

Dinámica poblacional de levaduras durante la fermentación espontánea de uva blanca variedad Malvasía

Yeasts population dynamics during the spontaneous fermentation of white grape variety Malvasía

M. Berradre¹, C. Aiello Mazzarri², L. Mesa³, N. Arraiz⁴, C. Prieto⁴, J. Ortega⁵,
B. Sulbarán¹, G. Ojeda de Rodríguez¹, V. Fernández¹,
J. Martínez¹ y B. Esteve-Zarzoso⁶

¹Laboratorio de Alimentos. Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia (LUZ), Venezuela.

²Laboratorio de Fermentaciones Industriales y Tecnología de Alimentos. Facultad de Ingeniería, LUZ.

³Laboratorio de Micología. Facultad de Medicina, LUZ.

⁴Laboratorio de Biología Molecular. Facultad de Medicina, LUZ.

⁵Departamento de Estadística. Facultad de Agronomía, LUZ.

⁶Departament de Bioquímica y Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili. Marcel·lí Domingo s/n, 43007, Tarragona, España.

Resumen

Se identificaron y caracterizaron levaduras autóctonas tropicales aisladas durante una fermentación espontánea de mosto de uva de la variedad Malvasía, en la región zuliana. El seguimiento de la fermentación se realizó determinando la densidad, el porcentaje de etanol, durante la misma se realizó recuento de células de levaduras al microscopio y en placas con agar YEPD y Sabouraud. Para la identificación de las levaduras se hizo extracción del ADN y amplificación por PCR del gen ribosomal 5.8S y las regiones internas transcritas adyacentes (ITS1 e ITS2), utilizando los cebadores ITS1 e ITS4. Los productos amplificados se sometieron al análisis de restricción con las enzimas *Hinf*I, *Hae* III, *Cfo*I y *Dde*I. La caracterización de las cepas de levaduras del género *Saccharomyces* se realizó mediante el análisis de restricción del ADN mitocondrial utilizando el enzima *Hinf*I. Durante la fermentación espontánea se aislaron cuatro especies de levaduras *Hanseniaspora uvarum*, *H. guilliermondii*, *Rhodotorula mucilaginosa* y *S. cerevisiae*. Durante las primeras fases de la fermentación espontánea las levaduras del género *Hanseniaspora* fueron las mayoritarias, pero

a partir del octavo día de fermentación se impuso totalmente la especie *S. cerevisiae*, siendo una cepa de esta especie la que fue aislada hasta el final de la fermentación.

Palabras clave: levaduras autóctonas, fermentación espontánea, PCR-RFLP 5,8.

Abstract

Identification and characterization of natural yeast were done to the yeast isolated from a spontaneous fermentation of grape must (variety Malvasia) coming from the state of Zulia. Monitoring fermentation was done by determination of density, ethanol percentage; yeast cells were counted on optical microscopy and YEPD or Sabouraud agar plates. Identification of yeasts isolated was conducted by the amplification by PCR of the ribosomal gene 5.8S and intergenic transcribed spacers adjacent (ITS1 and ITS2), using the primers ITS1 and ITS4. The amplified products were analyzed by restriction enzymes *Hinf* I, *Hae* III, *Cfo*I and *Dde*I. Yeast characterization *Saccharomyces* was done by restriction analysis of the mitochondrial DNA using the enzyme *Hinf*I yeasts isolated during spontaneous fermentation belong to the species *Hanseniaspora guillermondi*, *H. uvarum*, *Rhodotorula mucilaginosa* and *S. cerevisiae*. During the first days of fermentation the main yeasts isolated belong to the genus *Hanseniaspora*, but from the eighth day of fermentation is fully imposed the specie *S. cerevisie*, one strain of this specie that was isolated until the end of fermentation.

Key words: autochthonous yeast, spontaneous fermentation, PRC-RFLP 5.8S.

Introducción

El perfil aromático final de un vino puede verse influenciado por diferentes aspectos, que van desde las prácticas viticulturales aplicadas en la viña hasta la tecnología empleada en la elaboración de los vinos. Uno de ellos radica en la población microbiana que aparece en la superficie de las uvas en la viña. La actividad metabólica de los diferentes géneros y especies de levaduras allí presentes, y capaces de resistir las condiciones de vinificación, influyen la calidad sensorial y las características organolépticas del vino final obtenido (Raspor *et al.*, 2006). Trabajos previos coincidieron en que las levaduras apiculadas son las espe-

Introduction

The final aroma of a wine can be influenced by different aspects that go through viticultural practices applied to the vineyard until the technology employed in the elaboration of wines. One of these is the microbial population that appears in the surface of grapes in the vineyard. The metabolic activity of the different genes and species of yeast present and capable of resisting the wine making conditions, influence the sensorial quality and the organoleptic characteristics of the final obtained wine (Raspor *et al.*, 2006). Previous researches agree that the apiculate yeasts were the predominant species on the surfaces

cies predominantes sobre las superficies de los granos de uvas, *Hanseniaspora uvarum* (y su forma anamorfa *Kloeckera apiculata*) representó el 50-75% de la población total de levaduras aisladas, aunque en menor población se han encontrado presentes especies de levaduras de los géneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia* y *Rhodotorula*. Contrario a lo que lógicamente se pensaba, las especies fermentativas de *Saccharomyces* (e.j. *S. cerevisiae*) se han aislado en muy baja población sobre uvas sanas y han sido extrañamente aisladas de granos de uva intactos y de suelos de viñedos. Se ha comprobado que estas especies fermentativas están asociadas con el área de la bodega y que son incorporadas dentro del mosto durante el tratamiento mecánico de la uva y el proceso de fermentación (Naumov *et al.*, 1993; Beltran *et al.*, 2002; Sabate y *et al.*, 2002; Raspór *et al.*, 2006; Barajón *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2009).

La composición y el número de levaduras indígenas sobre los granos de uvas está influenciada por numerosos factores, tales como variedad de uva, grado de madurez en el momento de la cosecha, condiciones climatológicas, ubicación geográfica, daño físico de las uvas y la intensidad en el manejo de plagas con uso de agroquímicos como fungicidas e insecticidas (Raspór *et al.*, 2002; Combina *et al.*, 2005; Beltran *et al.*, 2002). Todas las levaduras que se incorporan al mosto provenientes de la superficie de las uvas no son capaces de soportar las condiciones de vinificación. Así, las levaduras no-*Saccharomyces* crecen bien durante las

of grapes' grains, *Hanseniaspora uvarum* (and its anamorphous shape *Kloeckera apiculata*) represented 50-75% of the total population of isolated yeasts, though in a lower population had been found yeasts species of the genes *Candida*, *Cryptococcus*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia* and *Rhodotorula*. Contrary to what was logically thought, the fermentative species of *Saccharomyces* (e.j. *S. cerevisiae*) have been isolated in a very low population on healthy grapes and have been strangely isolated in grains of intact grapes and of vineyards soils. It has been proved that these fermentative species are related to the winery area and that are incorporated to the must during the mechanical treatment of the grape and the fermentation process (Naumov *et al.*, 1993; Beltran *et al.*, 2002; Sabate y *et al.*, 2002; Raspór *et al.*, 2006; Barajón *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2009).

The composition and number of indigenous yeasts on the grape grains are influenced by different factors, such as the variety of the grape, ripening phase and harvest time, weather conditions, geographical location, physical damage of the grapes and intensity in the pest handle using agro-chemical such as fungicides and pesticides (Raspór *et al.*, 2002; Combina *et al.*, 2005; Beltran *et al.*, 2002). All yeasts that are introduced to the most come from the surface of the grapes are not capable of resisting the vinification conditions. Thus, non *Saccharomyces* yeasts grow well during the first phases of fermentation, when the concentration of ethanol is still low, but later, these are replaced

primeras etapas de fermentación, cuando la concentración de etanol es aún baja, pero más tarde, éstas son reemplazadas por cepas de la especie *S. cerevisiae*, que muestra una mejor adaptación a las condiciones de vinificación, por ser más tolerantes al etanol y más competitivas para crecer en un medio con alta concentración de azúcares (Sabate *et al.*, 2002). La relación entre levaduras no-*Saccharomyces/Saccharomyces*, al principio de la fermentación puede contribuir a acentuar los cambios tanto químicos como sensoriales, que en parte son debidos al hecho de que las levaduras no-*Saccharomyces* pueden secretar una serie de enzimas (esterasas, glicosidasas, lipasas, β -glucosidasas, proteasas, celulasas, entre otras) que pueden interaccionar con los sustratos presentes en el medio mejorando algunas etapas del proceso de fermentación (Carrascosa *et al.*, 2005).

Las modernas tendencias en enología sugieren que las fermentaciones se lleven a cabo mediante inoculación de levadura seca activa (LSA) para evitar paradas de fermentación y asegurarse una homogeneidad en el vino final en las sucesivas vendimias (Esteve-Zarzoso *et al.*, 2001). Estas levaduras, normalmente se han seleccionado para fermentar mostos en países de climas más fríos. La inoculación de LSA tiene el inconveniente de que inhibe el crecimiento de las levaduras autóctonas presentes en la viña y en la maquinaria de la bodega. En algunos casos (Esteve-Zarzoso *et al.*, 2001) se han descrito problemas de imposición de las levaduras inoculadas, por lo que las levaduras autóctonas son las que han realizado la fermenta-

by strains of the *Saccharomyces cerevisiae* specie, which shows a better adaptation to the vinification conditions by being more tolerant to the ethanol and more competitive to grow in a media with high concentration of sugars (Sabate *et al.*, 2002). The relation between non-*Saccharomyces/Saccharomyces* yeasts at the beginning of the fermentation might contribute to increasing the chemical and sensorial changes, which in part are caused by the fact that non-*Saccharomyces* might segregate a couple of enzymes (esterases, glycosylate, lipases, β -glucosidasas, proteases, cellulases, among others) that might interact to the other substrates present in the media improving some phases of the fermentation process (Carrascosa *et al.*, 2005).

The modern trends in oenology suggest that fermentations that are carried out through inoculation of active dry yeasts (LSA) to avoid fermentation peaks and assure a homogeneity in the final wine in the successive sales (Esteve-Zarzoso *et al.*, 2001). These yeasts have been normally selected to ferment musts in colder countries. The inoculation of LSA has as inconvenient the exhibition of the growth of autochthonous yeasts present in the vineyard and in the machinery of the winery. In some cases (Esteve-Zarzoso *et al.*, 2001) some imposition problems of inoculated yeasts, therefore, the autochthonous yeasts are the ones which have fermented. These autochthonous yeasts can isolate in spontaneous fermentations, where non foreigners yeasts are added, showing a better

ción. Estas levaduras autóctonas se pueden aislar en fermentaciones espontáneas, donde no hay adición de levaduras foráneas, mostrando mejor adaptación a las condiciones de fermentación del mosto del cual fueron aisladas, por lo que pueden tener un elevado potencial enológico para su utilización en la inoculación de mostos de uva provenientes de climas tropicales. El objetivo del presente trabajo fue identificar y caracterizar éstas levaduras autóctonas, y emplearlas para la elaboración de vinos tropicales procedentes de la región zuliana, donde se han aislado y se supone están mejor adaptadas que las levaduras comerciales presentes en el mercado.

Materiales y métodos

Microvinificación espontánea de mosto de uva variedad Malvasía

Muestras durante el proceso de vinificación. El mosto de la variedad Malvasía se obtuvo en el Centro de Desarrollo Vitícola Tropical producto del prensado de las uvas correspondientes a la vendimia de mayo 2008, presentó 18,87 °Brix, una densidad de 1,081 g.mL⁻¹, pH de 3,31 y acidez titulable de 6,389 g.L⁻¹ de ácido tartárico. La microvinificación espontánea se realizó a una temperatura controlada de 17°C, empleando 25 L de mosto, sin adición de metabisulfito de sodio al inicio de la fermentación. Las muestras para los análisis microbiológicos y fisicoquímicos se tomaron por triplicado cada dos días durante la fermentación.

Análisis fisicoquímicos. El seguimiento de la fermentación de mosto se

adaptación to the fermentation conditions of the must, which were isolated, thus, these can have a high oenologic potential fermentation for its usage in the inoculation of musts of grape coming from tropical weathers. The main objectives of this research was to identify and characterize these autochthonous yeasts and employ them in the elaboration of tropical wines coming from Zulia, where have been isolated, and are supposed to be better adapted than commercial yeasts presented in the market.

Materials and methods

Spontaneous microvinification of the must of a Malvasía variety

Samples during the vinification process. The must of the Malvasía variety was obtained at the Centro de Desarrollo Vitícola Tropical, product of pressing of grapes corresponding to the sale done on may 2008, it presented 18.87 °Brix, a density of 1.081 g.mL⁻¹, pH of 3.31 and titratable acidity of 6.389 g.L⁻¹ of tartaric acid. The spontaneous micro-vinification was done at a controlled temperature of 17°C, employing 25 L of the must, without adding sodium metabisulphite at the beginning of the fermentation. The samples for the microbiological and physical-chemical analyses were taken by triplicate every two days during the fermentation.

Physical-chemical analysis. The following of the fermentation of must was done evaluating the content of soluble solids (°Brix) (COVENIN 924-83), the relative density (Madrid *et al.*, 2003) and the ethanol content (Leal *et*

realizó evaluando el contenido de sólidos solubles (°Brix) (COVENIN 924-83), la densidad relativa (Madrid *et al.*, 2003) y el contenido de etanol (Leal *et al.*, 2007). La acidez titulable (Amerine and Ought 1976) y el pH (COVENIN 1315-79) se determinaron a principio y a final del proceso de vinificación.

Análisis microbiológicos. Se realizó recuento directo de células de levaduras al microscopio y de la población de levaduras viables cultivables en agar YEPD (20 g.L⁻¹ de glucosa, 20 g.L⁻¹ de peptona, 10 g.L⁻¹ de extracto de levadura y 15 g.L⁻¹ de agar) y agar Sabouraud con Cloranfenicol (Himedia) (COVENIN 1337-90). Las placas se incubaron a 28°C durante cinco días, se seleccionaron las colonias morfológicamente diferentes de ambos medios, las cuales fueron repicadas en tubos conteniendo agar YEPD y Sabouraud inclinado hasta su utilización.

Identificación y caracterización de las levaduras aisladas.

Una vez aisladas las levaduras se procedió a la identificación por métodos moleculares. La identificación a nivel de especie se realizó mediante la amplificación y restricción de una región del rADN, Guillamón *et al.*, (1998) y Esteve-Zarzoso *et al.*, (1999) utilizando un PCR Peltier Thermal System ptc-100 (MI, USA). Se aplicó esta técnica a la cepa de referencia de *S. cerevisiae* ATCC 4921 con el fin de llevar un control interno de optimización de la técnica en el laboratorio. Sólo de caracterizaron las cepas pertenecientes a la especie *S. cerevisiae*, se utilizó el análisis de restricción del ADN mitocondrial con el enzima *Hinf* I (Querol *et al.*, 1992). Las enzimas de restricción y marcadores empleados pertenecen a Promega (Madison, USA)

al., 2007). The titratable acidity (Amerine and Ought 1976) and pH (COVENIN 1315-79) were determined at the beginning and end of the vinification process.

Microbiological analysis. A direct count of yeasts cells was done using a microscope and of the sowed viable yeasts population in agar YEPD (20 g.L⁻¹ de glucose, 20 g.L⁻¹ de peptone, 10 g.L⁻¹ of yeasts extract 15 g.L⁻¹ of agar) and Sabouraud agar with chloramphenicol. (Himedia) (COVENIN 1337-90). The plates were incubated at 28°C, for five days, the morphological different colonies were selected in both media, which were pricked in tubes with agar YEPD and Sabouraud inclined until its usage.

Identification and characterization of isolated yeasts.

Once isolated the yeasts was proceeded to the identification by molecular methods. The identification at the specie level was done amplifying and restricting a rDNA area (Guillamón *et al.*, 1998, and Esteve-Zarzosi *et al.*, 1999), using a PCR Peltier Thermal System ptc-100 (MI, USA). This technique was applied to the reference strain *S. cerevisiae* ATCC 4921 with the aim of carrying an internal control of the technique's optimization in the laboratory. Only the strains coming from the *S. cerevisiae* specie were characterized, the mitochondrial DNA restriction analysis with the *Hinf* I enzyme was used (Querol *et al.*, 1992). The restriction enzymes and markers used belong to Promega (Madison, USA) and were applied according to the indications of the maker. The restriction fragments obtained in any

y se aplicaron de acuerdo a indicaciones del fabricante. Los fragmentos de restricción obtenidos en cualquiera de las dos metodologías aplicadas se separaron en geles de agarosa (3% para los fragmentos de PCR y 1% para el ADN mitocondrial) en TBE 1X, revelados con bromuro de etidio y fotografiados bajo luz ultravioleta.

Resultados y discusión

El mosto de uva fermentó a temperatura constante de 17°C durante 26 días, durante los cuales se tomaron muestras por triplicado cada dos días desde el inicio hasta el final de la fermentación, lo que representó un total de 14 muestras. El vino obtenido mostró 6,40 °Brix, un pH de 3,40, la acidez titulable de 5,953 g.L⁻¹ de ácido tartárico y un contenido de etanol de 11% v/v.

Cinética de fermentación espontánea de población de levaduras. En la figura 1 se presenta la evolución del contenido de etanol producido y la población de levaduras durante la fermentación del mosto de uva de la variedad Malvasía. La fermentación, a pesar de no ser inoculada parte con poblaciones de levaduras elevadas (superiores a 10⁶ células.mL⁻¹), aunque la producción de etanol no se observó hasta el día 4 de fermentación, a partir del cual se produjo en un ritmo más o menos constante hasta el día 18, en el que se ralentiza hasta que el día 26 alcanzó su máximo a 11% vv⁻¹. Dependiendo del método elegido para seguir la población de levaduras se observó que el proceso fermentativo comenzó rápidamente con inóculos 10⁷ células mL⁻¹ en el caso de la observación microscópica, mien-

of the applied methodologies were divided in agarose gels (3% for PCR fragments and 1% for mitochondrial DNA in TBE 1X, revealed with ethidium bromide and photographed under ultraviolet light.

Results and discussion

The grape must was fermented at a constant temperature of 17°C for 26 days, out of which were taken sampled by triplicate every two days from the beginning to the end of the fermentation, which represented a total of 14 samples. The wine obtained showed 6.40 °Brix, a pH of 3.40, titratable acidity of 5.953 g.L⁻¹ of tartaric acid and an ethanol content of 11% v/v.

Spontaneous fermentation kinetic of the yeasts population. In figure 1 is shows the evolution of the produced ethanol content and the yeasts population during the fermentation of the Malvasía grape must. Fermentation, though of not being inoculated, has elevated yeasts populations (superior to 10⁶ cells.mL⁻¹), though the ethanol production is not observed until day 4 of fermentation, after which is produced a more constant rhythm until day 18, where the process gets slow until day 26, where it reaches was maximum at 11% vv⁻¹. Depending on the method chosen to follow the yeasts population, was observed that the fermentation process rapidly starts with inoculums 10⁷ cells.mL⁻¹ in the case of the microscope observation, while in plates these values reduce until 10⁶ cells.mL⁻¹ using YPD and 2x10⁶ cells.mL⁻¹ using Saboraud agar. The first growing

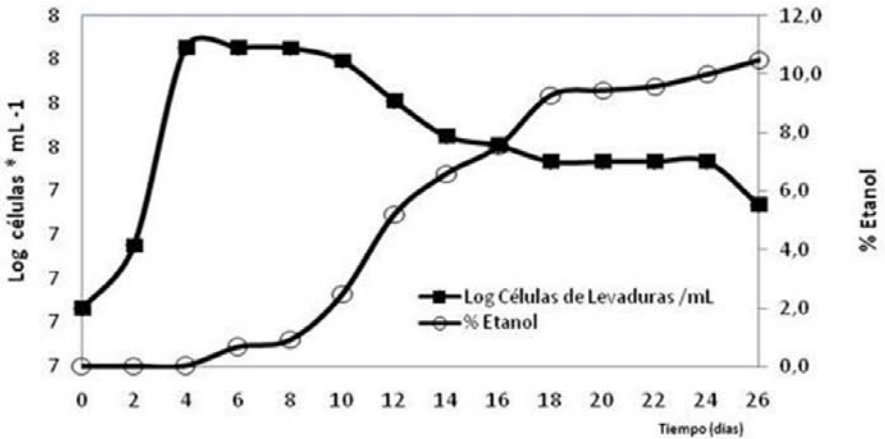


Figura 1. Evolución del etanol producido y de la población de levaduras durante la fermentación espontánea del mosto de uva de la variedad de uva Malvasía.

Figure 1. Evolution of the ethanol produced and the yeasts population during the spontaneous fermentation of Malvasía grape's must.

tras que en placa estos valores se reducen hasta 10^6 células. mL^{-1} utilizando YPD y 2×10^6 células. mL^{-1} utilizando agar Sabouraud. La primera etapa de crecimiento duró dos días y produjo un aumento de la población de levaduras (10^8 células. mL^{-1}), independientemente de la técnica, para estudiar la población levadurifome presente. A partir del día 4, la curva de crecimiento de las levaduras entró en una fase estacionaria, donde no sólo no hubo un aumento en la población de levaduras, sino que se observó una disminución en la población analizada, aunque las células fueron metabólicamente activas porque se continuó observando un aumento en el etanol presente en el medio.

Población total de levaduras durante la fermentación espontánea en medios de cultivo YEPD y Sabouraud.

phase lasted for 2 days and produced an increment of the yeast's population (10^8 cells. mL^{-1}), independently of the technique to study the yeast population present. After day 4, the grow curve of yeasts entered into a stationary phase, where there was not only an increment in the population of yeasts but also, a reduction in the analyzed population, though the cells were metabolically active because were still observed in the ethanol presented in the media.

Total population of yeasts during the spontaneous fermentation in culture media of YEPD and Saboraud. In figure 2 are presented the population results of yeasts during 26 days of fermentation in the microscope and in the culture media. The data obtained from both culture media show a similar behavior, which was

En la figura 2 se presentan los resultados de la población de levaduras durante los 26 días de fermentación tanto al microscopio como utilizando ambos medios de cultivo. Los datos obtenidos de los dos medios de cultivo mostraron un comportamiento similar, lo cual era de esperarse, ya que fueron medios de cultivo generales empleados para el crecimiento de levaduras, y la presencia del antibiótico cloranfenicol no afectó al crecimiento de levaduras. Pero si se comparan los resultados obtenidos desde cualquiera de los medios de cultivo, con los obtenidos por observación en fresco de las muestras, sí que se ve una ligera diferencia de un orden de magnitud, en todos los puntos

expected, since the general culture media employed for growing the yeasts and the presence of the antibiotic chloramphenicol, do not affect the growth of yeasts. But if the results obtained from any of the culture media were compare to the obtained by observation of the samples, there was a slightly difference of a magnitude order, in all points except in the maximum point of yeasts' growth. Thus, the presence of yeasts at a microscope level in the initial point is approximately of 10^7 cells.mL⁻¹, while, the plate values were 10% lower, though these differences were lower when get closer to the maximum growth point (4 days), the differences

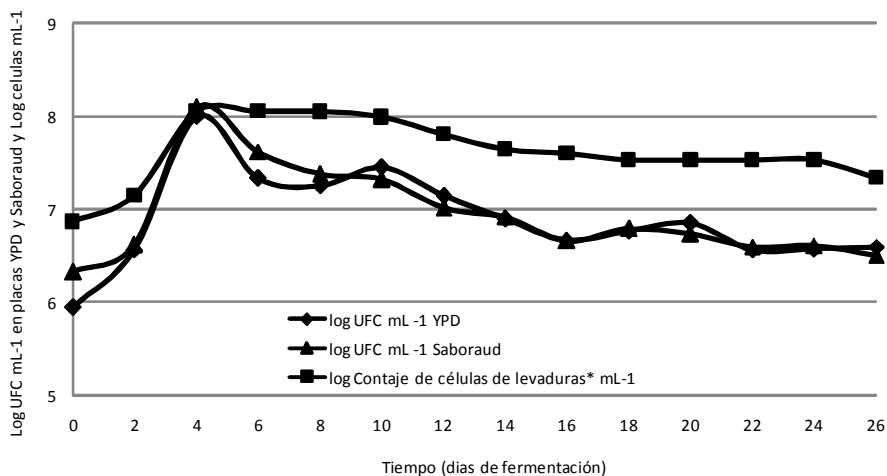


Figura 2. Evolución de la población de levaduras mediante recuento de células de levaduras al microscopio y UFC en placas YEPD y agar Sabouraud durante la fermentación espontánea.

Figure 2. Population evolution of yeasts using a cell's count of yeasts in the microscope and UFC in YED plates and Sabouraud agar during the spontaneous fermentation.

excepto en el punto máximo de crecimiento de levaduras. Así la presencia de levaduras a nivel microscópico en el punto inicial fue alrededor de 10^7 cells.mL⁻¹, mientras que los valores de placa fueron un 10% menores, aunque estas diferencias fueron menores conforme se fue acercando al punto máximo de crecimiento (4 días), las diferencias se volvieron a marcar a partir de este punto, donde se observó una diferencia de una unidad logarítmica o más entre los medios de cultivo y el microscopio. Esto demuestra que la lectura en placa sólo mostró la población de levaduras viables cultivables mientras que en la observación en fresco al microscopio se contaron todas las células de levaduras, es decir, tanto las metabolitamente activas como las inactivas, o lo que algunos autores consideraron tanto vivas como muertas (Carrascosa *et al.*, 2005).

Identificación de levaduras aisladas. En primer lugar se confirmó que la técnica molecular aplicada en el laboratorio para la identificación de levaduras, fue correcta. El tamaño de los productos amplificados y perfiles de restricción obtenidos para la especie certificada de *S. cerevisiae* ATCC 4921 coincidieron con los descritos por Guillamón *et al.*, (1998) y Esteve-Zarzoso *et al.*, (1999) para la especie *S. cerevisiae*.

De la fermentación espontánea se aislaron e identificaron 134 colonias, en muestreos realizados cada dos días durante los 26 días de duración de la fermentación. Después de la extracción del ADN y la amplificación por PCR de la región ribosomal 5.8S-ITS, los productos PCR mostraron tamaños que varieron de 640 hasta 880 pb (cuadro

continue evidencing after this point, where was observed a differenced of a logarithmic unit or more among the culture media and the microscope. This proves that the reading in the plate only shows the population of viable cultivable yeasts while in the observation in fresh is counted all the cells of yeasts, that was, the metabolically active or inactive, or what some authors consider alive or death (Carrascosa *et al.*, 2005).

Identification of isolated yeasts. First on all, was confirmed that the molecular technique applied in the laboratory for identifying the yeasts was correct. The size of the amplified products and restriction profiles obtained for the certified specie of *S. cerevisiae* ATCC 4921 agree to those described by Guillamón *et al.*, (1998) and Esteve-Zarzoso *et al.*, (1999) for the specie *S. cerevisiae*.

In the spontaneous fermentation were isolated and identified 134 colonies, in isolated sampling every two days for 26 days of fermentation. After extracting the DNA and amplifying the PCR of the ribosomal region 5.8S-ITS, the PCR products showed sizes that vary from 640 to 880 pb (table 1). These PCR products were combined to the restriction enzyme *Hinf* I, *Hae*III, *Cfo*I, obtaining fragments of specific specie. The species of the *Hanseniasspora* genre were also submitted to the restriction with the enzyme *Dde*I to differentiate among the species of *H. uvarum* and *H. guilliermondii* (table 1).

In figure 3 are shown the four different restriction patterns and after being compared the molecular mass to the previously described by Esteve-

Cuadro 1. Levaduras aisladas e identificación de acuerdo a longitud en pares de base (pb) de la región amplificada del gen 5.8S-ITS por PCR y fragmentos obtenidos después de la digestión con enzimas de restricción.

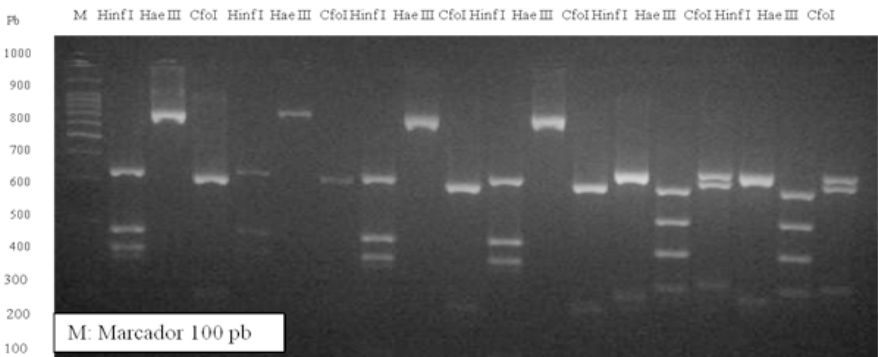
Table 1. Isolated yeasts and identification according to the longitude in pares (pb) on the amplified region of the gen 5.8S-ITS by PCR and fragments obtained after the digestion with restriction enzymes.

Especie de levadura	Producto PCR (pb)	Fragmentos de restricción			
		<i>Hinf</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Cfo</i> I	<i>Dde</i> I
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	640	340+225+75	425+215	320+240+80	
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	750	350+200+180	750	320+310+105	300+180+95+90+85
<i>H. guilliermondii</i>	750	350+200+180	750	320+310+105	380+180+95+80
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	880	365+155	320+230+180+150	385+365	

1). Estos productos de PCR fueron digeridos con las enzimas de restricción *Hinf*I, *Hae*III, *Cfo*I, obteniendo fragmentos especie específico. Las especies del género *Hanseniaspora* además se sometieron a la restricción con la enzima *Dde*I para diferenciar entre las especies de *H. uvarum* y *H. guilliermondii* (cuadro 1).

En la figura 3 se muestran los cuatro patrones de restricción diferentes, y después de ser comparados las masas moleculares con los previamente descritos por Esteve-Zarzoso *et al.*, (1999), se identificaron como *H. uvarum*, *H. guilliermondii*, *R. mucilaginosa* y *S. cerevisiae*. De los

Zarzoso *et al.*, (1999), were identified as *H. uvarum*, *H. guilliermondii*, *R. mucilaginosa* and *S. cerevisiae*. From the 134 isolated, the *S. cerevisiae* specie was the one that showed a higher presence, with 75% of the total of isolated. The rest of the isolated species, the representative of the *Hanseniaspora* genre, are the ones with major presence, from which 4% belong to the *H. uvarum* specie and 20% to the *H. guilliermondii*. Finally, the specie with less presence in the spontaneous fermentation was *R. mucilaginosa* (1%) with a total of six isolated. During the firsts 4 days of fermentation, the must of the Malvasía



Las columnas 2-13 muestran el fragmento de restricción correspondiente al género *Hanseniaspora uvarum* ó *H. guilliermondii*. Las columnas 14 y 19 corresponden a la especie *Saccharomyces cerevisiae*. El marcador de masa molecular (M) muestra una banda cada 100 pb, siendo la banda de 600 pb el doble de intensa que el resto.

Figura 3. Gel de agarosa al 3% en el que se observan los fragmentos de restricción con las enzimas *Hinf*I, *Hae* III y *Cfo*I de dos de las especies aisladas durante la fermentación espontánea de la variedad de uva Malvasía.

Figure 3. Agar gel at 3%, where are observed the restriction fragments with enzymes *Hinf*I, *Hae* III and *Cfo*I of both of the isolated species during the spontaneous fermentation of Malvasía variety grape.

134 aislados, la especie *S. cerevisiae* fue la que mostró una mayor presencia, con un 75% del total de aislados. El resto de las especies aisladas, los representantes del género *Hanseniaspora* fueron las mayoritarias, de las cuales un 4% pertenecieron a la especie *H. uvarum* y un 20% a la especie *H. guilliermondii*. Por último, la especie con menor presencia en la fermentación espontánea fue *R. mucilaginosa* (1%), con un total de seis aislados.

Durante los 4 primeros días de fermentación el mosto de la variedad de uva Malvasía (figura 4) presentó la mayor diversidad de especies de leva-

grape (figure 4) presented the highest diversity of non-*Saccharomyces* yeasts in all the research. Two yeasts species *H. uvarum* (96%) and *R. mucilaginosa* (4%) were present the day zero of the fermentation in the fresh must. It can be inferred that most of these species are in the grapes' skin. These results agree to the researches done in musts in spontaneous fermentations of different varieties of vinification grapes (Fernández *et al.*, 1999; Povhe *et al.*, 2001; Beltran *et al.*, 2002; Clemente *et al.*, 2004; Combina *et al.*, 2005; Di Maro *et al.*, 2007; Zott *et al.*, 2008; Barajón *et al.*, 2009, Chavan *et al.*, 2009, Domizio *et al.*, 2009). Non-

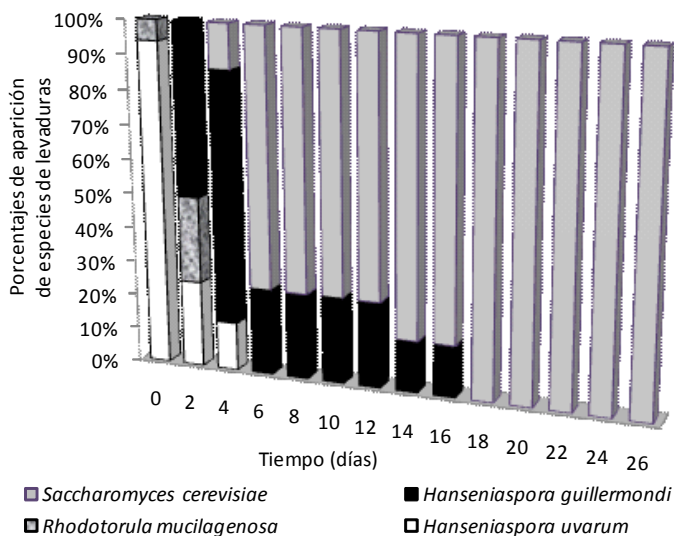


Figura 4. Evolución de las especies de levaduras durante la fermentación espontánea de la variedad de uva Malvasía. Se representa el porcentaje de cada una de las especies encontradas en los días del muestreo.

Figure 4. Evolution of the yeasts species during the spontaneous fermentation of the Malvasía grape. The percentage of each of the species found during sampling is presented.

duras no-*Saccharomyces* de todo el estudio. Dos especies de levaduras *H. uvarum* (96%) y *R. mucilaginosa* (4%) estuvieron presentes el día cero de fermentación, en el mosto fresco. Esto puede llevar a pensar que estas especies se encontraron de manera mayoritaria en la piel de las uvas. Estos resultados concordaron con investigaciones realizadas en mostos en fermentaciones espontáneas de diferentes variedades de uvas de vinificación (Fernández *et al.*, 1999; Povhe *et al.*, 2001; Beltran *et al.*, 2002; Clemente *et al.*, 2004; Combina *et al.*, 2005; Di Maro *et al.*, 2007; Zott *et al.*, 2008; Barajón *et al.*, 2009, Chavan *et al.*, 2009, Domizio *et al.*, 2009). Las levaduras no-*Saccharomyces*, principalmente el género *Hanseniaspora*, fueron las levaduras responsables de la transformación de los azúcares en alcohol durante las primeras etapas de la fermentación, además de aportar beneficios en cuanto a aromas al vino. En esta fase de la fermentación, no es habitual encontrar levaduras pertenecientes a la especie *S. cerevisiae*. Esta especie de levaduras ha sido poco aislada de uvas, y en los casos en los que se ha aislado siempre ha sido previo un paso de enriquecimiento (Martini and Vaughan-Martini, 1990). Hay trabajos en los que sí se aísla esta levadura durante los primeros días de fermentación, pero en muchos casos es debido al paso por las instalaciones de la bodega del mosto, donde es contaminado con la flora residente en la maquinaria de la misma. Beltran *et al.*, (2002) observaron que durante los primeros años de funcionamiento de una bodega nueva, no se aislaron apenas cepas de *S. cerevisiae* durante los pri-

Saccharomyces yeasts, mainly those of *Hanseniaspora* genus, are the yeasts responsible of transforming sugar in alcohol during the first phases of fermentation, besides of providing benefits regarding the aroma of the wine. In this phase of fermentation, is not common to find yeasts from the *S. cerevisiae* specie. This specie of yeasts has not been well isolated from grapes, and in the cases that it has been isolated it has always been prior to a enrichment step (Martini and Vaughan-Martini, 1990). There are researches where this yeast was isolated during the first fermentation days, but in many cases it was due to the transportation of the must from the vineyard, where it was contaminated to the resident flora in the machinery. Beltran *et al.*, (2002), observed that during the first functioning years of a new vineyard, strains of *S. cerevisiae* were not isolated, but in successive years it presented an implementation of a resident strain in the machinery of the vineyard during some harvest. During the second day of fermentation (figure 4) coexisted in the must the species *H. guilliermondii* (50%), *H. uvarum* (25%) and *R. mucilaginosa* (25%). But after the fourth day of fermentation predominates *H. guilliermondii* (73%), reducing the presence of *H. uvarum* (14%), and for the first time appears *S. cerevisiae* (13%). Between days six and twelve of fermentation, there is a reduction of yeasts of *H. guilliermondii* specie (25%) and *S. cerevisiae* (75%) stands in the fermentation, likewise, between days 14 and 16 *H. guilliermondii* reduced (15%), while *S. cerevisiae* increases

meros días de fermentación, pero en años sucesivos se presentó una implantación de una cepa residente en la maquinaria de la bodega durante varias vendimias.

Durante el segundo día de fermentación (figura 4), coexistieron en el mosto las especies *H. guilliermondii* (50%), *H. uvarum* (25%) y *R. mucilaginosa* (25%). Pero, a partir del cuarto día de fermentación predomina *H. guilliermondii* (73%), disminuyendo la presencia de *H. uvarum* (14%), y aparece por primera vez *S. cerevisiae* (13%). Entre los días seis y 12 de fermentación hubo disminución de las levaduras de la especie *H. guilliermondii* (25%) y se impone cada vez más en la fermentación *S. cerevisiae* (75%), de igual manera entre los días 14 al 16 *Hanseniaspora guilliermondii* disminuyó sensiblemente (15%), mientras que *Saccharomyces cerevisiae* aumenta (85%), imponiéndose totalmente (100%) *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación espontánea a partir del día 18 hasta el final de la misma.

La cinética de las principales especies de levaduras durante el proceso de fermentación espontánea (figura 5) reveló que diferentes especies de levaduras coexistieron durante los primeros cuatro días de fermentación. Aunque los estudios realizados sobre las levaduras que aparecieron en las primeras fases de la fermentación revelaron siempre una elevada presencia de *H. uvarum*, en este trabajo se ha demostrado una elevada presencia de otra especie del mismo género, *H. guilliermondii*. Ambas especies mostraron una gran similitud, tanto en los resultados obtenidos por métodos fisio-

(85%), standing (100%) *S. cerevisiae* in the spontaneous fermentation after day 18 until the end.

The kinetic of the main species of yeasts during the spontaneous fermentation process (figure 5) reveals that different species of yeasts coexisted during the first four days of fermentation. Though the researchers done on yeasts that appear on the first phases of fermentation always show an elevated presence of *H. uvarum*, in this research had been proved an elevated presence of other species of the same genre, *H. guilliermondii*. Both species show a big similarity in the results obtained by physiological identification methods and molecular methods (Esteve-Zarzoso *et al.*, 2001). For this reason, with the development of the molecular identification techniques, the obtained results were more accurate than the results obtained with the classic methods, where the results not too precise. This diversity on the biodiversity of yeasts was dramatically reduced when the high concentration of ethanol 7-8% v/v was reached. Populations of *R. mucilaginosa* were very low until 10^2 UFC mL⁻¹ followed by a fast disappearance of these yeasts, since they are oxidant yeasts more than fermentative and do not stand high concentrations of sugars and had a low pH of the must, therefore, they decreased. The apparition of these yeasts during the first days of fermentation might be due to this specie of yeast was a habitual environmental polluter, but its effect in oenology conditions should not be too important. The population's behavior of *Hanseniaspora* caused a fast decrease and disappearance of

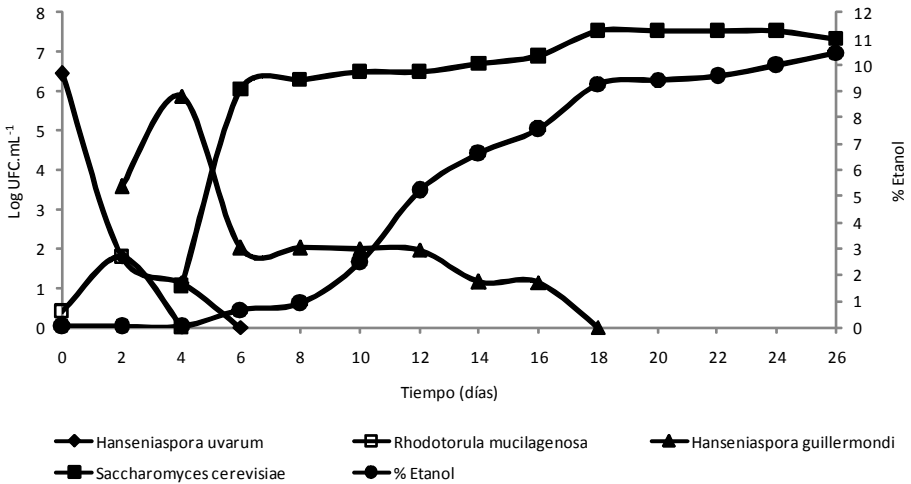


Figura 5. Crecimiento de las principales especies de levaduras y producción de etanol durante la fermentación espontánea de la variedad de uva Malvasía.

Figure 5. Growth of the main yeasts species and ethanol production during the spontaneous fermentation of Malvasía grape.

lógicos de identificación como por métodos moleculares (Esteve-Zarzoso *et al.*, 2001). Por este motivo, con el desarrollo de las técnicas moleculares de identificación los resultados obtenidos tienen mayor fiabilidad que las identificaciones obtenidas con los métodos clásicos, en los que los resultados muchas veces llevaban identificaciones un poco dudosas. Esta diversidad en la biodiversidad de levaduras fue dramáticamente reducida cuando la alta concentración de etanol 7-8% v/v fue alcanzada. Las poblaciones de *R. mucilagenosa* fueron muy bajas de hasta 10^2 UFC.mL⁻¹ seguido de una rápida desaparición de estas levaduras debido a que son levaduras oxidativas más que fermentativas, no soportan elevadas concentraciones de azúcares y pH bajo del mosto por lo que decli-

these species during the first week of fermentation. *Hanseniaspora guilliermondii* was one of the yeast species which proliferated in populations from 10^3 - 10^6 during days two and four and experienced a strong decrease after day six, when appear the first traces of ethanol in the must. However, it remained in the must until fully dominate the alcoholic fermentation and the continuous survival of these species until the total consumption was observed, and this result agrees to diverse researches done by Povhe *et al.* (2001); Beltran *et al.* (2002); Clemente *et al.* (2004); Combina *et al.* (2005) and Di Maro *et al.* (2007); Zott *et al.* (2008); Barajón *et al.* (2009) and Chavan *et al.* (2009).

The species of yeasts posed during all the fermentation process was *S.*

nan. La aparición de estas levaduras durante los primeros días de fermentación puede ser debido a que esta especie de levaduras es un contaminante ambiental habitual, pero su efecto en condiciones enológicas no debe ser muy importante. El comportamiento de las poblaciones de *Hanseniaspora* rápido declive y desaparición de estas especies durante la primera semana de la fermentación. *H. guilliermondii* fue una de las especies de levaduras que proliferó de poblaciones entre 10^3 - 10^6 durante los días dos a cuatro y experimentó un fuerte declive a partir del día seis, cuando aparecieron las primeras trazas de etanol en el mosto. Sin embargo, permaneció en el mosto hasta dominar por completo la fermentación alcohólica y la continúa sobrevivencia de estas especies hasta el consumo total de los azúcares fue observado y coincidió con numerosos estudios recientes realizados por Povhe *et al.* (2001); Beltran *et al.* (2002); Clemente *et al.* (2004); Combina *et al.* (2005) y Di Maro *et al.* (2007); Zott *et al.* (2008); Barajón *et al.* (2009) y Chavan *et al.* (2009).

La especie de levaduras que se impuso durante todo el proceso de fermentación fue *S. cerevisiae*, pero la técnica de amplificación y restricción del rADN no fue capaz de diferenciar cepas de la misma especie, fue necesario aplicar otra técnica que permitiera diferenciar entre cepas, con el fin de determinar si existían varias cepas de *S. cerevisiae* o era la misma. Para ello se realizó un análisis de restricción del ADN mitocondrial con la enzima *Hinf* I de todas las colonias identificadas como *S. cerevisiae* se obtuvo un único patrón de restricción. En la figura 6

cerevisiae, but the amplification and restricted technique of rDNA was not capable of differentiating strains of the same species, thus, it was necessary to apply other technique that would allow differentiating among strains, with the aim of determining if there were different strains of *S. cerevisiae* or it was the same. For this, a restricted analysis of the mitochondrial DNA with the enzyme *Hinf* I of all the colonies identified as *S. cerevisiae* was obtained a unique restriction patter. In figure 6 are shown the different strains of *S. cerevisiae* at the beginning (day 4), the middle (day 16) and final (days 22 and 24) of the fermentation, as can be seen all the analyzed colonies have the same pattern, which indicates that it was the same strain yeast the one that appeared at the beginning of the fermentation and had been capable of finishing the sugars presented.

The spontaneous fermentations had always proved a high diversity degree of strains of *S. cerevisiae* specie, Querol *et al.* (1992) described in a spontaneous fermentation a high diversity of strains of this specie during all the fermentation process, even in the final phases. The modern trends in oenology had suggested an inoculation with active dry yeast to assure the beginning and final phase of fermentation, as well as homogeneity in the final product harvest after harvest. At the same time, some authors (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999) had studied the behavior of commercial inoculums in fermentations, observing that not all the inoculated yeasts behave the same way, thus, were found that some commercial yeasts did not

se muestran diferentes cepas de *S. cerevisiae* al inicio (día 4), la mitad (día 16) y al final (días 22 y 24) de la fermentación, como se puede ver todas las colonias analizadas presentaron el mismo patrón, lo cual indicó que se trataba de la misma cepa de levadura la que apareció a principio de fermentación y fue capaz de acabar los azúcares presentes.

Las fermentaciones espontáneas han mostrado siempre un alto grado de diversidad de cepas de la especie *S. cerevisiae*, Querol *et al.*, (1992) describieron en una fermentación espontá-

pose on the wild yeasts of the must. In this matter, the isolation and characterization of autochthonous yeasts of every producer wine area was a good tool to assure the quality of the final product, since yeasts of the area are already adapted to the conditions of the must, presenting an ecological advantage towards the commercial, that are normally from other geographical areas.

During the spontaneous fermentation, has been observed a high proportion of non-*Saccharomyces* yeast during the first days of fermentation.

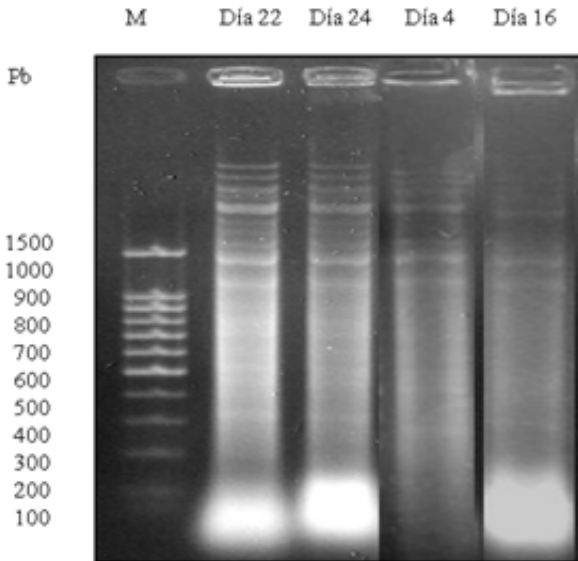


Figura 6. Patrón de restricción con la enzima *Hinf I* del ADN mitocondrial de cepas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* desarrolladas durante días de fermentación inicial (día 4), intermedio (día 16) y final (días 22 y 24) para la variedad de uva Malvasía. M: marcador de 100 pb.

Figure 6. Restriction pattern with the enzyme *HINF I* of the mitochondrial DNA of yeasts strains *Saccharomyces cerevisiae* developed during the initial fermentation (day 4), intermediate (day 16) and final (days 22 and 24) for the variety of Malasia grape. M: markers of 100 pb.

nea una alta diversidad de cepas de esta especie durante todo el proceso de fermentación, hasta incluso en las fases finales. Las modernas tendencias en enología han apuntado siempre hacia una inoculación con una levadura seca activa para asegurar el inicio y final de la fermentación, así como una homogeneidad en el producto final vendimia tras vendimia. Pero al mismo tiempo, algunos autores (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999) han estudiado el comportamiento de los inóculos comerciales en fermentaciones, observándose que no todas las levaduras inoculadas se comportaron de la misma manera, así se encontró que algunas levaduras comerciales no llegaron a imponerse sobre las levaduras silvestres de los mostos. En este sentido el aislamiento y caracterización de levaduras autóctonas de cada zona productora de vinos es una buena herramienta para asegurar la calidad del producto final, ya que las levaduras de la zona ya están adaptadas a las condiciones del mosto, por lo que presentan una ventaja ecológica frente a las comerciales, que normalmente son de otras zonas geográficas.

Durante la fermentación espontánea se ha observado una alta proporción de levaduras no *Saccharomyces* durante los primeros días de fermentación. Estas levaduras, que hasta hace poco se han considerado dañinas en una fermentación, pueden producir algunos enzimas que potencien los aromas varietales, por lo que su desarrollo en las primeras fases de fermentación podría ser interesante. Recientemente, Andorrà *et al.*, (2010) han realizado un trabajo en el que se realizan fermentaciones con

These yeasts were considered harmful in fermentation, can produce some enzymes that strength the varied aromas, thus the development in the first phases of fermentation might be interesting. Recently, Andorrà *et al.*, (2010) have carried out a research where they perform fermentations with yeasts' inoculums of the species *S. cerevisiae*, *H. uvarum* and *Candida zemplinina* (previously classified as *Candia stellata*). These authors have found that wines obtained with the mixes of species produced wines with more interesting aromatic profiles than those produced with *S. cerevisiae*.

For all this, the selection of yeast has to be a habitual practice in wine sectors, since the usage of inoculums coming from other areas might pose on the natural microbiota of the area. Also, the inoculation must be done in a way that allows the natural microbiota of the grape to express, like this, the final wines can show greater types.

Conclusions

Populations of isolated yeasts during the spontaneous fermentation were similar in both culture media, Saboraud and YEPD. Since the YEPD media was 24% more expensive than media Saboraud, it is more convenient to use the latter during the follow up of yeasts' populations in the fermentation.

The yeasts' identification method by amplification and restriction of the ribosomal fragment 5.8S-ITS has optimized in the laboratory with satisfactory results in the reference strains and colonies isolated of the nature.

inóculos de levaduras pertenecientes a las especies *S. cerevisiae*, *H. uvarum* y *Candida zemplinina* (previamente clasificada como *Candia stellata*). Estos autores han encontrado que los vinos obtenidos con las mezclas de las especies producían vinos con perfiles aromáticos que fueron más interesantes que aquellos producidos sólo con la especie *S. cerevisiae*.

Por todo esto, la selección de levaduras debe ser una práctica habitual en zonas vitivinícolas nuevas, ya que el uso de inóculos procedentes de otras zonas puede que se lleguen a imponer sobre la microbiota natural de la zona. Al igual que la inoculación debe ser realizada de manera que permita que se exprese la microbiota natural de la uva, así podrán mostrar los vinos finales una mayor tipicidad.

Conclusiones

Las poblaciones de levaduras aisladas durante la fermentación espontánea fue similar en ambos medios de cultivo, Sabouraud y YEPD. Debido a que el medio YEPD fue 24% más costoso que el medio Sabouraud, es más conveniente utilizar este último durante el seguimiento de poblaciones de levaduras en la fermentación.

El método de identificación de levaduras por la amplificación y restricción del fragmento ribosomal 5.8S-ITS se ha optimizado en el laboratorio, dando resultados satisfactorios, tanto con cepas de referencia como con colonias aisladas de la naturaleza.

Cuatro especies de levaduras fueron aisladas e identificadas durante la fermentación espontánea de la varie-

Four species of yeasts were isolated and identified during the spontaneous fermentation of the Malvasía grape variety. *H. uvarum*, *R. mucilaginosa*, *H. guilliermondii* and *S. cerevisiae*. From all these, *S. cerevisiae* posses totally.

The differentiation of strains of *S. cerevisiae* specie by the mitochondrial DNA restriction technique with *Hinf*I enzymes, have caused satisfactory results for the isolated strains during the spontaneous alcoholic fermentation.

In the *S. cerevisiae* specie, was only detected the presence of one strain, which was responsible of ending the alcoholic fermentation.

End of english version

dad de uva Malvasía *H. uvarum*, *R. mucilaginosa*, *H. guilliermondii* y *S. cerevisiae*. De todas ellas la especie *S. cerevisiae* se impuso totalmente.

La diferenciación de cepas de la especie de *S. cerevisiae* por la técnica de la restricción del ADN mitocondrial con el enzima *Hinf*I, ha dado resultados satisfactorios para las cepas aisladas durante la fermentación alcohólica espontánea.

Dentro de la especie *S. cerevisiae*, sólo se detectó la presencia de una cepa, que fue la responsable de la finalización de la fermentación alcohólica.

Literatura citada

Amerine, M. y C. Ough. 1976. Análisis de vinos y mostos. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 159 p.

- Andorra, I., M. Berradre, N. Rozès, A. Mas, J. Guillamón, y B. Esteve-Zarzoso. 2010. Effect of pure and mixed cultures of main wine yeast species on grape must fermentations. *Eur. Food Res. Technol* 231:215-224.
- Barrajón, N., M. Arévalo-Villena., L. Rodríguez-Aragón y A. Briones. 2009. Ecological study of wine yeast in inoculated vats from La Mancha region. *Food Control* 20:778-783.
- Beltran, G., M. Torija, M. Novo, N. Ferrer, M. Poblet, J. Guillamón, N. Rozès y A. Mas. 2002. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: A six year follow-up study. *Syst. Appl Microbiol.* 25:287-293.
- Carrascosa, A., R. Muñoz y R. González. 2005. *Microbiología del vino*. Primera Edición. A. M. Vicente (Ed.). España. 398 p.
- Chavan, P., S. Mane, G. Kulkarni, S. Shaikh, V. Ghormade, D.P. Nerkar, Y. Shouche y M.V. Deshpande. 2009. Natural yeast flora of different varieties of grapes used for wine making in India. *Food Microbiol.* doi: 10.1016/j.fm.2009.05.005.
- Clemente, J., L. Mingorance, S. Martínez, F. Las Heras y F. Rodríguez. 2004. Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiol* 21:49-155.
- Combina, M., A. Elía, L. Mercado, C. Catania, A. Ganga y C. Martinez. 2005. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *Int. J. Food Microbiol* 99:237-243.
- Di Maro, E., D. Ercolini y S. Coppola. 2007. Yeast dynamics during spontaneous fermentation of the Catalanesca grape. *Int. J. Food Microbiol* 117: 201-210.
- Domizio, P., I. Manazzu y M. Ciani. 2009. Impact of mother sediment on yeast growth, biodiversity, and ethanol production during fermentation of Vinsanto wine. *Int. J. Food Microbiol* 129: 83-87.
- Esteve-Zarzoso, B., C. Belloch., F. Uruburu y A. Querol. 1999. Identification of yeast by RFLP analysis of the 5,8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol* 49:329-337.
- Esteve-Zarzoso, B., M.J. Peris-Toran, D. Ramón y A. Querol. 2001. Molecular characterisation of *Hanseniaspora* species. *Antonie van Leeuwenhoek* 80:85-92
- Fernández, M., J. Ubeda y A. Briones. 1999. Comparative study of non-*Sachharomyces* microflora of musts in fermentation, by physiological and molecular methods. *FEMS Microbiol. Let.* 173:223-229.
- Guillamón, J., J. Sábate, E. Barrio, J. Cano y A. Querol. 1998. Rapid identification of wine yeast species base on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch. Microbiol* 169:387-392.
- Leal, I., R. Miquelena y H. Morán. 2007. Evaluación del proceso de destilación del cocuy de pecaya a partir de la composición de los volátiles mayoritarios. *Multiciencias* 2:81-189.
- Madrid, J., V. Madrid y G. Moreno. 2003. *Análisis de vinos, mostos y alcoholes*. AMV Ediciones. España. 321 p.
- Martini, A. y A. Vaughan-Martini. 1990. Grape must fermentation: past and present. pp. 105-23. En: *Yeasts technology*. Spencer, J. F. T. D. and Spencer, M.) (Eds.). Berlin, SpringerVerlag.
- Naumov, G., E. Naumova y C. Gaillardin. 1993. Genetic and karyotypic identification of wine *Saccharomyces bayanus* yeasts isolated in France and Italy. *Syst. Appl. Microbiol* 16:274-279.
- Norma Venezolana COVENIN 924-83. Frutas y productos derivados. Determinación de sólidos solubles por refractometría. 15 p.
- Norma Venezolana COVENIN 1315. 1979. Alimentos. Determinación del pH. 3 p.
- Norma Venezolana COVENIN 1337. 1990. Método para recuento de Mohos y Levaduras. 6 p.

- Peña, D. 2002. Análisis de datos multivariantes. Mc Graw Hill. USA. 539 p.
- Povhe, K., N. Cadez., T. Zagorc., V. Bubic., A. Zupec y P. Raspor. 2001. Yeast populations dynamics in five spontaneous fermentations of Malvasia must. *Food Microbiol.* 18: 247-259.
- Querol, A., E. Barrio y D. Ramón. 1992. A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Syst. Appl. Microbiol.* 15: 439-446.
- Raspor, P., D. Milek., J. Polanc., S. Možina y N. Eade. 2006. Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. *Int. J. Food Microbiol.* 109: 97-102.
- Sábate, J., J. Cano., B. Esteve-Zarzoso y J. Guillamón, J. 2002. Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial ADN. *Microbiol. Res.* 157: 267-274.
- Sun, H., H. Ma, M. Hao, I. Pretorius y S. Chen, S. 2009. Identification of yeast population dynamics of spontaneous fermentation in Beijing wine region, China. *Ann. Microbiol.* 59: 69-76.
- Zott, K., C. Miot-Sertier, O. Claisse, A. Lonvaud-Funel y I. Masneuf-Pomarede. 2008. Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in Winemaking. *Int. J. Food Microbiol.* 125: 197-203.