaspota delbrueckii* killer yeasts in the elaboration of base wine and traditional sparkling wine. *International journal of food microbiology*, 289, 134-144.
- Vergara Alvarez, S. C., Leiva Alaniz, M. J., Mestre Furlani, M. V., Vazquez, F., Agresti, P. M., Nally, M. C., & Maturano, Y. P. (2023). Bioprospecting of the probiotic potential of yeasts isolated from a wine environment. *Fungal Genetics and Biology*, 164, 103767.
- Viana, F., Gil, J. V., Genovés, S., Vallés, S., & Manzanares, P. (2008). Rational selection of non- *Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. *Food Microbiology*, 25(6), 778-785.
- Vicente, J., Calderón, F., Santos, A., Marquina, D., y Benito, S. (2021). Alto potencial de *Pichia kluyveri* y otras especies de *Pichia* en la tecnología del vino. *Revista Internacional de Ciencias Moleculares*, 22(3), 1196.
- Vigentini, I., Barrera Cardenas, S., Valdetara, F., Faccincani, M., Panont, C. A., Picozzi, C., & Foschino, R. (2017). Use of native yeast strains for in-bottle fermentation to face the uniformity in sparkling wine production. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1225.

- Vilela, A. (2020). Non-*Saccharomyces* Yeasts and Organic Wines Fermentation: Implications on Human Health. *Fermentation*, 6(2), 54.
- Wines of Argentina. (s. f.). Provincia de San Juan. <https://www.winesofargentina.org/es/provinces/san-juan>.
- Zara, G., & Nardi, T. (2021). *Yeast metabolism and its exploitation in emerging winemaking trends: From sulfite tolerance to sulfite reduction*. *Fermentation*, 7(2), 57.
- Zhong, W., Chen, T., Yang, H., & Li, E. (2020). Isolation and selection of non-*Saccharomyces* yeasts being capable of degrading citric acid and evaluation its effect on kiwifruit wine fermentation. *Fermentation*, 6(1), 25.
- Zoffoli, J. P., & Latorre, B. A. (2011). Table grape (*Vitis vinifera* L.). *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits: Cocona to Mango*, 179–214e.
- Zullo, B. A., & Ciafardini, G. (2019). Evaluation of physiological properties of yeast strains isolated from olive oil and their in vitro probiotic trait. *Food microbiology*, 78, 179-187.

6 Anexos

Anexo I

Resultados que se obtuvieron de cada cepa de *S. cerevisiae* en los ensayos de rasgos negativos.

<i>S. cerevisiae</i>	Cepas	Producción de H ₂ S	Producción de acidez volátil	Precursores de aminas biógenas
	71	-	+	-
	88	-	-	-
	104	-	-	-
	114	-	-	-
	118	-	-	-
	119	-	-	-
	120	-	-	-
	124	-	-	-
	131	-	-	-
	138	-	-	-
	139	-	-	-
	142	-	-	-
	144	+	-	-
	146	-	-	-
	150	-	-	-
	151	+	-	-
	155	+	-	-
	157	-	-	-
	158	+	+	-
	162	-	-	-
	165	-	-	-
	168	+	+	-
	169	-	-	-
	172	-	-	-
	175	-	-	-
	178	-	-	-
	179	+	-	-
	181	+	-	-
	183	+	-	-

	185	-	-	-
	194	+	-	-

Anexo II

Detalle de lo obtenido de cada aislamiento de *H. uvarum*, con respecto a los rasgos negativos.

<i>H. uvarum</i>	Aislamientos	Producción de H ₂ S	Producción de acidez volátil	Precursores de aminas biógenas
	4	+	-	-
	6	+	-	-
	9	+	-	-
	10	-	-	-
	11	+	-	-
	14	-	-	-
	16	-	-	-
	17	-	-	-
	21	+	-	-
	22	+	-	-
	24	-	-	-
	31	-	-	-
	32	-	-	-
	34	-	-	-
	66	-	-	-
	67	-	-	-
	80	-	-	-
	83	-	-	-
	85	-	-	-
	92	-	-	-
	95	-	-	-
	100	-	-	-
	106	-	-	-
	108	-	-	-
	125	-	-	-
	126	-	-	-
	132	-	+	-
	135	-	-	-
	136	-	-	-

	137	-	-	-
	141	-	-	-
	147	-	-	-
	148	-	-	-
	149	-	-	-
	153	+	-	-
	159	-	+	-
	160	-	+	-
	161	-	-	-

Anexo III

Tabla que contiene los resultados de los aislamientos de *M. pulcherrima* cuando se les realizaron los ensayos de rasgos no deseados.

<i>M. pulcherrima</i>	Aislamientos	Producción de H ₂ S	Producción de acidez volátil	Precusores de aminas biógenas
	1	+	+	-
	2	+	+	-
	3	+	-	-
	12	N/D	-	-
	13	+	-	-
	18	+	-	-
	19	+	+	-
	25	+	-	-
	26	+	-	-
	27	+	-	-
	28	N/D	N/D	-
	29	N/D	N/D	-
	35	+	-	-
	36	-	+	-
	37	-	-	-
	45	+	+	-
	46	N/D	-	-
	47	N/D	-	-
	48	N/D	-	-
	49	N/D	-	-
	61	+	-	-
	62	+	+	-

	77	-	-	-
	78	-	-	-
	79	-	-	-
	89	-	-	-
	115	-	+	-
	116	-	-	-
	127	-	-	-
	140	-	-	-

Anexo IV

Tabla que contiene los resultados de los ensayos de rasgos negativos de las especies no convencionales (*Starmerella bacilaris*, *Naganishia albidus*, *Aureobasidium melanongenium*, *Zygoascus meyerae*, *Cryptococcus uzbekistanensis*, *Cryptococcus albidus*).

<i>Starmerella bacilaris</i>	Aislamientos	Producción de H ₂ S	Producción de acidez volátil	Precusores de aminas biógenas
	7	-	+	-
<i>Naganishia albidus</i>	Aislamientos	Producción de H ₂ S	Producción de acidez volátil	Precusores de aminas biógenas
	8	+	-	-
	9	+	-	-
	15	-	+	-
	40	-	+	-
	41	-	+	-
<i>Aureobasidium melanongenium</i>	Aislamientos	Producción de H ₂ S	Producción de acidez volátil	Precusores de aminas biógenas
	20	+	-	+
<i>Zygoascus meyerae</i>	Aislamientos	Producción de H ₂ S	Producción de acidez volátil	Precusores de aminas biógenas
	30	-	+	-
<i>Cryptococcus uzbekistanensis</i>	Aislamientos	Producción de H ₂ S	Producción de acidez volátil	Precusores de aminas biógenas
	38	+	-	-
	39	+	-	-
<i>Cryptococcus albidus</i>	Aislamientos	Producción de H ₂ S	Producción de acidez volátil	Precusores de aminas biógenas
	43	-	+	-

Anexo V

Resultados de cada cepa de *S. cerevisiae* en los ensayos de rasgos positivos.

<i>S. cerevisiae</i>	Cepas	Actividad ureasa	SO ₂	T° y pH 3	T° y pH 3,5	Etanol	Molibdato
	88	+	+	-	-	-	+
	104	-	+	-	-	+	+
	114	-	+	-	-	+	-
	118	-	+	-	+	+	-
	119	-	+	-	+	-	+
	120	-	+	-	-	+	-
	124	-	+	-	-	+	-
	131	-	+	-	-	+	-
	138	-	+	-	+	+	-
	139	-	+	-	+	-	+
	142	-	+	-	+	+	-
	146	-	+	-	-	+	+
	150	-	+	-	+	-	-
	157	-	+	-	-	+	-
	162	-	+	-	-	+	-
	165	-	+	-	-	-	-
	169	-	+	-	+	-	-
	172	-	+	-	+	+	-
	175	-	+	-	+	+	-
	178	-	+	-	+	+	-
	185	+	+	-	+	-	-

Anexo VI

Detalle de lo obtenido de cada aislamiento de *H. uvarum*, con respecto a los rasgos positivos.

<i>H.</i>	Aislamientos	Actividad ureasa	SO ₂	T° y pH 3	T° y pH 3,5	Etanol	Molibdato
	10	-	+	-	+	-	-
	14	+	+	+	+	+	-
	16	-	+	-	+	+	-
	17	-	+	-	+	+	+
	24	-	+	-	-	-	-
	31		+	-	-	-	-

	32	+	+	-	+	+	-
	34	+	+	+	+	+	-
	66	-	+	-	+	+	-
	67	-	+	-	+	+	-
	80	-	+	-	-	-	-
	83	-	+	-	-	-	-
	85	-	+	-	+	+	-
	92	-	+	+	+	+	-
	95	-	+	-	+	+	-
	100	-	+	-	-	-	-
	106	+	+	+	+	-	-
	108		+	-	-	-	-
	125	-	+	-	-	-	-
	126	-	+	-	-	-	-
	135	+	+	+	+	+	-
	136	+	+	+	+	+	-
	137	-	+	-	-	-	-
	141	-	+	-	-	-	-
	147	-	+	-	-	-	-
	148	-	+	-	-	-	-
	149	-	+	-	-	-	-
	161	-	+	-	-	-	-

Anexo VII

Tabla que contiene los resultados de los aislamientos de *M. pulcherrima* cuando se les realizaron los ensayos de rasgos deseados.

<i>M. pulcherrima</i>	Aislamientos	Actividad ureasa	SO ₂	T° y pH 3	T° y pH 3,5	Etanol	Molibdato
	12	-	+	-	-	-	-
	28	-	+	-	-	-	-
	29	-	+	-	-	-	-
	37	-	+	-	-	-	-
	46	-	+	-	-	-	-
	47	-	+	-	-	-	-
	48	-	+	-	-	-	-
	49	-	+	-	-	-	-
	77	-	+	-	-	-	-
	78	-	+	-	-	-	-

	79	-	+	-	-	-	-
	89	-	+	-	-	-	-
	116	-	+	-	-	-	-
	127	-	+	-	-	-	-
	140	-	+	-	-	-	-

Anexo VIII

Resultados del ensayo de floculación, realizado a la especie *S. cerevisiae*.

<i>S. cerevisiae</i>	Cepas	Floculación 10'	Floculación 20'	Floculación 30'
	88	-	-	+ (floculante)
	104	-	-	+ (floculante)
	114	-	-	-
	118	-	-	+ (floculante)
	119	-	-	+ (floculante)
	120	-	-	-
	124	-	-	-
	131	-	-	-
	138	+ (floculante)	-	-
	139	-	-	+ (floculante)
	142	-	-	+ (floculante)
	146	-	-	+ (floculante)
	150	-	-	+ (floculante)
	157	-	-	-
	162	-	-	-
	165	-	-	-
	169	-	-	+ (floculante)
	172	-	+ (floculante)	-
	175	+ (floculante)	-	-
	178	-	-	+ (floculante)
	185	-	-	+ (floculante)