



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

---

**Trabajo de Tesis Doctoral:**

**HISTORIA Y CARACTERIZACIÓN  
FISICOQUÍMICA DE LA UVA ISABELLA (*Vitis  
labrusca x Vitis vinifera*) Y EL VINO DE LA COSTA DE  
BERISSO. ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LA  
FERMENTACION ESPONTÁNEA Y ENSAYOS DE  
INOCULACIÓN.**

---

**Tesista: Aldana Brea**

**Director: Dr. Claudio E. Voget**

**Año: 2023**

El presente trabajo de tesis fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI, CCT-UNLP), para la obtención del grado Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas en el área de Química, bajo la dirección del Dr. Claudio E. Voget.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO  
EN FERMENTACIONES INDUSTRIALES

Dedico este trabajo de tesis a lo más importante de mi vida, mis hijos **Ciro** y **Mila**, por ser la fuerza impulsora para finalizarlo a pesar de las adversidades. Los amo con todo mi corazón.

## **AGRADECIMIENTOS.**

A mis hijos, **Ciro** y **Mila**, por soportar mi ausencia desde bebés para poder terminar este trabajo, y por darme todo el amor del mundo.

A mi compañero, **Luis**, por apoyarme día a día para que pueda continuar el trabajo.

A mi **familia** de sangre y de corazón, por el apoyo y por ayudarme con el cuidado de los nenes cuando lo necesité para poder trabajar.

A mi director, **Claudio**, por enseñarme, apoyarme y guiarme en este trabajo, permitiendo mi desarrollo académico.

A la **Facultad de Ciencias Exactas** de la **Universidad Nacional de La Plata**, por permitirme realizar el doctorado en la institución de manera pública y gratuita.

Al **Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)**, por otorgarme una beca de estudio para realizar el doctorado en la Facultad.

Al **Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI)**, por brindarme es espacio y las herramientas para que haya podido desarrollar este trabajo.

A **Ruben Verón**, por su colaboración y por permitirme el acceso a su viñedo para realizar el estudio.

A **María de los Angeles Romero** y **Claudia Sepúlveda**, por su colaboración y sus aportes en el conocimiento de los viñedos y el cultivo de la vid.

A mis **compañeros** de trabajo del CINDEFI, por la ayuda y el apoyo brindados cuando lo necesité en este trabajo.

## ÍNDICE.

<b>Capítulo 1. Introducción</b> .....	9
1.1. La vitivinicultura argentina.....	10
1.2. La uva Isabella y el Vino de la Costa de Berisso.....	11
1.3. Elaboración del Vino de la Costa.....	11
1.4. Situación actual.....	13
1.5. Hipotésis y objetivos del trabajo.....	14
1.6. Referencias.....	16
<b>Capítulo 2. Historia y propiedades de la uva Isabella (<i>Vitis labrusca</i> x <i>Vitis vinifera</i>)</b> .....	18
2.1. Introducción.....	19
2.2. El origen y la evolución de la vid.....	19
2.3. Las vides americanas. Su aporte a la vitivinicultura.....	23
2.4. <i>Vitis labrusca</i> L. (fox grape). El progenitor americano de la uva Isabella.....	26
2.5. Los híbridos de la primera mitad del siglo XIX en América del Norte y el origen de la uva Isabella.....	30
2.6. La migración de Isabella desde América del Norte hacia Europa, Asia y Oceanía.....	37
2.7. La llegada de Isabella a América Latina.....	40
2.8. La uva Isabella en Argentina.....	42
2.9. Isabella en Berisso: más de un siglo de historia del Vino de la Costa.....	44
2.10. La recuperación de la actividad vitivinícola en Berisso (2000-2020).....	48
2.11. Características y propiedades de Isabella y sus productos.....	53
2.12. El germoplasma y la conservación de Isabella.....	62
2.13. Consideraciones finales.....	67
2.14. Referencias.....	69
<b>Capítulo 3. Composición y calidad de la uva Isabella y de los vinos obtenidos en microvinificaciones</b> .....	90
3.1. Introducción.....	91
3.2. Materiales y métodos.....	99

3.2.1. Descripción del lugar.....	99
3.2.2. Fenología, prácticas de manejo del viñedo y cosecha.....	100
3.2.3. Caracterización bioclimática.....	102
3.2.4. Vendimia.....	102
3.2.5. Muestreo de racimos y bayas.....	103
3.2.6. Análisis fisicoquímico de las bayas.....	104
3.2.7. Microvinificaciones.....	106
3.2.8. Análisis fisicoquímico del vino.....	108
3.2.9. Análisis estadístico.....	109
3.3. Resultados.....	109
3.3.1. Prácticas de manejo del viñedo.....	109
3.3.2. Parámetros bioclimáticos.....	111
3.3.3. Análisis fisicoquímico de la uva Isabella.....	116
3.3.4. Microvinificaciones, balance de materia en el descube y análisis fisicoquímico y sensorial de los vinos.....	120
3.4. Discusión y conclusiones.....	129
3.5. Referencias.....	134
<b>Capítulo 4. Las levaduras del Vino de la Costa de Berisso.....</b>	<b>143</b>
4.1. Introducción.....	144
4.1.1. Microorganismos en la vinificación.....	144
4.2. Materiales y métodos.....	147
4.2.1. Reactivos y soluciones.....	147
4.2.2. Medios de cultivo.....	147
4.2.2.1. Medio GPY.....	147
4.2.2.2. Medio WL.....	148
4.2.2.3. Agar Lisina.....	148
4.2.3. Materia prima y fermentación.....	148
4.2.4. Muestreo de la fermentación y aislamiento de levaduras.....	148
4.2.5. Selección de colonias, purificación y conservación de cepas.....	149
4.2.6. Identificación de las cepas.....	150
4.2.7. Pruebas bioquímicas, test de velo y ensayos de fermentación.....	150
4.2.7.1. Reactivación de las cepas y preparación de inóculo.....	150

4.2.7.2. Test de agar lisina.....	151
4.2.7.3. Test de velo.....	151
4.2.7.4. Fermentación de mosto pasteurizado con cepas no- <i>Saccharomyces</i> .....	151
4.2.7.5. Balance de carbono y consistencia de datos.....	152
4.2.8. Métodos moleculares.....	153
4.2.8.1. Extracción de ADN.....	153
4.3.8.2. Amplificación por PCR de la región 5.8S-ITS.....	154
4.2.8.3. Amplificación por PCR y secuenciación de la región D1/D2 del gen 26S.....	155
4.2.8.4. Diferenciación de cepas <i>Saccharomyces</i> .....	156
4.3. Resultados.....	156
4.3.1. Microvinificaciones v15, v16, v17.....	156
4.3.2. Diversidad de levaduras en la vinificación.....	161
4.3.3. Distribución de las especies de levaduras durante la fermentación espontánea.....	168
4.3.4. Levaduras de velo.....	170
4.3.5. Caracterización fisiológica de cepas de levaduras no- <i>Saccharomyces</i> aisladas de la fermentación espontánea de Isabella.....	175
4.3.6. Reproducibilidad de los ensayos de fermentación.....	177
4.4. Discusión y conclusiones.....	190
4.5. Referencias.....	195
<b>Capítulo 5. Caracterización de cepas <i>Saccharomyces</i>. Ensayo de inoculación..</b>	<b>208</b>
5.1. Introducción.....	209
5.2. Materiales y métodos.....	211
5.2.1. Vendimias y análisis fisicoquímico de las uvas.....	211
5.2.2. Cepas.....	212
5.2.3. Caracterización bioquímica de las cepas.....	214
5.2.4. Ensayos en mosto de Isabella pasteurizado.....	216
5.2.5. Ensayos de fermentación espontánea vs fermentación inoculada.....	216
5.2.6. Análisis sensorial de los vinos.....	218

5.2.7. Análisis de compuestos volátiles.....	219
5.2.8. Análisis estadístico de los resultados.....	219
5.3. Resultados.....	220
5.3.1. Fermentación de mosto de Isabella pasteurizado con <i>Saccharomyces</i> .....	220
5.3.2. Análisis de productos de fermentación mediante HPLC.....	222
5.3.3. Producción de compuestos volátiles.....	226
5.3.4. Otras propiedades de las cepas.....	231
5.3.5. Fermentación espontánea vs inoculada.....	232
5.3.6. Análisis sensorial de los vinos.....	241
5.4. Discusión y conclusiones.....	242
5.5. Referencias.....	246
<b>Conclusiones generales</b> .....	<b>255</b>
<b>Anexos</b> .....	<b>261</b>
I. Cromatografía de productos de fermentación por HPLC.....	262
II. Sistema de HPLC.....	262
III. Soluciones estándar.....	262
IV. Cromatogramas de los patrones.....	262
V. Tratamiento con polivinilpirrolidona (PVPP).....	264
VI. Ensayo preliminar de adsorción de los patrones.....	265
VII. Cinética de adsorción de pigmentos y compuestos fenólicos.....	265
VIII. Efecto del número de etapas de adsorción.....	267
IX. Cromatogramas de muestras con y sin tratamiento con PVPP.....	267
X. Comparación HPLC con análisis fisicoquímicos del INV.....	269
XI. Límites analíticos del método.....	271
XII. Resultados de las fermentaciones espontáneas v15, v16, v17.....	271
XIII. Referencias.....	276



**Capítulo 1.**  
**Introducción.**

## 1.1. La vitivinicultura argentina.

Argentina es el quinto país productor de vino del mundo y se encuentra entre los primeros 10 países exportadores a nivel mundial (Cabezón, 2019). El éxito del vino argentino se debe a la presencia en nuestro país de regiones geográficas con excelentes aptitudes de suelo y clima en la cuales se pueden obtener uvas de *Vitis vinifera* con alta calidad enológica. La relevancia que fue adquiriendo la vitivinicultura argentina a lo largo del tiempo se evidencia en la actualidad por los premios recibidos en concursos internacionales. El 3 de julio del 2013 el Congreso de la Nación declaró al vino argentino como bebida nacional, dándole así una impronta cultural que va más allá del simple consumo como bebida alcohólica (infoLEG, Ley 26.870).

La vitivinicultura argentina tuvo sus orígenes a mediados del siglo XVI, y coincidió con los primeros asentamientos españoles. Los primeros viñedos en la Argentina se implantaron en 1551 al norte de la provincia de Santiago del Estero, pero el desarrollo importante y sostenido ocurrió posteriormente en Mendoza y San Juan. Se estima que la primer cosecha de uva para vino en Mendoza fue en el año 1564 (Cabezón, 2019). En la segunda mitad del siglo XIX, la llegada de especialistas y la inmigración española e italiana dio un nuevo impulso a la vitivinicultura incorporando nuevos conocimientos y técnicas, dando así lugar al desarrollo de la vitivinicultura como industria nacional. En 1959 se promulgó la Ley General de Vinos Nro. 14.878, por la cual se creó el Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV). En la década del '70 entró en crisis el modelo de producción basado en grandes volúmenes de vino destinados al mercado interno, y comenzó un proceso de modernización de la industria vitivinícola con la mirada puesta en la exportación bajo la consigna "menor volumen, más calidad". En 1999, la Ley General de Vinos se equiparó a la de la Unión Europea para mejorar y potenciar el proceso de exportación.

Según el INV (Informe anual de cosecha 2020), actualmente y con 215.000 ha plantadas, la Argentina produce vino en 14 de las 23 provincias. Mendoza con el 72% y San Juan con el 22%, elaboran la mayor parte del vino producido anualmente. En 2020 se produjeron en promedio 20.557.455 quintales (2.055.745,5 tn) de uvas, de las cuales el 97,5% se destinó a vinos y mostos, 2, 2% a pasas y un 0,3% para consumo en fresco. El total de vino elaborado fue de 10.796.149 hl (68,5 % tinto, 29,4 % blanco, 2,1 % rosado). Las variedades más cultivadas de uvas tintas son Malbec, las cepas criollas Cereza y Criolla grande, Bonarda y Sirah, y para las variedades blancas Pedro Gimenez, Torrontés riojano y Chardonnay.

## **1.2. La uva Isabella y el Vino de la Costa de Berisso.**

Teniendo en cuenta la Ley General de Vinos, el 100% de la superficie cultivada de uvas para vino en Argentina debería ser de variedades de *Vitis vinifera*. Sin embargo, esto no ocurre exactamente, ya que aún subsiste una producción marginal de variedades no viníferas. El origen de esta producción atípica se encuentra en los inmigrantes que arribaron a la Argentina en la segunda mitad del siglo XIX, en particular los italianos. Muchos de ellos con tradición viñatera se ubicaron en zonas rurales donde *V. vinifera* no podía adaptarse o crecer adecuadamente, por lo tanto les fue necesario buscar variedades alternativas para la producción de vino. Tal fue el caso de la variedad Isabella, una uva híbrida, producto de un cruce aleatorio entre la especie americana *Vitis labrusca* L., y una variedad de *V. vinifera* desconocida. Isabella fue traída a la Argentina por inmigrantes que se instalaron principalmente en Colonia Caroya (Córdoba), en las costas bajas del Río de la Plata (de Tigre a Magdalena) y en Misiones, lugares donde la variedad se adaptó y con cuya producción se elaboró vino. En la costa del Río de La Plata el vino elaborado con Isabella se denominó Vino de la Costa o Vino de la “viña”. En Berisso, el vino fue adquiriendo a lo largo de los años una fuerte identidad territorial producto de su íntima relación con el desarrollo socioeconómico de la ciudad. A pesar de ser una variedad no vinífera, el peso de la historia, el fuerte arraigo que tienen los vinos de Isabella en los lugares donde se produce y las decisiones políticas, han dado lugar a que el INV mantenga cierta tolerancia respecto a su cultivo y la elaboración de vinos con esta uva híbrida. De hecho, el INV reconoció en el año 2013 al vino de la Costa como “vino regional” (Resolución C.23/201, anexo a la resolución N° C.23/13, INV).

## **1.3. Elaboración del Vino de la Costa de Berisso.**

Históricamente, la elaboración del vino de la Costa fue llevada a cabo por cada familia en su quinta. Desde el 2014, el vino se elabora mayoritariamente en la bodega que tiene la Cooperativa del Vino de la Costa. En la bodega se sigue el procedimiento de vinificación más simple, ya que no se emplean insumos tecnológicos y la vinificación depende de la fermentación espontánea llevada a cabo por las levaduras que provienen de las uvas y las que se encuentran en los equipos de la bodega. Existe un protocolo de elaboración del vino para asegurar una calidad reproducible (Cooperativa de Provisión y Comercialización de la Costa de Berisso, 2009). El proceso puede dividirse en unas pocas etapas:

### Cosecha

Las uvas llegan a la bodega desde diferentes viñedos, en función de como se organiza la cosecha en cada quinta. El aporte fundamental lo realizan tres o cuatro viñedos tipo parral y uno tipo espaldera. La madurez de la uva se evalúa por los °Baumé y el análisis visual y gustativo. También se tiene en cuenta para la cosecha el pronóstico del clima. Normalmente se realiza durante la primera quincena de marzo.

### Encubado

Para el encubado (colocación del mosto en cubas de fermentación), las uvas se procesan en una moledora/despalladora. La máquina está acoplada a una bomba en su parte inferior con la cual se van llenando tanques de 1000 litros de fibrocemento revestidos con pintura epoxi. Simultáneamente, se adiciona metabisulfito de potasio a razón de 100-120 mg/kg de uva.

### Fermentación

El mosto se deja fermentar a temperatura ambiente, observándose la etapa tumultuosa al cabo del segundo o tercer día. Durante la fermentación se realizan dos o tres bazuqueos diarios, y la temperatura puede llegar hasta los 32 °C, dependiendo de la temperatura ambiente. La fermentación/maceración se controla mediante los grados Baumé y puede durar entre 5 y 7 días, pero a veces el encubado se deja hasta 8 días para aumentar la extracción de color.

### Descube y trasiegos

La operación siguiente es el descube, para lo cual el tanque se escurrer por la parte inferior (vino de gota) y los restos sólidos se vuelcan a las prensas de canasto para obtener el vino de prensa. Ambos vinos se mezclan y pasan a tanques de acero inoxidable que se llenan en su totalidad. El primer trasiego suele realizarse a los 15-17 días luego del descube, y el segundo 30-40 días después del primero; el último se realiza justo antes de envasar, cuando el vino se embotella para vender en la fiesta del vino de la Costa en julio. El resto se mantiene en los tanques. Durante el proceso se controla el nivel de anhídrido sulfuroso, teniendo en cuenta los límites establecidos por el INV. En la Figura 1.1 se muestran fotos de la elaboración del vino en la quinta de Galeán, lugar donde se ubicaron los equipos antes de construir la bodega.



**Figura 1.1.** Elaboración de vino de la Costa, encubado en tanques de fibrocemento con revestimiento epoxi, bazuqueo, descube con prensas de madera y tanques para clarificación y almacenamiento (fotos en la quinta de Galeán, año 2007).

#### **1.4. Situación actual.**

El vino de la Costa tuvo sus comienzos, desarrollo, apogeo y declinación (Velarde, 2010). A partir del año 2000, el trabajo conjunto llevado a cabo por viñateros, docentes e investigadores de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (FCAyF-UNLP), técnicos rurales y enólogos, permitió realizar un diagnóstico del área rural de Berisso “conocer para actuar”, e iniciar un trabajo de extensión/investigación destinado a dar apoyo a la incipiente recuperación de la actividad vitivinícola de Berisso. El resultado más notorio de este proceso fue la expansión de la superficie cultivada de viñedos, un aumento de la producción de vino, el desarrollo de nuevos productos derivados de la vid (espumantes, dulces, etc.) y la realización de los primeros análisis de composición de la uva, del vino y del proceso de fermentación (Sisterna y col.,

2010). Transcurridos casi 20 años del proceso de recuperación de la vitivinicultura en Berisso, las crisis recurrentes de la economía argentina plantearon nuevos desafíos al vino de la Costa (Altavista, 2019). El fuerte aumento de los costos de producción trajo aparejada una disminución de la rentabilidad que dificulta inversiones y la calidad de la mano de obra, principalmente del trabajo rural. En ese contexto, las nuevas propuestas para consolidar la producción del vino de la Costa están dirigidas a lograr un mayor dinamismo en las formas de comercialización, a ampliar la oferta con nuevos productos (como el vino espumante) y desarrollar distintas iniciativas culturales para promocionar el vino. Paralelamente se impulsan proyectos desde la Cooperativa con el apoyo de entidades científicas y académicas con el objetivo de conseguir subsidios destinados a realizar inversiones en bodega y financiar estudios de innovaciones tecnológicas en el proceso de elaboración del vino.

En la enología moderna, el futuro de una zona vitivinícola depende de la posibilidad de conseguir productos con características propias, de alta calidad y que difícilmente se puedan obtener en otros lugares. La elaboración de vino es un proceso microbiológico muy complejo afectado por una considerable cantidad de factores. La mayor parte de los vinos de producción artesanal y fermentación espontánea muestran una variabilidad intrínseca que en determinadas ocasiones puede implicar una pérdida de calidad significativa. A pesar de la popularidad del vino de la Costa en la región de Berisso, se conoce muy poco sobre la composición de la uva, las propiedades del vino y la fermentación. Esta situación limita la posibilidad de introducir cambios en las prácticas vitivinícolas que podrían garantizar cierta reproducibilidad en las propiedades del vino, e incluso lograr vinos mejores en relación a su aceptabilidad por el público en general. Por lo tanto, para poder realizar futuras innovaciones es necesario conocer que es en realidad del vino de la Costa, desde la variedad de uva que se emplea para vinificar hasta las propiedades del producto final. Esta tesis es el primer trabajo que se realiza para lograr dicho objetivo. y se inserta en el marco de las políticas de apoyo a la economía social y solidaria contemplada en el Plan Estratégico Agroalimentario y Agroindustrial para el 2020 bajo la estrategia de innovar para crecer (CEPAL, 2009).

### **1.5. Hipótesis y objetivos del trabajo.**

El objetivo general del presente trabajo de tesis fue obtener información sobre las características fisicoquímicas de la uva Isabella cultivada en Berisso, el proceso de fermentación con esta variedad de uva y las propiedades químicas y sensoriales del

vino de la Costa. Para establecer los objetivos específicos se consideraron las siguientes hipótesis:

1) La composición de la uva Isabella no es constante y varía cada año, dando lugar a cambios en las propiedades fisicoquímicas del vino. Considerando que la ubicación del viñedo y el sistema de conducción ya están definidos por el productor, las variables más relevantes que en cada año podrían afectar la calidad de las uvas serían las prácticas culturales y las condiciones meteorológicas.

2) La fermentación espontánea de Isabella en las quintas y en la bodega de la Cooperativa de la Costa es llevada a cabo por microorganismos que provienen de las bayas, pero también de los equipos y utensilios de la bodega. Realizando microvinificaciones de laboratorio se puede obtener un conocimiento más real de cuáles son las levaduras vínicas responsables de la fermentación espontánea y aislar cepas que provengan específicamente de la uva

3) El empleo de una cepa autóctona aislada de las microvinificaciones para inocular el vino podría ser una práctica recomendable para asegurar cierta reproducibilidad en la fermentación.

Finalmente, cabe destacar que hasta la fecha no se ha realizado ninguna revisión integradora relativa a la historia y propiedades de esta variedad de uva, lo cual tiene un enorme interés académico, tecnológico y cultural.

En base a estas hipótesis y consideraciones, en este trabajo de tesis se plantearon los siguientes objetivos específicos:

I. Realizar una revisión integradora (review) sobre la historia y propiedades de la uva Isabella (capítulo 2).

II. Realizar un análisis fisicoquímico de la uva Isabella obtenida de un viñedo representativo de la región durante al menos cuatro vendimias consecutivas. Obtener datos climáticos de cada campaña y sobre las prácticas culturales que se realizan en el viñedo (capítulo 3).

III. Llevar a cabo microvinificaciones a escala de laboratorio con las las uvas obtenidas en cada vendimia y analizar los vinos en su composición fisicoquímica y propiedades sensoriales (capítulo 3).

IV. Aislar e identificar las levaduras cultivables responsables de la fermentación espontánea y determinar las propiedades fermentativas más relevantes de las especies aisladas (capítulo 4).

V. Determinar las propiedades fermentativas de cepas *Saccharomyces* autóctonas, en particular la producción de metabolitos y compuestos volátiles. Comparar una fermentación espontánea con una fermentación inoculada con una cepa autóctona seleccionada (capítulo 5).

Para llevar a cabo el estudio se seleccionó un viñedo tipo parral perteneciente al productor Rubén Verón. Si bien algunos estudios preliminares mostraron que existen ciertas diferencias en las propiedades sensoriales de vinos obtenidos con uvas provenientes de viñedos con diferentes sistema de conducción (parral vs espaldera), este trabajo se llevó a cabo únicamente con uvas del viñedo antes mencionado debido a varios motivos: es uno de los tres viñedos de Berisso que aporta el mayor volumen de uvas a la bodega de la Cooperativa en cada vendimia, el propietario es el único productor que lleva un registro de las prácticas vitícolas que realiza año tras año en el viñedo y finalmente por una cuestión práctica, ya que resultaría imposible muestrear y procesar en simultáneo una gran cantidad de muestras estadísticamente representativas si el estudio se realiza con dos o más viñedos.

## **1.6. Referencias.**

Cabezón, S. (2019). Mercado vitivinícola en la Argentina contemporánea "Nuevas estrategias comerciales frente a la caída consumo". Trabajo de Investigación. Facultad de Ciencias Económicas. UNCuyo.

Cooperativa de Provisión y Comercialización de la Costa de Berisso. (2009). Pliego de condiciones de vino de la Costa de Berisso de calidad garantizada y vino espumoso de la costa de Berisso de calidad garantizada. Titular Cooperativa de Provisión y Comercialización de la Costa de Berisso, limitada. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales,-UNLP, Facultad de Ciencias Exactas-UNLP, CINDEFI (CONICET-UNLP), Municipalidad de Berisso. Enólogo-Fruticultor Héctor Becerra.

Sisterna, M.; Ronco, L., Voget, C., Marasas, M., Abbona, E., Romero, M., Daniele, J., Artaza, S., Otero, J.; Sepúlveda, C., Avila, G., Loviso, C., Orozco, E., Bonicatto, M., Condes, C., & Velarde, I. (2010). American Grapevine Culture and Research in Berisso, Argentina. *The Americas Journal of Plant Science and Biotechnology*, 3 (Special Issue 1), 38-53.

Velarde, I., Voget, C., Avila, G., Loviso, C., Orozco, E., Sepúlveda, C., & Artaza, S. (2008). Influencia de la calidad en el consumo de productos patrimoniales: el caso del sistema agroalimentario del vino de la costa de Berisso, (pp. 29-63). *Sistemas Agroalimentarios Localizados en Argentina*. INTA, INRA.



Velarde, I. (2010). Valorización de los recursos agroalimentarios locales como estrategia de desarrollo rural: estudio de caso del vino de la costa de Berisso, Argentina (Tesis de Magister).

## **Capítulo 2.**

**Historia y propiedades de la uva Isabella  
(*Vitis labrusca* x *Vitis vinifera*).**

## **2.1. Introducción.**

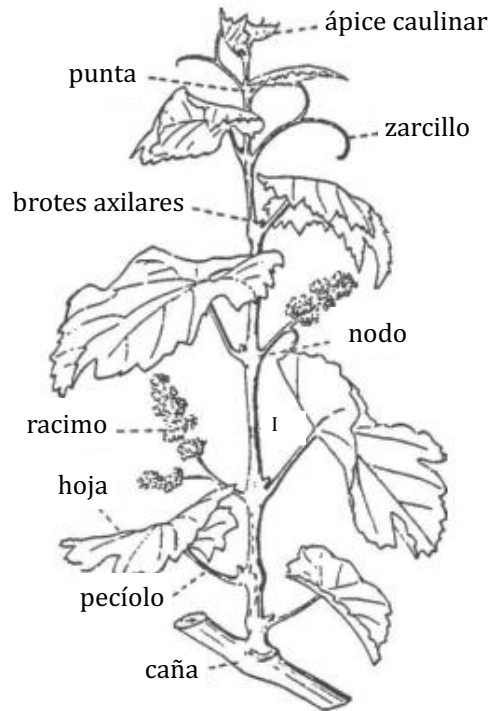
En la costa ribereña, al sur de la ciudad de Buenos Aires, desde Avellaneda hasta Magdalena, aún se habla del vino de la “viña” o “vino de la Costa”. Su historia ha sido particularmente intensa en Berisso, donde hoy mantiene su vigencia de la mano de pequeños productores familiares, de la Cooperativa de la Costa de Berisso y de diversos actores sociales. El vino de la Costa se produce con una uva conocida como Isabella. Ahora bien, ¿qué se sabe de la uva Isabella?, ¿cuál fue su lugar de origen?, ¿por qué llegó a las costas del Río de La Plata?, ¿qué propiedades tiene?. Para dar respuestas a estos interrogantes se realizó una revisión integradora sobre distintos aspectos de esta particular variedad de uva. Para tal fin se consultaron trabajos científicos, libros y artículos académicos diversos que se buscaron utilizando bases de datos bibliográficas de libre acceso como Trip Database y Directory of Open Access Journals, como así también buscadores académicos como Google Scholar, Scielo (especializada en bibliografía latinoamericana), PubMed, entre otros. También se recurrió a periódicos, sitios web e incluso a entrevistas personales. Se descartaron fuentes de información potencialmente dudosas provenientes en su mayoría de sitios web poco confiables. Los resultados de la revisión integradora han sido organizados en este capítulo, cuyas secciones siguen un cierto orden temporal en relación al origen y evolución de la vid, el descubrimiento de la Isabella y su posterior dispersión por diversas regiones del mundo, hasta la historia del vino de la Costa en los humedales de Berisso. Finalmente, se describen las características de esta variedad de uva y su conservación en los bancos de germoplasma. Como no podría ser de otro modo, quedan muchos interrogantes sobre la historia de esta uva, pero las respuestas (si las hay), habrá que buscarlas en futuras investigaciones.

Desde ya nuestro agradecimiento a las personas que colaboraron directa o indirectamente en la búsqueda de la información, y en especial a los viñateros de Berisso que inspiraron el presente capítulo.

## **2.2. El origen y la evolución de la vid.**

La vid (*Vitis* sp L.) es una planta que pertenece desde el punto de vista botánico al género *Vitis*, uno de los 16 géneros de la familia Vitaceae (The Plant List, 2013). El género *Vitis* posee las características generales de las Vitaceae, representado por lianas, arbustos herbáceos o árboles, perennes, con tallos que suelen tener hojas que se desarrollan alternativamente en los brotes y con nudos hinchados que pueden generar zarcillos o racimos florales opuestos a las hojas (Figura 2.1). Tienen hábito

trepador por sus zarcillos y los racimos florales contienen flores diminutas, unisexuales o bisexuales, sus frutos son carnosos y contienen entre 2 y 6 semillas (Simpson, 2019). La diferencia del género *Vitis* respecto del resto de la familia Vitaceae reside en las características florales (Jackson, 2014, p.22).



**Figura 2.1.** Ilustración de las partes de la vid (adaptado de Jackson, 2014, p. 22).

Las Vitaceae son una familia de plantas que habitan principalmente regiones tropicales y subtropicales del mundo. En cambio, *Vitis* o las vides como se las denomina genéricamente, crecen en climas templados o subtropicales y comprenden unas 70 especies originarias del hemisferio norte (Walker et al., 2019). Se considera que la evolución de las especies de vid desde un ancestro común no ha tenido tiempo suficiente para lograr el aislamiento reproductivo característico de una especie biológica. Por estas razones, y como es el caso de muchas plantas, las especies del género *Vitis* no están total y definitivamente establecidas. Algunos autores las han definido como “eco-especies”: poblaciones de vides que pueden diferenciarse por características morfológicas, como la anatomía de sus hojas, flores y frutos, y que están aisladas unas de otras por barreras geográficas, ecológicas o fenológicas” (Keller et al., 2015). Las vides se han subdividido en dos subgéneros: *Muscadinia* y *Vitis*, basados en diferencias anatómicas y en el número de cromosomas (Jackson,

2014). El subgénero *Muscadinia* comprende tres especies muy emparentadas entre sí, distribuidas en una región que se extiende desde el sudeste de Estados Unidos hasta México, siendo *Muscadinia rotundifolia* (Michx.) la única especie cultivada. Por su parte, el subgénero *Vitis* incluye el resto de las especies interfértiles agrupadas en euroasiáticas y americanas, según su origen geográfico (Keller et al., 2015). La vid original (vid silvestre) se encontraba extendida en lo que actualmente es Europa, América del Norte y Asia oriental. Estudios filogenéticos han sugerido que las vides tienen un antepasado común, cuyo origen se remontaría al período Paleógeno de la era Cenozoica, hace unos 60 Ma (millones de años) (Wan et al., 2013). Se ha estimado, a su vez, que la diversificación del género *Vitis* se inició hace 28-34 Ma, la divergencia entre los subgéneros *Vitis* y *Muscadinia* entre 12,85 y 17,8 Ma y la separación de las especies de *Vitis* euroasiáticas de las especies de América del Norte y América Central en aproximadamente 9,5-11,38 Ma (Wan et al, 2013; Wen et al., 2018).

A causa de las sucesivas glaciaciones que ocurrieron hace 3 millones de años en el hemisferio norte durante el comienzo de la era cuaternaria, la *Vitis* silvestre se extinguió en muchas regiones, pero sobrevivió en zonas protegidas de climas extremos llamadas “refugios de la vid”, situados al pie de grandes macizos montañosos, como fueron el mediterráneo, la parte oriental del mar Negro (refugio Póntico, actual Georgia), este de China, sudeste y costa del Pacífico en Estados Unidos y el norte de México (Wan et al., 2013). Al terminar el período glacial, los cambios climáticos y el desarrollo de los bosques mesotermófilos (en cuyos árboles la vid podía trepar) permitió su recuperación, asilvestrándose. La emigración de la vid de estos refugios dio lugar a la recolonización de diferentes regiones y la aparición de nuevas especies. En Europa predominó una única especie, *Vitis vinifera* (*V. vinifera* subsp. *sylvestris* (C.C.Gmel.) Hegi), en cambio, la recolonización de la vid en América del Norte y Asia oriental dio lugar a una mayor biodiversidad, proliferando cerca de 60 especies adaptadas a las más diversas condiciones de clima y suelo (Weiss et al., 2000). Todas las *Vitis* silvestres o nativas se caracterizan por ser plantas dioicas.

La vid cultivada (*Vitis vinifera* subsp. *sativa* L.) se originó a partir de la *Vitis vinifera* silvestre (Heinitz et al., 2019). Las primeras evidencias arqueológicas de domesticación de la vid silvestre se encontraron en la región del Cáucaso sur (Transcaucasia) ~ 8000 a.C (Zohari et al., 2012). Este hallazgo no es de extrañar si se tiene en cuenta que el Oriente Próximo fue históricamente una de las regiones donde apareció primero la agricultura, en el período Neolítico de la Edad de Piedra, unos

10000 años a.C. (Childe, 1996). Estudios recientes basados en el análisis químico de restos cerámicos confirmaron la práctica del cultivo de la *Vitis vinifera* L. y de la elaboración de vino hace 6000-6500 años AC en zonas cercanas a la actual capital de Georgia (McGovern et al., 2017) (Figura 2.2).



**Figura 2.2.** Una de las 18 vasijas desenterradas por los arqueólogos en Georgia que contenían restos de vino. (Joaquín Hidalgo, 21 de noviembre de 2021). <https://vinomanos.com/2017/11/georgia-vino-antiguo/?msclkid=634cd17dce7d11ec912016d7f02dcf3b>

Según Arroyo-García et al., (2006) la domesticación sería multilocal y un trabajo reciente (Dong et al., 2023) también sugiere que hubo dos centros independientes de domesticación: el Cáucaso y Asia occidental y que ambos eventos ocurrieron hace 11000 años. A partir de su sitio original, en particular Asia occidental, la vid domesticada se habría diseminado siguiendo las principales civilizaciones y mediante hibridaciones e introgresiones con las vides silvestres habría originado las variedades de vinífera actualmente empleadas para vinificar. El aspecto sobresaliente de la domesticación de la *V. vinifera* silvestre fue la selección de cepas hermafroditas, lo que garantizó la autopolinización y por ende una elevada fructificación sin necesidad de una vid macho externa (Henitz et al., 2019). Durante la domesticación, la sativa adquirió propiedades específicas y dio origen a la mayoría de las variedades de vid que se emplean actualmente para vinificación y consumo.

Por su parte, la vid silvestre aún subsiste en algunas regiones de Europa Meridional, Europa Central, África y Asia, (Zohary & Spiegel-Roy, 1975; Myles et al., 2011) (Figura 2.3). Las vides silvestres se consideran especies amenazadas según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (Ocete et al., 2018).



**Figura 2.3.** Vid silvestre (tomado de Lara et al., 2017).

La viticultura y la elaboración de vino fueron prácticas relevantes en las culturas antiguas (particularmente en el Imperio romano) que se mantuvieron durante la Edad Media en Europa y en el Oriente Medio, para finalmente expandirse en los siglos XVII y XVIII a los nuevos territorios conquistados por los europeos como América, Australia, Nueva Zelanda y Sudáfrica (Jackson, 2014). En la actualidad, la uva ocupa el tercer lugar entre los cultivos más importantes del mundo, luego de la papa y el tomate (Alston & Sambucci, 2019), y el vino es la bebida fermentada más consumida luego de la cerveza; su producción en el 2022 fue de 258 millones de hectolitros (Mill. hL) (OIV, 2022).

En Botánica, se define una variedad vegetal a un grupo de plantas seleccionado dentro de una especie, que presentan una serie de características comunes. De acuerdo a la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV), el viñedo mundial estaría compuesto por 10000-12000 variedades de vid (OIV, 2019).

### **2.3. Las vides americanas. Su aporte a la vitivinicultura.**

Las vides americanas son las vides nativas originarias de América del Norte que evolucionaron luego de sobrevivir al período glacial. Comprenden las especies del subgénero *Muscadinia* y las especies que pertenecen al subgénero *Vitis* americanas o *Vitis* del Nuevo Mundo. La mayoría de las especies americanas se distribuyen desde las montañas rocosas hasta la costa atlántica de Estados Unidos, y unas pocas en la

costa oeste y el norte de México (Jackson, 2014). Todas las especies de vides americanas son dioicas, interfértiles, y se caracterizan por su resistencia a diferentes plagas y su aptitud para crecer en climas y suelos donde habitualmente la *Vitis vinifera* no desarrolla bien (Galet, 1988; Heinitz et al., 2019). El área de distribución de las especies estaría asociado a diferentes nichos climáticos (Callen et al., 2016) y varias de ellas prefieren zonas cálidas y húmedas sin restricciones hídricas, por lo cual es común observarlas en su medio natural cerca de fuentes permanentes de agua, como un río, arroyo o manantial (Morano & Walker, 1995).

La taxonomía de las vides americanas comenzó con Linneo (1753). Debido a su complejidad genética, existen discrepancias en la clasificación de las especies de vides americanas (Comeaux, 1984; Moore, 1991; Wan et al., 2013, Wen et al., 2018; Klein et al., 2018, Ickert-Bond et al., 2018). De acuerdo a la base de datos de la Red de Información de Recursos de Germoplasma (Germplasm Resource Information Network, GRIN) del ARS-USDA (<https://npgsweb.ars-grin.gov>) y otras fuentes, como VIVC ([www.vivc.de](http://www.vivc.de)), la Flora de América del Norte ([www.efloras.org/north\\_america](http://www.efloras.org/north_america)) y BONAP (Kartesz, 2015), las especies nativas puras o híbridas aceptadas de vides americanas (incluyendo *Muscadinia* pero sin incluir las nuevas especies de México) son las siguientes: *Vitis riparia* Michx (riverbank grape), *Vitis rupestris* Scheele (sand grape), *Vitis acerifolia* Rafinesque, *Vitis girdiana* Munson, *Vitis arizónica* Engelm, *Vitis vulpina* L. (frost grape); *Vitis labrusca* L. (fox grape), *Vitis aestivalis* Michx (summer grape), *Vitis cordifolia*, *Vitis cinerea* Engelm ex Millardet, *Vitis berlandieri* Planchon, *Vitis rotundifolia* Michx (muscadine), *Vitis amurensis* Rupr (Amur grape), *Vitis californica* Benth, *Vitis monticola* Buckley, *Vitis palmata* Vahl, *Vitis shuttleworthii* House, *Vitis×champinii* Planch (pro sp) [*mustangensis×rupestris*], *Vitis×doaniana* Munson ex Viala (pro sp.) [*acerifolia×mustangensis*], *Vitis×novae-angliae* Fernald (pro sp) [*labrusca×riparia*] y *Vitis×slavinii*.

Las vides americanas representan un depósito natural de germoplasma (recurso genético) que se ha empleado para mejorar las vides que se cultivan en todo el mundo (Keller, 2015; Heinitz et al., 2019). Su mayor contribución a la vitivinicultura residió en la creación de híbridos intraespecíficos para ser empleados como portainjerto o híbridos entre especies americanas y variedades de *V. vinifera* para la producción de uva, estos últimos se denominaron híbridos productores directos (HPD) (Töpfer et al 2011; Ollat et al., 2016). Curiosamente, la obtención de portainjertos o HPD se debió a la necesidad de proteger los cultivos de vid europeos (*Vitis vinifera* L. subespecie sativa) de las plagas que las propias vides americanas o sus híbridos naturales



llevaron a Europa cuando fueron importadas desde América del Norte, durante la primera mitad del siglo XIX. Las vides americanas eran resistentes o tolerantes a las plagas que existían en su propio territorio, ya que con el tiempo fueron adquiriendo cierta inmunidad; en cambio, las vides europeas no lo eran porque las plagas eran inexistentes en Europa. Las tres principales plagas llevadas a Europa por las vides americanas fueron el oídio, la filoxera y el mildiu (Heinitz et al., 2019). El oídio es una especie de hongo (Teleomorfo *Uncinula necator* Schwein) descubierto en Londres en 1845, que se propagó al resto de Europa en 1850. La filoxera es un insecto (*Daktulosphaira vitifolia*) tipo pulgón que se alimenta de las raíces y las hojas de la vid, cuya primera aparición se registró alrededor de 1865 en la región del Ródano-Alpes al sudoeste de Francia (Faucon, 1870, como se citó en Dion, 1970). El mildiu (*Plasmopara viticola*) es un hongo que se detectó en Francia por primera vez en 1878, y según estudios recientes, fue llevado al continente europeo por la especie americana *Vitis aestivalis* (Fontaine et al., 2021). La sucesión cronológica de estas tres plagas devastó los cultivos de *V. vinifera* en Europa durante la segunda mitad del siglo XIX, e incluso hasta principios del siglo XX, en particular la filoxera (Haba, 2005; Jackson, 2014). El control del oídio y el mildiu se logró finalmente con el empleo del azufre y del cobre (Töpfer et al., 2011), mientras que los portainjertos de vides americanas fueron determinantes para salvar la viticultura europea del ataque de la filoxera.

A partir de 1870, cuando la filoxera comenzó a destruir los viñedos de *V. vinifera*, se inició una intensa investigación y colaboración internacional para la búsqueda de una solución para la plaga. Investigadores, e incluso mejoradores genéticos amateurs, fueron una parte fundamental de este proceso que derivó en la obtención de los portainjertos.

Un aporte fundamental lo realizó el botánico y prestigioso viticulturista estadounidense, Thomas V. Munson (1843-1913), quien desarrolló en Texas portainjertos de híbridos de vides americanas resistentes a la filoxera (Rombough, 2002; McLeRoy & Renfro, 2008). Una contribución similar fue realizada por Hermann Haeger (1855-1929) de Missouri (Perry & Sabbatini, 2015). A partir de 1880 los viticultores franceses y de otros países utilizaron masivamente los portainjertos para injertar las variedades de vides europeas, replantar las viñas y recuperar la producción de vino. Diferentes híbridos de las especies americanas *V. riparia*, *V. rupestris*, *V. berlandieri*, se utilizan hoy en día como portainjertos en más del 90% de los cultivos de *V. vinifera*, y son los llamados pies americanos, que resisten la filoxera, pero también

pueden transmitir a la vid resistencia a la sequía, a los nemátodos y capacidad para crecer en diversos tipo de suelo (Gil & Pszczółkowski, 2015; Ollat et al., 2016).

Otra alternativa que se empleó en Europa para reemplazar los viñedos de *V. vinifera* diezmados por las plagas fueron los HPD (Ravat, 1902; Töpfer et al., 2011). Para los mejoradores de vid, el híbrido ideal debería tener raíces resistentes a la filoxera, follaje resistente a hongos patógenos, adaptarse a ciertos climas y suelos y dar uvas que pudiesen producir vinos similares a los que producían las uvas *V. vinifera*. Este objetivo global fue difícil o casi imposible de conseguir. El uso de los HPD abarcó dos etapas, los de primera generación llamados HPD americanos, tuvieron su origen en América y surgieron por polinización espontánea (como fue el caso de la Isabella) o en forma artificial de la mano de mejoradores genéticos (como la uva Othello). La primera generación de HPD se cultivó en las zonas vitícolas mas húmedas de Europa debido en parte a su resistencia a enfermedades fúngicas, particularmente en Francia, Alemania e Italia durante la segunda mitad del siglo XIX (Töpfer et al, 2011), pero se discontinuaron por su baja resistencia a la filoxera y a ciertos cuestionamientos arbitrarios sobre las propiedades de sus vinos. Esta primera generación de híbridos fue la base para que mejoradores franceses desarrollaran híbridos de segunda y tercera generación denominados franco-americanos o franceses, de mejor calidad enológica, los cuales se cultivaron extensamente en Europa a partir de 1870 llegando a cubrir en 1958 hasta 500000 ha. (Töpfer et al, 2011). Debido a decisiones políticas los cultivos de los HPD franceses se discontinuaron cuando en 1960 fueron revocados por la Appellation d'Origine Contrôlée (denominación de origen controlada) (Viret et al., 2019).

En la actualidad, las vides híbridas están ganando terreno en la producción de vino a partir del empleo de variedades mejorados que permiten desarrollar una viticultura más ecológica, con menor uso de fungicidas y agroquímicos, y con la posibilidad de ser cultivados en regiones de clima extremo (Gil & Pszczółkowski, 2015)

#### **2.4. *Vitis labrusca* L. (fox grape). El progenitor americano de la uva Isabella.**

Desde el punto de vista de la elaboración de vino, la especie más trascendente, e incluso la más conocida de todas las vides americanas, es la *V. labrusca* L. (fox grape) (Figura 2.4), originaria del este de Estados Unidos, desde Georgia hasta el sureste de Canadá, con el estado de Indiana como límite occidental (Keller, 2015).



**Figura 2.4.** *Vitis labrusca* (fox grape). Online Virtual Flora of Wisconsin: <http://wisflora.herbarium.wisc.edu/index.php>. Acceso: 9 de mayo de 2021.

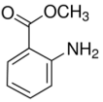
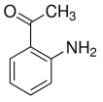
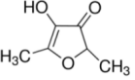
*Labrusca* deriva de la palabra latina “salvaje” y la especie fue mencionada y descrita por Linneo en *Species Plantarum* (1753). Estudios genéticos de más de 300 accesiones del banco de germoplasma de vid del USDA-ARS ubicaron a *V. labrusca* como una especie cercana a *V. vulpina*, *V. aestivalis* y *V. cinerea* (Klein et al., 2018). De acuerdo a Callen et al., (2016), los cuatro taxones tienen nichos climáticos similares y se superponen geográficamente, aunque no totalmente, en todo el este de los Estados Unidos. Los pares *V. labrusca/V. aestivalis* y *V. vulpina/V. cinerea* son los que comparten mayores similitudes morfológicas (Moore & Wen, 2016).

Las características de *V. labrusca* han sido descritas en varias publicaciones (Planchon, 1874; Ravaz, 1902; Heidrick, 1908; Munson, 1909; Bailey, 1934; Moore 1991). Esta especie se diferencia del resto de las *Vitis* por tener zarcillos en todos los nodos, es una especie muy trepadora que crece en forma vigorosa; y algunos la consideran una especie invasora. Se reproduce fácilmente por esquejes, es tolerante al frío, resistente al oídio y a la agalla de corona (crown gall, *Agrobacterium* sp.), poco resistente a la filoxera y sensible al mildiu, la pudrición negra (black-rot, *Guignardia bidwelli*) y a la enfermedad de Pierce (*Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa*). Tiene poca tolerancia a la cal, prefiriendo suelos ácidos, y desarrolla bien en suelos húmedos a arenosos, al borde de cursos de agua o en zonas de agua poco profunda. Se caracteriza por sus hojas grandes y gruesas, con la superficie superior verde opaca y envés pubescente. Produce bayas grandes (mayor de 10 mm) con hollejo grueso que se desprende fácilmente de la pulpa, y con bajo contenido de azúcar. Las bayas tienden a caer cuando maduran, especialmente si el tiempo es lluvioso. *V. labrusca* fue

una de las primeras especies de vid americana que migró a Europa a principios del siglo XVII, llevada por coleccionistas y jardineros reales debido a la estética de su follaje y frutos (André et al., 2017).

El término “fox grape” (uva zorro) con el que se denomina a *V. labrusca* tiene un significado poco claro. El origen del nombre se remontaría a principios del 1700, cuando los colonos nombraron fox a ciertas vides americanas (Acree, 1981). Pinney (1989) analizó diferentes opciones del significado del término fox, entre ellos: el olor a zorro, la apariencia pubescente y el color del envés de la hoja, la preferencia de los zorros por consumir sus bayas comparadas con la de otras especies de vid, etc., pero no llegó a una conclusión definitiva. A pesar de su significado difuso, con el tiempo se aceptó que fox hace referencia a una cualidad sensorial de la uva o el vino. Así, los términos “fox”, “foxy” o “foxiness”, a veces generalizados como flavor labruscano, quedaron plasmados en la literatura científica y comercial como un término general para referirse a la percepción olfativa/gustativa que se manifiesta al consumir las bayas y/o los vinos de ciertas variedades de uvas derivadas principalmente de *V. labrusca* o *Muscadinia rotundifolia*, y que puede ser descripta como una combinación de almizcle (musk), sabor terroso y notas algo dulzonas (Munson, 1909; Acree, 1981).

El carácter sensorial de un alimento o bebida es el resultado de una compleja interacción entre varios componentes. El impacto de dichos componentes en el flavor puede evaluarse mediante el valor de la actividad odorífica (odor active value, OAV), que relaciona sus concentraciones en el alimento con el umbral de detección (DT, Detection Threshold). El umbral de detección de un determinado compuesto depende de sus propiedades, pero también de la interacción con otros componentes del medio, es el llamado efecto matriz. En base a estos conceptos, diversos estudios han relacionado el carácter foxy con la presencia de compuestos como el antranilato de metilo (AM), 2-aminoacetofenona (2-AAF) y el furaneol (2,5-dimetil-4-hidroxi-3(2H)-furanona, HDMF), denominado también furanona de fresa o frutilla (Figura 2.5).

compuesto	estructura	aroma
Antranilato de metilo (AM)		Foxy
2-aminoacetofenona (2-AAF)		Foxy
Furaneol		Caramelo/frutilla

**Figura 2.5.** Estructura de compuestos que han sido asociados al flavor foxy.

En realidad, se considera al AM y 2-AAF los principales compuestos responsables del carácter foxy (Nelson et al., 1977; Acree et al., 1990; Baek et al., 1997; Wang & De Luca, 2005; Panighel et al., 2010), mientras que el furaneol contribuiría a la matriz afrutada o acaramelada (candy) que acompaña a la uva y vinos con estas características (Rapp et al., 1980; Guedes de Pinho & Bertrand, 1995; Baek et al., 2006, Bates, 2019). El AM no es exclusivo de las uvas foxy, sino que está presente en numerosas especies vegetales; por ejemplo, junto al terpeno R (-) linalool, son los dos compuestos claves del flavor del té de jazmín (*Jasminum sambac*) (Ito et al., 2002). Los DTs de AM y 2-AAF en una matriz de vino blanco (white Rieslig) se han estimado (valor medio) en 45 y 10,5 µg/l respectivamente (Perry & Hayes, 2016).

El aporte del furaneol depende de su concentración, ya que en bajas concentraciones tiene flavor a frutilla, y en altas concentraciones lo tiene a caramelo, semejante al algodón de azúcar (Pérez and Sanz, 2008). Al igual que el AM, el furaneol no es un componente exclusivo de las uvas foxy, ya que también contribuye al aroma frutal de algunos vinos de *V. vinifera* (Genovese et al., 2005). El DT del furaneol es del orden de 25-40 µg/l en agua o un vino modelo (Ong & Acree, 1999; Kotseridis et al., 2000). Si bien es probable que otros compuestos contribuyan al carácter foxy, es interesante resaltar que especies de vides americanas que no son catalogadas foxy, como *V. riparia* y *V. cinerea*, solo contienen ínfimas concentraciones de AM y 2-AAF (Sun et al., 2011).

La presencia del flavor foxy o tipo labrusca es una de las principales objeciones que se le hacen a los vinos elaborados con uvas derivadas de *V. labrusca*. En un

trabajo muy interesante desarrollado por Perry et al. (2019), se determinó el nivel de rechazo/aceptación de un vino Chardonnay al cual le adicionaron concentraciones crecientes de AM o 2-AAF. El estudio se llevó a cabo en dos lugares diferentes: California, donde no se consume vinos obtenidos con variedades labruscanas de vid, y Pensilvania, donde es habitual consumirlos. En California el estudio se llevó a cabo con un panel de participantes expertos y no expertos en vino, mientras que en Pensilvania sólo hubo participantes no expertos. Contrariamente a lo esperado, en ambas regiones los vinos a los cuales se agregó 2-AAF no provocaron el rechazo de los consumidores dentro del rango probado. Con respecto al AM, los resultados sugirieron que los factores que pueden influir en la aceptabilidad de los vinos que contienen el odorante son múltiples: experiencia y nivel de interés de los participantes en vinos, el gusto de los consumidores por otros productos con sabor a uva y la exposición/familiaridad con el flavor labrusca. La tendencia mostró que los consumidores no expertos en vino de California fueron más tolerantes al AM que los expertos, mientras que en Pensilvania el agregado de AM al vino no modificó las preferencias de los participantes no expertos. Globalmente, el estudio mostró que independientemente de su experiencia en vinos, una de cada 5 personas no encontraron ofensivo el aroma producido por el antranilato de metilo agregado al vino. Si bien el estudio tuvo ciertas limitaciones, se puede inferir que el flavor labrusca no necesariamente es rechazado en los vinos y es tolerable para un cierto tipo de consumidores, contrariamente a la opinión generalizada de los enólogos expertos en vinos de *V. vinifera*.

## **2.5. Los híbridos de la primera mitad del siglo XIX en América del Norte y el origen de la uva Isabella.**

Los primeros colonos europeos que se asentaron en la costa atlántica de América del Norte, a principios del siglo XVII, quedaron sorprendidos por la profusión de vides silvestres que encontraron. Para esos colonos la vitivinicultura fue un objetivo oficial establecido en sus cartas de fundación, por lo tanto, se dedicaron a producir vino como parte de su actividad económica, en un principio, con las vides nativas americanas (Pinney, 1989). El primer vino se remonta a fines del siglo XVI, y fue elaborado en una colonia cercana a lo que es actualmente la ciudad de Florida, con uvas de *M. rotundifolia* (scuppernong grapes) (Olien, 1990). A pesar de la abundancia de vides nativas, para los colonos los vinos elaborados con las uvas americanas resultaron sensorialmente extraños al compararlos con los vinos de *Vitis vinifera* que

producían en su tierra de origen, por lo que decidieron importar variedades de vides europeas para vinificar. Sin embargo, la *V. vinifera* no resistió el clima severo de la región y las plagas nativas y no prosperó (Lukacs, 2010). La situación comenzó a cambiar cuando se descubrieron ciertas variedades híbridas que producían uvas con aceptable calidad enológica. Los primeros híbridos surgieron del cruzamiento natural entre especies americanas y las especies de *V. vinifera* que habían sido importadas de Europa (Hedrick et al., 1908).

Los principales híbridos de importancia enológica descubiertos en la primera mitad del siglo XIX en América del Norte derivaron de la especie *V. labrusca* (André et al., 2017). Estas variedades híbridas adquirieron un carácter hermafrodita (muy importante para la producción regular de vino) manteniendo ciertos rasgos de los progenitores. Con fines taxonómicos se las agrupó en la serie *V. labruscana* Bailey (Bailey, 1934). El primer híbrido de importancia comercial fue Alexander, descubierto en Filadelfia por el jardinero del gobernador de Pensilvania en 1740, en un viñedo donde se había intentado cultivar *V. vinifera*. Alexander fue el resultado de un cruzamiento natural entre *V. labrusca* y una variedad desconocida de *V. vinifera*. Estudios genéticos recientes confirmaron que Alexander tiene un 50% de ascendencia *V. vinifera* (Sawler et al., 2013). Alexander fue la base de la primera industria vitivinícola exitosa de América del Norte, y sus vinos tuvieron gran difusión entre fines del siglo XVIII y principios del XIX (Pinney, 1989). En 1801 se descubrió en el sudoeste de Carolina del Norte la variedad Catawba, un híbrido de *V. vinifera* con *V. labrusca*, con fuerte carácter floral. La misma fue promovida por John Adlum (1759-1836), pionero de la viticultura americana, quien distribuyó esquejes a varios productores a principios de 1820 (Freeman Hunt, 1855). El porcentaje de ascendencia *V. vinifera* de Catawba ha sido estimado en un 50% (Sawler et al., 2013), y en un estudio reciente se determinó que Catawba tiene como progenitor la variedad de *V. vinifera* "Semillón", originaria de la región de Bordeaux, Francia (Huber et al., 2016). Según Bailey (1934), Catawba fue la "primera gran uva americana", destacándose en la historia del vino americano por sus vinos espumantes producidos por la bodega Longworth de Ohio, que adquirieron notoriedad en California y Europa (Lukacs, 2000).

En la misma época que Catawba se descubrió la Isabella, la cual se habría originado en Dorchester, Carolina del Sur (Spooner, 1858), pero otras versiones indican que la variedad fue cultivada en varios vecindarios a fines del siglo XVIII antes de llegar a Carolina, y su verdadero origen geográfico se desconoce (Hedrick, 1908). Algunos relatos sugieren que la variedad llegó a Carolina del Sur proveniente de

España (Bailey, 1906), esto supone que la *V. labrusca* estaba ya presente en dicho país a finales del siglo XVIII, pero esta versión nunca fue confirmada. La historia de la Isabella desde su descubrimiento hasta su llegada a Nueva York a principios del siglo XIX ha sido descrita por diferentes autores, pero todos se basan en la misma fuente. Un resumen de esa historia se encuentra en Browne (1846), basada en el relato del Gral. J. Swift, confirmada posteriormente por el mismo Swift (1858). El nombre original con el cual se denominó la variedad se desconoce. De acuerdo al relato, el abogado y cultivador Benjamin Smith (1756-1826), quien fuera gobernador de Carolina del Norte en 1811, llevó en 1808 esquejes de esta vid desde Dorchester a su jardín en Smithville (Southport desde 1887), en Carolina del Norte. Posteriormente, en 1817, la Sra. Isabella Gibbs llevó muestras provistas por Smith a su casa de Brookling, Nueva York, propiedad de su esposo, el coronel George Gibbs, un cultivador y mejorador aficionado. La casa fue comprada en 1819 por el Gral. Swift, quien al igual que lo hecho por la Sra. Gibbs, distribuyó esquejes a varios vecinos y al vivero Linnaean Botanic Garden, propiedad de William Robert Prince (1795-1842), situado en Flushing (Long Island), Nueva York. A W. A Prince se le atribuye haber nombrado a la vid Isabella en honor a la Sra. Gibbs, y ser además el verdadero propulsor de la variedad, ya que la distribuyó no solo en el vecindario, sino también por diferentes regiones de Estados Unidos, e incluso envió esquejes a varios países en Europa. W. Prince fue un prestigioso viverista que escribió el primer tratado del cultivo de vid en su país (“A treatise on the vine”, Prince, 1830). En la Figura 2.6 se puede observar la página del tratado donde Prince dibujó a la Isabella. Además, en la Figura 2.7 se muestra la tapa del catálogo del vivero de W. Prince de 1820, con Isabella en la lista de venta y comentarios sobre su origen y cualidad para hacer vino e incluso brandy. Isabella tuvo una gran aceptación y proliferó en jardines, patios y glorietas debido a su frondoso follaje y los atractivos racimos de uvas, características heredadas de la *V. labrusca*. De igual manera, los viñedos de Isabella se extendieron para la producción de vino y consumo de la uva en fresco.



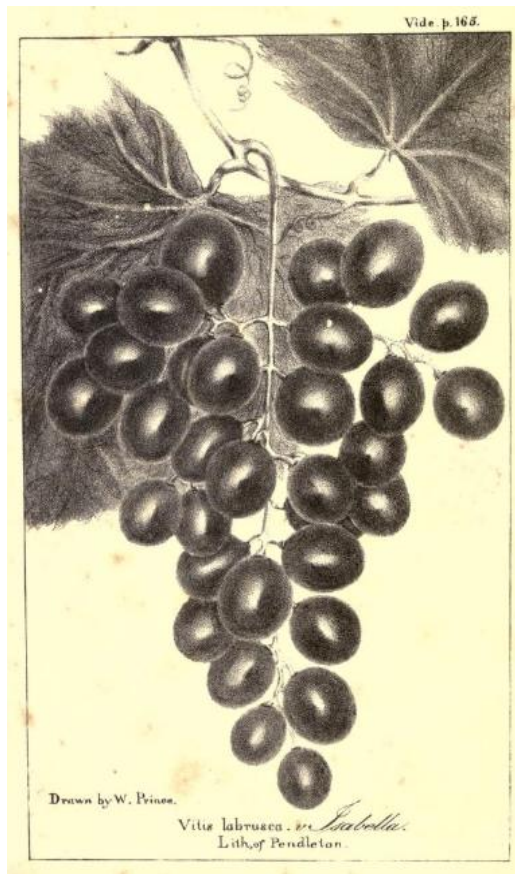


Figura 2.6. Página del tratado de vino de Prince (1930), donde se encuentra dibujada la uva Isabella.

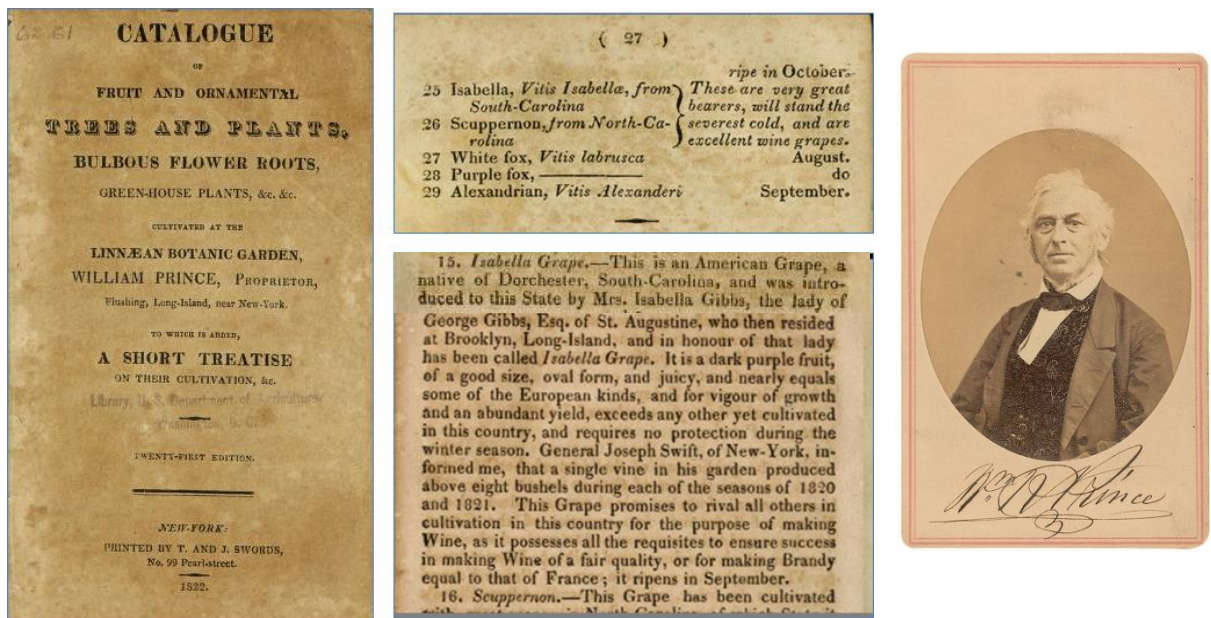


Figura 2.7. Catálogo del vivero de W. Prince en el cual se menciona y describe a la Isabella y retrato de W.R.Prince (<https://archive.org/details/catalogueoffruit1822wmp>).

Tanto Isabella como Catawba dominaron la viticultura en la costa este de Estados Unidos durante la primera mitad del siglo XIX, antes de la Guerra de Secesión. Isabella predominó en el noreste (Nueva Inglaterra y estados del Atlántico Medio), mientras que Catawba fue la uva preferida en los estados del Atlántico Sur. La importancia de estas variedades para elaborar vino disminuyó considerablemente al ser paulatinamente reemplazadas por la variedad Concord, descubierta en 1849 por Ephraim Wales Bull (1806-1895) en Concord, Massachusetts, luego de experimentar varios años con injertos de *V. labrusca* (Hedrick, 1908). Concord sería descendiente de Catawba y una cepa de *V. labrusca* desconocida (Huber et al., 2016). Su ascendencia vinífera ha sido estimada en un 30% (Sawler et al., 2013). En 1835, el estudiante Hugh White descubrió en el estado de Nueva York el cultivar Clinton, un híbrido entre *V. riparia* y *V. labrusca* con un fuerte carácter foxy, que en cierta bibliografía es confundida con la uva Fragola, nombre con el cual se denomina Isabella en Italia. En la actualidad, Concord sigue siendo la vid híbrida más cultivada fuera de California, en particular en los estados de Washington y Nueva York, mientras que la Isabella se cultiva marginalmente en algunas regiones del estado de Nueva York (Robinson, 2012; Godbout, 2012). Concord es ampliamente utilizada en la elaboración de jugos y mermeladas, y es la típica referencia de uva foxy. De hecho, se han detectado en jugos de esta variedad concentraciones de antranilato de metilo del orden de 1400 µg/l, una concentración 30 veces superior al umbral de detección (Rice, 1974)

Originariamente se consideró a Isabella como una variedad de *V. labrusca* (*V. labrusca*. var. Isabella), pero debido a ciertos rasgos botánicos las opiniones se volcaron a definirla como una variedad híbrida. Según Swift (1858), Isabella es un híbrido natural de la fox nativa y una *V. vinifera* oriunda de Burgundy, una región del este de Francia. La *V. vinifera* habría sido llevada por los hugonotes (protestantes franceses) durante su migración de Europa a Carolina del Sur, entre 1680 y 1688, atraídos principalmente por la promesa de tierras baratas, oportunidades comerciales y libertad religiosa (Van Ruymbeke, 2006). De igual modo, Munson (1909) la registró como una cruce aleatoria de *labrusca* x *vinifera*, y la describe con flores perfectas, lo que en principio prueba que no es una simple variante de *V. labrusca*, ya que todas las vides americanas nativas son dioicas.

En la Figura 2.8 se muestran racimos típicos de los híbridos Catawba y Concord, y en la Figura 2.9 un documento relacionado con Isabella que demuestra su popularidad en los estados del Atlántico Medio de Estados Unidos en la primera mitad

del siglo XIX. En la Figura 2.10 se presenta un esquema del proceso evolutivo del género *Vitis*, y la aparición de la Isabella como un híbrido natural entre *V. labrusca* y una especie de *V. vinifera* subsp sativa. En la Figura 2.11 se pueden apreciar imágenes de vides de distinto origen.

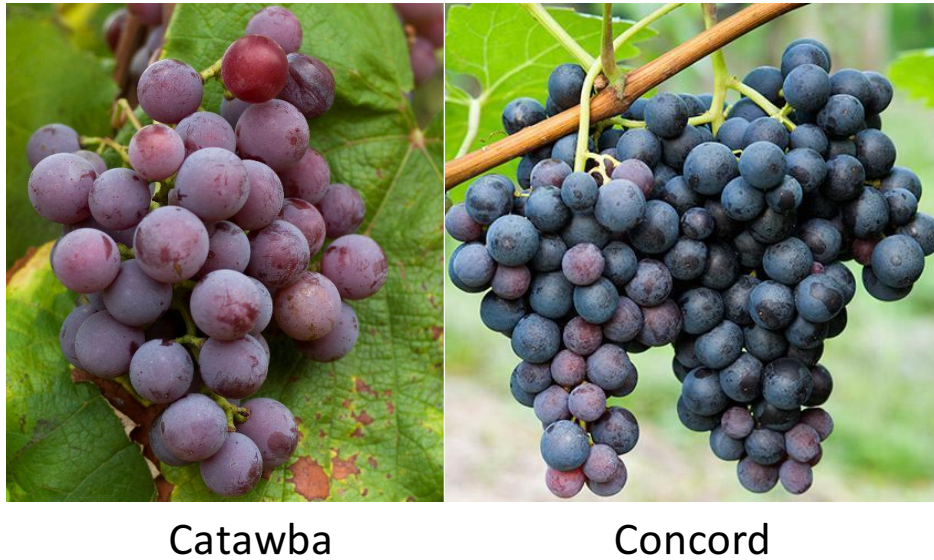


Figura 2.8. Híbridos americanos de *V. labrusca* x *V. vinifera*.

**Isabella and Catawba Grape Vines.**

**OF PROPER** age for forming Vineyards, cultivated from and containing all the good qualities which the most improved cultivation for over fifteen years has conferred on the Croton Point Vineyards, are offered to the public. Those who may purchase will receive such instructions for four years, as will enable them to cultivate the Grape with entire success, provided their locality is not too far north. All communications addressed to R. T. UNDERHILL, M. D., New-York, or Croton Point, Westchester County, N. Y., will receive attention. The additional experience of three past seasons, gives him full assurance that by improved cultivation, pruning, &c., a crop of good fruit can be obtained every year, in most of the Northern, all the Middle, Western and Southern States.

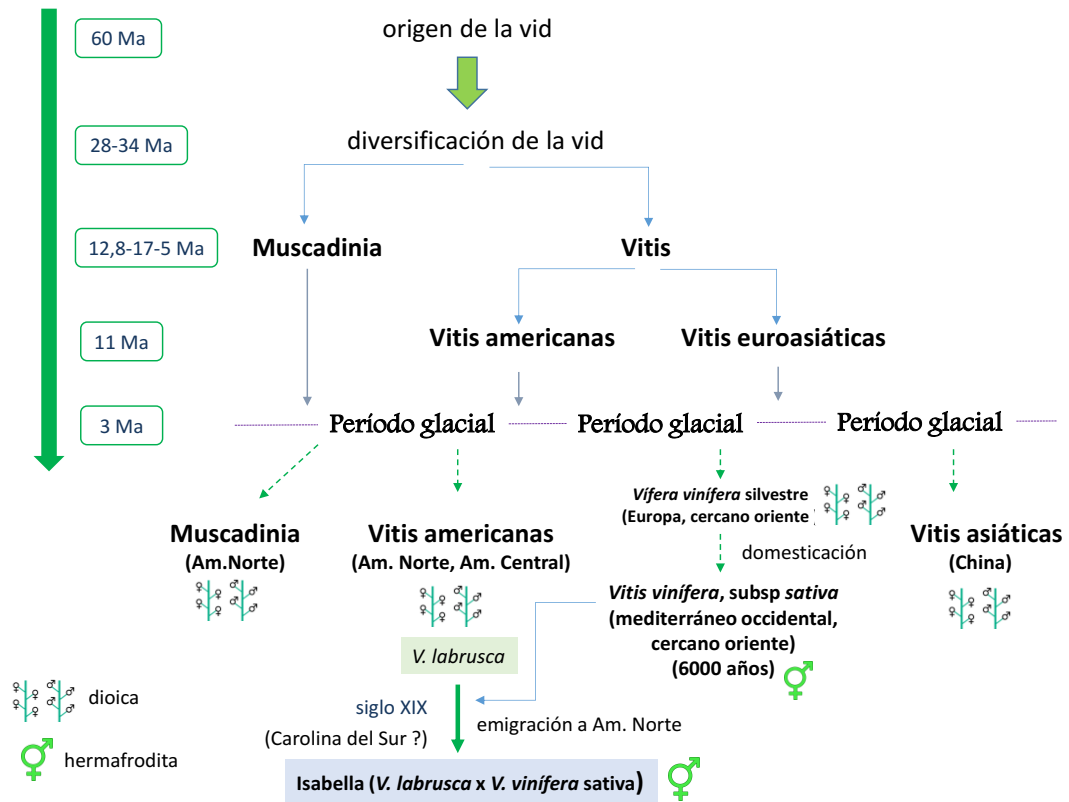
Also, Apple and Quince Trees for sale as above.

N. B.—To those who take sufficient to plant six acres, as he directs, he will, when they commence bearing, furnish the owner with one of his Vinedressers, whom he has instructed in his mode of cultivation, and he will do all the labor of the vineyard, and insure the most perfect success. The only charge, a reasonable compensation for the labor.

R. T. U.

Figura 2.9. El viñedo de 75 acres de la familia Underhill en Croton Point que suministró a la ciudad de Nueva York uvas Isabella y Catawba durante 6 décadas (1804-1873). (Cascless, J. S; <https://hvwinemag.com/story-behind-benmarl-winery/>)





**Figura 2.10.** Evolución del género *Vitis* y el origen de Isabella (*V. labrusca* x *V. vinifera*). Ma: millones de años.



**Figura 2.11.** Imágenes de vides de diferente origen.

## 2.6. La migración de Isabella desde América del Norte hacia Europa, Asia y Oceanía.

A principios del siglo XIX se desarrolló un flujo creciente de plantas de América y otras partes del mundo a Europa, motivada por el interés de botánicos y clases altas de tener plantas exóticas y variadas para sus jardines botánicos y paseos. En 1820, el jardinero y horticultor Joseph-Bernard Bauman importó "Isabella", probablemente del Linnaean Botanic Garden de W. Prince, para su vivero en Bolwiller (Alsacia, Francia), atraído por las características estéticas de su follaje, y sus racimos de uvas frambuesas. La uva fue difundida con el nombre de "Raisin du cap". (Christnacher et al., n.d), y con el tiempo se empleó para elaborar vino. Alrededor de 1830, en algunos viveros del este y sureste de Francia se incluía Isabelle o *V. isabelleae* en los catálogos de flores y frutos (Mabberley, 1999). También hay reportes de elaboración de vinos en el Departamento de Haérault, donde se menciona que los vinos de Isabella mejoran con la edad de la viña (Dion, 1970). En 1825 llegó a Italia, donde se la cultivó con el nombre de uva Fragola, principalmente en la región norte del país (Friuli-Venecia-Julia, Véneto, Piamonte) (Rorato, 2009). Desde Francia llegó a Odessa, y de ahí a las regiones situadas en las costas del mar Negro en Turquía y Georgia, como así también Azerbaiyán y Moldavia (Atlas: Izabella, 2012). En Georgia se la conoce como uva Odessa. A Rusia llegó promediando el siglo XX, cultivándose no solo en las regiones cálidas del sur, sino también en la región de Moscú. El poeta ruso Osip Mandelstam describió a Isabella como "carnosa y pesada como un racimo de la noche misma" (Goldstein, 1958). En 1850 fue introducida en las islas Azores (Frankel, 2019) y Hawaii (Love & Paull, 2014). En India, la información sobre Isabella es algo confusa. Según Shikhamany, (2011), la uva Bangalore Blue es un sinónimo de Isabella, pero de acuerdo a Upadhyay (2013), Bangalore Blue deriva de Pierce, un mutante de Isabella obtenido en 1882 por un mejorador privado (Maul et al., 2019). Bangalore blue es ampliamente cultivada desde hace 150 años en las regiones tropicales suaves del sur de India, como Bangalore, en el estado de Karnataka. En Australia, los primeros viñedos de Isabella se instalaron en la zona de Puerto Macquarie, en la costa norte de Nueva Gales del Sur, en 1860. El viñedo más famoso de la región fue Douglas Vale, cuyos vinos de Isabella ganaron premios en diferentes concursos internacionales entre 1882 y 1886 (Honan, 2013). Su producción se discontinuó en 1918. Actualmente, Douglas Vale es un centro turístico que produce vino de Isabella fortificado utilizando plantas jóvenes de Isabella, pero también algunas que datan de 1900.

El itinerario de Isabella durante su expansión por Europa no es del todo claro. A partir de 1850 Isabella fue muy apreciada debido a su resistencia al oídio (Ravaz, 1902), y su cultivo se expandió rápidamente a diversas regiones para mantener la producción de vino. Un caso típico fue Portugal, donde Isabella fue plantada principalmente en el norte del país, en las regiones de Minho y Douro Litoral. Con el tiempo, la gente de esos lugares se acostumbró a beber en las tavernas el americano o morangueiro (de morango, fresa en portugués) (Mayson, 2020).

El cultivo de Isabella, al igual que otros HPD americanos, comenzó a decaer a fines del siglo XIX, cuando la filoxera se propagó por Europa, ya que era una variedad tolerante a la plaga, pero no totalmente inmune. La recuperación de los viñedos de vid europea debido a la aplicación de fungicidas y el desarrollo de los portainjertos, fue quizás el comienzo del declive de los híbridos productores directos de primera generación cultivados en Europa. En ese contexto, los viñateros locales para restaurar el predominio de las vides europeas en el mercado del vino, lograron con el transcurso del tiempo que los híbridos americanos se erradicaran y fueran prohibidos. Para lograr dicho fin, se emplearon argumentos inexactos, como fue la presencia de altos niveles de metanol en los vinos de los híbridos. Es notorio que aún hoy perdura la polémica por el contenido de metanol en los vinos de Isabella, como se evidencia en una nota sobre el “morangueiro”, hecho que debe ser atribuido a la falta de conocimiento del autor sobre el tema (O Correio-Mor, 2015). Un lector anónimo respondió así a los cuestionamientos que se hicieron al vino:

*Vivo en Serra do Caramulo. Aquí siempre se ha cultivado el "vino americano". Incluso hoy en día, muchas personas fabrican su propia pipa de vino. Por supuesto que es vino... así que el vino no se hace con uvas.*

*Si el proceso se hace bien, los vasos son buenos, se obtiene un buen producto final.*

*Puro...orgánico...refrescante...bajo en alcohol.*

*En cuanto a su daño, diré que: Conozco personas que bebieron este vino toda su vida y no les pasó nada malo por eso.*

*Y otro detalle: no es obligatorio beber.... SÓLO BEBE QUIEN QUIERA.*  
(Traducido del portugués) (O Correio-Mor, 2015)

Otro argumento para restringir el cultivo de los híbridos, quizás el más importante, fue su calidad comparada con los vinos de *V. vinifera*. La realidad es que son vinos diferentes y que la cuestión sensorial o los gustos por un determinado vino, no pueden ser considerados de manera absoluta. Las restricciones al cultivo de

Isabella se intensificaron a partir de 1930, en particular en Francia e Italia; no obstante, la pequeña producción familiar continuó sin grandes impedimentos, incluso después de 1979, cuando la Comisión Europea del mercado vitivinícola excluyó a Isabella y otros híbridos productores directos de primera generación de la lista de variedades de vid autorizadas para elaborar vino (De Martino, 2008). En la Figura 2.12 se muestran las variedades “prohibidas” como Noah, Othello, Isabelle, Jacquez, Clinton y Herbemont.



**Figura 2.12.** Frutas prohibidas. ARCHE NOAH. Bruselas, Viena, 2017. [https://www.arche-noah.at/files/arche\\_noah\\_study\\_-\\_forbidden\\_fruits.pdf](https://www.arche-noah.at/files/arche_noah_study_-_forbidden_fruits.pdf)

La plantación de HPD está prohibida por la Unión Europea, pero en la práctica el cultivo de Isabella es tolerado y la uva se destina a la elaboración de jugos, mermeladas y vinos en países como Georgia, Ucrania, Moldavia y Azerbaiyán (Tischelmayer, 2019, Gaina et al., 2020), en ciertas regiones de Austria, sur de Suiza e Italia (Gessler et al., 2006; Robinson et al., 2012), en la región del mar Negro en Turquía (Kurt-Celebi., et al 2020), sudoeste de Rusia, Madeira, norte de Portugal e islas Azores. Con la uva Isabella se elaboran vinos que se producen en cantidad limitada y se consumen preferentemente a nivel local. Los vinos de Isabella pueden ser secos, dulces o espumantes, con un contenido de alcohol típico del 10%, y todos se caracterizan por el flavor afrutillado que le transmite esta variedad de uva, algunos

ejemplos son: el tradicional Fragolino<sup>1</sup> (que se produce en la región del Véneto en Italia; a Proibida<sup>2</sup>, que es un vino 100% Isabella, considerado como un vino con tradición, rústico “de la casa”, de la isla de Pico (Azores, Portugal); los vinos semidulces del sudoeste de Moldavia como Bostava<sup>3</sup> de la región de Etulia y Old-Tavern<sup>4</sup> de Taraclia y los semidulces y secos de Abjasia como el Lykhny<sup>5</sup> o bien secos como el Radeda<sup>6</sup> (Figura 2.13).



**Figura 2.13.** Vinos elaborados con uva Isabella (Abjasia, Moldavia, Islas Azores e Italia).

## 2.7. La llegada de Isabella a América Latina.

Las regiones de América del Sur con clima húmedo, tropical o subtropical, fueron una oportunidad para el cultivo de Isabella, que llegó a América Latina desde Europa de la mano de los inmigrantes, y se convirtió en la variedad más cultivada en Brasil, Perú y Colombia. En Brasil, “Isabel” tuvo dos orígenes: a principios del siglo XIX, cuando fue llevada por el agricultor inglés John Rudge (1792-1854) a São Paulo y de ahí a Rio Grande do Sul en 1840 (César & Tronca, 2020); y alrededor de 1875, con el gran aporte de la inmigración italiana proveniente principalmente de Lombardía y Véneto, pero también de Trentino y Friuli, que se asentó directamente en la Sierra

<sup>1</sup> <https://www.vinello.es/fragolino-wines/fragolino-rosso-terre-del-sole>

<sup>2</sup> <https://www.winedeals.com/azores-wine-company-isabella-a-proibida-2017-750-ml-90567>.

<sup>3</sup> <https://www.vivino.com/PT/en/bostavan-isabella-red-semi-sweet/w/2045314>

<sup>4</sup> <https://www.worldofliquor.com/wines/Asconi-Old-Tavern-w01123709r>

<sup>5</sup> <https://abkhazworld.com/aw/abkhazia/wine-spirits-of-abkhazia/1044-lykhny-red-medium-sweet>

<sup>6</sup> <https://abkhazworld.com/aw/abkhazia/wine-spirits-of-abkhazia/1047-radeda-red-dry>



Gaúcha, en el noreste de Río Grande do Sul, (Majo & Moretto, 2021). A las pocas décadas de su introducción, el vino de Isabella pasó a ser conocido oficialmente como “vinho de colônia” (De Majo & Relly, 2020). Actualmente, “Isabel” se cultiva preferentemente en los estados del sudeste de Brasil: Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo y Minas Gerais (Arcanjo, 2015); pero también en regiones del noreste, como Pernambuco (Nunez et al., 2016). En 1993 se descubrió en el Municipio de Farroupilha un clon de Isabel surgido por una mutación somática, al que se denominó Isabel Precoce (Camargo, 2004). Este clon se propagó con fines comerciales, y presenta algunas ventajas desde el punto de vista agronómico y de composición de la uva para jugo o vino (Passaia et al., 2014). El 80% de la producción de Isabel en Brasil (260 millones de kg en 2017) se destina a la elaboración de jugo (Melo & Machado, 2018), y el resto a vinificación junto a la variedad IVES. Los vinos elaborados con estas variedades híbridas suelen combinarse, y representan aproximadamente el 80% de la producción total de vinos de mesa de Brasil (Biasoto et al., 2014).

En Colombia, el cultivo de la vid se extendió tardíamente, ya entrado el siglo XX, alrededor de 1925. Isabella se cultiva principalmente en la región suroeste, en los Departamentos Valle del Cauca y Huila, y en el norte en el Departamento de Santander (Merchan et al., 2015). El Valle del Cauca es el principal productor de uva Isabella, con 1551 ha cultivadas y hasta 2 cosechas anuales. Una gran parte de la uva se destina a jugo, y el resto es vinificado por viñateros artesanales y por bodegas modernas, como PDC Vinos y Licores (Casa Domecq) (Polo, 2014) y Casa Grajales. Cabe mencionar que el brandy de Isabella elaborado por estas empresas ha alcanzado reputación internacional (Nuñez, 2016).

El comienzo de los cultivos de Isabella en Perú se desconoce; en este país se la denomina uva Borgoña, y se emplea para elaborar el popular vino dulce que lleva su nombre (Ramírez, 2017), que representa el 60,8% del total de vino consumido en el país (Gennari y Estrella, 2015). La Isabella se cultiva preferentemente en las provincias del sur de Lima, como Cañete, y en el departamento de Chincha, situado al norte de la provincia de Ica, y en menor proporción en Arequipa, Moquegua y Tacna. Los vinos de Isabella que se destacan son producidos por Bodegas y Viñedos Taberner, Santiago Queirolo, Viña Los Reyes, entre otras.

En Uruguay, la Isabella se denomina uva Frutilla, y su mayor desarrollo probablemente ocurrió en la primera mitad del siglo XX. A partir de 1970, los viticultores uruguayos se volcaron decididamente a las variedades de *V. vinifera* y a

consolidar su variedad insignia Tannat, pero el cultivo de uva frutilla subsistió. En 2018 se registraron unas 76 ha cultivadas de uva frutilla, que representan el 1,2 % de la uva total producida (INAVI, 2018). En el año 2015, Bodegas Bauza sacó al mercado un vino clarete tradicional elaborado con esta variedad de uva (Etchandy, 2015).

## **2.8. La uva Isabella en Argentina.**

Entre los miles de inmigrantes que llegaron a la Argentina desde mediados del siglo XIX, los italianos fueron los más numerosos, representando alrededor del 50% del total (Devoto, 2008). Desde mediados del siglo XIX hasta la década de 1880, los campesinos italianos del norte, especialmente piemonteses, lombardos, ligures y friulianos, emigraron a Argentina con la esperanza de convertirse en propietarios de colonias agrícolas. La llegada de inmigrantes fue estimulada por la sanción de la Ley de Inmigración en 1876 durante el gobierno de Nicolás Avellaneda. De los miles que llegaron, muchos regresaron, pero el saldo fue altamente positivo. Dada la gran tradición vinícola del norte de Italia, era razonable que aquellos inmigrantes que lograron asentarse para cultivar la tierra pusieran en práctica el oficio de viñateros. En 1878, Isabella arribó a Córdoba de la mano de inmigrantes friulianos, que fundaron lo que actualmente es Colonia Caroya (Colmenarejo, 2017). La uva de Caroya la denominaron frambua por su flavor característico, y el vino elaborado con esta uva fue adquiriendo con el correr de los años una fuerte identidad territorial. En el año 2017, los viñedos de Caroya fueron declarados patrimonio cultural y natural (Tabbia, 2018). En 2019 aparecieron nuevos productos de la uva frambua: el espumante elaborado por el método champenoise, y hasta un helado comercializado en la ciudad de Villa Allende (Roggio, 2019). De la misma época que Colonia Caroya datan los viñedos que se instalaron en Misiones, donde localmente la uva Isabella se denominó “francesa”, porque en un principio fue introducida desde una zona de Brasil donde había una colonia de franceses que la utilizaban para hacer vino. El auge de la Isabella en Misiones se dio a mediados del siglo XX, donde se llegó a contar con una Cooperativa Vitivinícola en el Alto Paraná (Bakos, 2015).

Las primeras vides de Isabella que llegaron a las costas de Río de La Plata y zonas aledañas, se plantaron en el partido de Quilmes y lo que es actualmente el partido de Avellaneda. La implantación de Isabella bajo el sistema de parral se adaptó sin problemas al ambiente costero del Río de La Plata, y los viñedos pasaron a formar parte del paisaje rural, junto a otros cultivos típicos de las quintas como las hortalizas y frutales. En esta región, es común nombrar la Isabella como “uva chinche”. En

Quilmes, el inicio de la actividad vitícola se debió a Andrés Rosso, un inmigrante italiano proveniente de Cuneo, región del Piamonte, quien en 1875 plantó en Ezpeleta las primeras 12 ha de viñas, y con el tiempo llegó a cubrir una extensión de 45 ha (Agnelli, 2009). Su bodega contigua al viñedo logró producir en 1909 unos 300.000 litros de vino (Ospital, 2003). La variedad más cultivada por Rosso fue Isabella, y en menor proporción otras variedades importadas de Italia y Francia. Para esa misma época, inmigrantes del norte de Italia, los ligures, instalaron viñedos de Isabella en el partido de Barracas al Sud (luego partido de Avellaneda), en la zona de Villa Domingo y Sarandí (Cortes, 2015). En 1890, funcionaba entonces una bodega propiedad de Ernesto Paissan (Aboitiz, 2016). En Quilmes, no existen vestigios de la actividad vitivinícola (Agnelli, comunicación personal), pero en Sarandí aún subsisten pequeños cultivos de Isabella mantenidos por los descendientes de italianos que plantaron las primeras vides (Moyano y Guerra, 2016; Gray, 2019). En una interesante entrevista que realizó Turone (El vino de la Costa, n.d) con bisnietos de los primeros inmigrantes, se cuentan detalles de la historia del cultivo de Isabella y de la elaboración de vino en Villa Domingo, Partido de Avellaneda. En un trabajo reciente se detallan aspectos productivos e históricos del vino de la Costa en la misma localidad, haciendo hincapié en la valorización turística de la región (Harsich, 2021).

En la zona norte de la Capital Federal, en las inmediaciones del pueblo de Escobar, se desarrolló una explotación agropecuaria mixta propiedad de Tomás Márquez, que incluyó 30 ha de Isabella (Ospital, 2003). La bodega, instalada en 1895, tenía una capacidad de 160.000 litros y contaba con cubas de roble de 1000 y 3000 litros. El vino tenía prestigio y se vendía a no menos de 30 centavos el litro, en un amplio mercado que abarcaba Baradero, Campana, Ramallo y la ciudad de Buenos Aires (Expreso del Tiempo, 2011).

Al igual que en Quilmes y Avellaneda, Isabella llegó a la costa ribereña del incipiente Partido de Berisso, de la mano de los inmigrantes. No se encontraron registros históricos precisos del origen de la vitivinicultura en la costa de Berisso, pero de acuerdo a Raúl Ricci (1932-2019), su abuelo Pietro Ricci (1857-1921) instaló los primeros viñedos en la zona de Palo Blanco a fines del siglo XIX, en tierras que se lotearon en 1887 bajo el nombre de Villa Banco Constructor (Sayavedra, 2017). Marcela Ricci, sobrina de Raúl, contó con mayor detalle que su bisabuelo Pietro llegó a Buenos Aires el 6 de noviembre de 1885 a bordo del buque Bisagno, procedente de Génova, para trabajar en la construcción del puerto de La Plata. Posteriormente, y luego de dedicarse a otras labores, como el acopio de leña y el trabajo en el saladero,

compró las tierras en Palo Blanco instalando viñedos de Isabella y plantaciones de mimbre. Algunas versiones indican que los esquejes de sarmientos de Isabella fueron traídos en barcos insertados en una papa para su conservación durante el viaje (Figura 2.14). Sin embargo, no debe descartarse que las primeras vides que se introdujeron en Berisso hayan provenído de viñedos ya instalados en zonas cercanas como Avellaneda y Quilmes.



**Figura 2.14.** Talea de Viti inserta en una patata per conservame l’humiditá durante el viaggio. (Cristaldi et al., 2015, pág. 22).

Con la uva Isabella se elaboró en Berisso, Quilmes y Avellaneda el llamado “vino de la Costa”, o vino de la “viña”. El vino de la Costa es un producto con identidad, y culturalmente muy aceptado, cuya historia se entremezcla con el desarrollo social, económico y cultural de la región, habiendo adquirido particular relevancia en la localidad de Berisso (Velarde, 2010).

### **2.9. Isabella en Berisso: más de un siglo de historia del Vino de la Costa.**

La evolución de la vitivinicultura en Berisso puede dividirse en varias etapas, relacionadas con la llegada de inmigrantes que se dedicaron al trabajo rural. La inmigración no fue casual, ya que estuvo ligada al desarrollo económico de la región desde la década de 1870. Berisso es una localidad costera situada a 70 Km al sur de Buenos Aires, y a 7 Km de la Capital Provincial La Plata. Su origen se relaciona con la actividad de los saladeros, que habían sido desplazados desde las costas del Riachuelo a la Ensenada de Barragán, por ser responsables de las terribles epidemias de cólera y fiebre amarilla ocurridas en Buenos Aires en 1869 y 1871, que causaron varios miles de muertos (Fiquepron, 2017). El primer saladero se inauguró el 24 de junio de 1871, en el lugar que hoy ocupa el Centro Cívico (Chueco, 1886). Su dueño

era Juan Bautista Berisso, un inmigrante italiano nacido en Lavagna (Génova, Liguria), de quien deriva el nombre de la ciudad (Berisso, 1987). En época reciente, más precisamente en noviembre de 1998, y luego de una investigación histórica llevada a cabo por el Dr. Oscar Alcoba, concejal de Berisso, se tomó la fecha de inauguración del saladero como fecha fundacional de Berisso (<http://berisso.gob.ar/ciudad-beta.php>). Cabe mencionar que Berisso obtuvo su autonomía municipal el 3 de abril de 1957, ya que desde 1866 hasta esa fecha perteneció al Municipio de La Plata.

A fines del siglo XIX la población alrededor de los saladeros era de unas 1800 personas que habitaban un caserío irregular formado por construcciones precarias (Herrera, 2018). La población fue creciendo al amparo de la instalación de nuevos saladeros, como el San Luis en 1879, administrado por Luis Berisso, hermano de Juan, y el desarrollo del puerto de La Plata inaugurado en 1890 (D'Amico y col., 2015). A principios de 1900, los saladeros comenzaron a cerrar, dando lugar a la industria frigorífica. En 1900 se instaló en el Gran Dock del puerto de La Plata la firma Zábala y Cia., una fábrica congeladora de carnes y conservas. En 1904 se inauguró el frigorífico "La Plata Cold Storage", de capitales sudafricanos, sobre los cimientos del primer saladero instalado en Berisso (Lobato, 2004). En 1907 fue comprado por la empresa norteamericana Swift (cambió su nombre recién en 1917), llegando a ser el frigorífico más importante de Argentina. En 1915 se instala otro gigante de la industria frigorífica, el Armour. Ambos frigoríficos modularon la vida social y económica de Berisso durante casi 70 años (Lobato, 2004).

El desarrollo de la actividad fabril y del puerto intensificó la inmigración y el crecimiento poblacional. Según el Censo general del Partido de La Plata de 1909, la sección VII que incluía a Berisso, registraba ya un total de 4810 habitantes, de los cuales 2553 habitantes correspondían a Berisso, 970 a los Talas y el resto a las islas Paulino y Santiago (Velarde, 2010). En la zona rural, el 70% de la población era inmigrante, mayoritariamente italianos. A la par del crecimiento urbano, se dinamizó la producción rural con el desarrollo de las quintas. Según el Censo Nacional Agropecuario de 1908, la superficie de viñedos en Avellaneda sumaba un total de 230 ha, y el total de uva para vinificar rondaba los 198000 kg, mientras que La Plata, que incluía a Berisso, sumaba 111 ha de viñedos y aportaba 193000 kg de uva para vinificar (CNA, 1908). La creación de los frigoríficos, la destilería YPF en 1925, una hilandería un año después, y el astillero Río Santiago en 1923, en la localidad adyacente de Ensenada, generó una gran demanda de mano de obra que atrajo una segunda oleada de inmigrantes en las primeras décadas del siglo XX. A diferencia de

lo que ocurrió en otras regiones de Argentina, a Berisso y Ensenada llegaron inmigrantes de varias nacionalidades: árabes, armenios, albaneses, búlgaros, croatas, españoles, griegos, bielorrusos, eslovacos, irlandeses, lituanos, ucranianos, rusos, polacos, sirios, italianos, portugueses y rumanos, que conformaron una variopinta cultura local (Parma, 2013).

A principios del siglo XX, se intensificó la instalación de quintas en el corredor costero de Berisso, debido a la creciente demanda de frutas y verduras de la población de la ciudad de Buenos Aires y la presencia del Mercado de Abasto. En las quintas no faltaron los viñedos, y la uva Isabella se convirtió en la principal variedad cultivada. El vino fue, en principio, para consumo personal, pero el excedente comenzó a venderse para obtener un ingreso "extra". Los nombres de algunos inmigrantes viñateros que se instalaron en Berisso en los primeros años del siglo XX se encuentran en el trabajo de Sayavedra (2017).

Al compás del desarrollo industrial y el crecimiento de la población, el vino de la Costa se fue convirtiendo en un vino popular de consumo masivo, no solo en Berisso, sino también en las barriadas obreras de localidades cercanas y en la ciudad de Buenos Aires. En ese contexto, la superficie cultivada de Isabella fue creciendo, tanto en el continente como en la isla Paulino, para satisfacer la demanda de vino. La isla debe su nombre al primer poblador, Paulino Pagani, quien llegó de Lombardía en 1887. Con el tiempo se pobló de quintas, siendo un lugar de reconocidos viñateros (Sayavedra, 2017). El primer Censo de viñedos que se realizó en 1936 mostraba que La Plata tenía 388 ha, Avellaneda 267 ha y Quilmes 68 ha de viñedos, o sea un total de 723 ha, la mayoría cultivadas con la uva americana (Ospital, 2013). El total de bodegas ascendía a 78. Considerando un rendimiento promedio de 3500 kg de uva por ha y un rendimiento en vino del 60 %, se puede estimar que la producción de vino de la Costa en toda esta región rondaría 7000 bordalesas, o sea 1.400.000 litros, que coincide con datos reportados por el Primer Censo Nacional del Vino en 1936, donde se registró una producción total de 1.300.000 litros de vino (Velarde, 2010). Este volumen podría considerarse como la máxima producción alcanzada de vino de la Costa en el período de mayor auge, entre los años 1930 y 1950.

La popularidad que fue adquiriendo el vino queda reflejada en el siguiente párrafo:

*"- Magnífico olor de la fritura boquense. Este pescado frito solo se come aquí.  
- Te recomiendo el matambre.*

- *Cada comida tiene su encanto particular*"

*Tomaron asiento junto a una mesa vecina... Algazara de los muchachos y de los viejos. Mucho pescado en dos fuentes: pan y vino oscuro en una botella que decía "Vino de la costa"..."* (Caras y Caretas, *El ritmo* N° 1531, 1928) (Lobato, 2016)

Durante esos años se instalaron en Berisso nuevos agricultores/viñateros, cuyos descendientes continuaron y aún mantienen la producción del vino de la Costa. Algunos de ellos, como Flaviano José Amadeo (1896-1978), oriundo de lago di Como (Lombardía), llegó a la Argentina en 1918 y posteriormente a Palo Blanco en 1935 (Germán Palomino, comunicación personal). Francisco Giovannetti (1910-1975), hijo de inmigrantes Genoveses, nacido en Zárate, se instaló en Berisso en la década del 40 para trabajar en el frigorífico Swift y posteriormente, en 1949, compró a la familia Ricci parcelas de monte sobre la calle Bagliardi (María Ester Giovannetti, comunicación personal). Serafino Ruscitti proveniente de Abruzos, se instaló en la isla Paulino a principios de 1951 (Marin, 2010). No todos los quinteros fueron de origen italiano, un caso emblemático fue el de Francisco Antonio Domingues, quien llegó de Portugal en 1927 a los 30 años. Con los recursos obtenidos durante su trabajo en el frigorífico Swift instaló una quinta y plantó Isabella (Noelia Dobe, comunicación personal). Su trabajo fue continuado por su hijo "Pancho" Domingues (1934-2020), un reconocido viñatero, quién también fue tonelero, un oficio esencial en la producción de vino.

Para 1958 la extensión de los viñedos en Avellaneda, Quilmes y Berisso aún se mantenían en 800 ha (Velarde, 2010), pero a partir de 1960 comenzó el declive del vino de la Costa, asociado a un decaimiento general de la actividad económica de las quintas (Tagliabue, 2011). Las causas fueron múltiples, pero una directa fue la pérdida de valor del trabajo rural en beneficio del trabajo urbano, de mejor calidad y mejor remunerado, al que podían acceder los hijos y nietos de los primeros inmigrantes por su mayor nivel educativo (Otero, 2013). A esto se sumó la disminución de la demanda por una menor actividad frigorífica, la competencia de los vinos de Cuyo y de la producción hortícola por otras zonas cercanas a Berisso, y la crisis económica de finales de 1970, que afectó el estándar de vida de la población local (Velarde, 2010). La crisis del vino de la Costa se manifestó claramente a partir de 1970, cuando la falta de inversión e innovación tecnológica en viñedos y bodegas trajo aparejado un marcado deterioro de la vitivinicultura en Berisso y zonas aledañas (Posada & Velarde, 2000). Un productor de la Costa de Berisso, Vicente, recordó:

*“Cerraron las fábricas y Berisso quedó abandonado, se abandonó la Nueva York, las fondas ¡qué fondas que había! Se acabó el trabajo en los frigoríficos, y el vino se fue con los frigoríficos...”*

Un factor adicional que contribuyó al declive de la actividad vitivinícola en Berisso fueron las trabas impuestas por nuevos marcos legales en la producción del vino a nivel nacional a partir de la década de 1990, que prohibió el uso de la uva Isabella para vinificar. La Resolución INV71 de 1992 definió al vino como “producto obtenido de la fermentación alcohólica de uvas provenientes de la especie *Vitis vinifera*”.

*Artículo 1º —DEFINICION DE VINOS: Se considerará vinos a los productos obtenidos 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, de uvas provenientes de la especie *Vitis vinifera* L., con o sin partes sólidas, que tengan un tenor alcohólico real superior a CINCO GRADOS (5º) GayLussac. Ningún otro líquido cualquiera sea su origen o composición podrá designarse con el nombre de vino [sic]*

Se podría decir que a fines del siglo XX, la actividad vitivinícola en Berisso estaba al borde de la extinción. La declinación de la actividad productiva generó el abandono de las quintas y la desaparición del oficio de viñatero. En 1998 se produjeron apenas 6000 litros de vino, y la superficie de los viñedos se limitaba a menos de 10 ha (Otero, 2013). Respecto a la actividad económica rural, la mayor parte de las quintas habían cesado su actividad productiva.

## **2.10. La recuperación de la actividad vitivinícola en Berisso (2000-2020).**

El factor determinante para la recuperación de la actividad vitivinícola en Berisso fue la crisis económica de finales del siglo XX, que hizo eclosión en el 2001. Los pocos productores que aún elaboraban el vino, en conjunto con la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (FCAyF-UNLP), y con apoyo de autoridades locales y la participación de técnicos rurales, iniciaron un proceso de revalorización de la actividad vitivinícola local como una alternativa productiva para mejorar su situación económica (Hoy, 2003; Velarde et al, 2006). Así, el cultivo de Isabella volvió a ser un tema central en la actividad rural de Berisso, y el vino de la Costa se reconfiguró con fuerza como



un producto con identidad territorial, que ameritaba ser tenido en cuenta nuevamente. Diversos estudios realizados con posterioridad, demostraron que el vino de la Costa seguía siendo un producto con una notable tradición local (Velarde et al., 2008). Desde fines de 1990, comenzó entonces una nueva etapa en la historia de la uva Isabella en Berisso, impulsada por viñateros que aún mantenían la producción de vino, como Héctor Daraya, yerno de Giovannetti, que plantó nuevos viñedos en 1990, o el ya mencionado “Pancho” Dominguez, que continuó con la producción de vino en su quinta en Los Talas. A estos viñateros se fueron sumando nuevos actores que decidieron recuperar viejos viñedos familiares, o plantar nuevas vides, destacándose la participación de productores jóvenes que significaron un recambio generacional esencial para darle continuidad a la producción del vino. Una lista de productores que mantuvieron sus viñedos en producción y jóvenes que participaron en la recuperación vitivinícola de Berisso se detallan en la Tabla 2.1. Algunos de estos productores se organizaron como “Grupo de viñateros”.

**Tabla 2.1.** Tabla extraída y modificada de la parte final de la Resolución del INV (N° C.23/13), en la cual se detallan los nombres de los productores de vino de la Costa y la superficie de los viñedos. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Instituto Nacional de Vitivinicultura.

<i>Número de inscripción</i>	<i>Razón social</i>	<i>Domicilio</i>	<i>Departamento</i>	<i>Superficie (hectáreas)</i>
X00001	RICARDO DE SIMONE	Isla Paulino lote 1	Berisso	1,0000
X00002	CASALI MARTIN ALBERTO*	Calle 66 y La Florida s/n	Berisso	0,0500
X00003	MURGIA RAUL OSVALDO	Calle 169 N° 2763	Berisso	1,0000
X00004	AQUIAR ANDRES ALEJANDRO	Canal de acceso Puerto La Plata	Berisso	0,1800
X00005	DARAYA HECTOR*	Bagliardi y los Ciruelos	Berisso	0,0694
X00007	LEOTTA NESTOR EDUARDO	Camino Palo Blanco y Puente Rio Santiago	Berisso	0,5000
X00008	CORAZZA LEONARDO ANDRES*	Delta de Rio Santiago	Berisso	0,4200
X00009	PALOMINO AMADEO GERMAN*	Camino Palo Blanco	Berisso	0,5700
X00010	GODOY JUAN CARLOS*	3 de abril e/Mema y Ombú	Berisso	0,7500
X00011	MANFREDI OLINDA	Quinta 60 e/Avenida Dominicó y Sarandí	Avellaneda	1,0341
X00012	PAISSAN OSVALDO CANDIDO	Lote 6 Colonia Sarandí Quinta 358	Avellaneda	2,0000
X00013	FERRARA AGUSTIN Y CARMELO	Quinta N° 26-27	Avellaneda	0,7365
X00014	VERON ARGENTINO RUBEN*	Calle 81 y Ruta 15	Berisso	2,9544
X00015	RUSCITTI RENZO SERGIO*	Isla Santiago este	Berisso	1,5750
X00016	RUSCITTI MIGUEL	Isla Santiago este (Paulino)	Berisso	1,0000
X00017	FREZZINI SANTIAGO EZEQUIEL*	Calle 66 s/n	Berisso	1,2550
X00019	ORELLANO JULIO CESAR	Calle 17 y 173	Berisso	0,2800
X00020	GOMEZ DANIEL*	Isla Paulino	Berisso	0,2550
X00021	VERON JOSE RICARDO*	Calle 81 Los Vasquitos	Berisso	1,3000
X00022	DOMINGUES FRANCISCO ANTONIO	La Colonia s/n	Berisso	2,0000
X00023	GALEAN JUAN*	3 de abril e/Bagliardi y Mena	Berisso	0,4000
X00024	RICCI RAUL, PEDRO Y TERESA S.H.	Calle 32 s/n	Berisso	0,8000
X00025	GALARZA CONSTANCIA BEATRIZ	3 de abril e/Bagliardi y Mena	Berisso	1,6500
X00026	RICCI RAUL EMILIO	Calle 34 s/n	Berisso	0,8930
X00027	RICCI RAUL EMILIO	Calle 32 s/n	Berisso	0,1000
X00028	GALEAN JUAN*	Arroyo La Maza y Rio de la Plata	Berisso	0,5000

\* Productores que plantaron nuevos viñedos a partir de 1995

La renovada actividad vitivinícola impulsó el crecimiento de los viñedos de Isabella, que alcanzaron cerca de 20 ha en el 2009 (Sisterna et al., 2010). Por su parte, el trabajo colaborativo entre viñateros, Universidad y otras instituciones gubernamentales rindió sus frutos en el 2003, cuando se creó la Cooperativa de la Costa de Berisso con la base del Grupo de viñateros, y en junio del 2009, cuando se inauguró la bodega y la sala de agroindustria que permitió disponer de mejores condiciones para elaborar el vino (Figura 2.15). El primer vino de la Costa producido en la bodega fue con uvas de la vendimia 2009, aportadas por los socios a la cooperativa. Actualmente, la mayor parte de la uva Isabella se vinifica en la bodega de la Cooperativa; no obstante, algunos viñateros mantienen una actividad independiente limitada a su propia quinta (Marin, 2020).



**Figura 2.15** Imagen actual de la bodega de la Cooperativa de la Costa de Berisso.

Un hito fundamental en el proceso de recuperación de la producción del vino de la Costa fue el surgimiento, en el año 2004, de la Fiesta del Vino de la Costa de Berisso, que se lleva a cabo todos los años en los primeros días de julio (Velarde et al., 2021) (Figura 2.16 y Figura 2.17).

Entre hoy y mañana Berisso tendrá su primera Fiesta del Vino de la Costa. La organización está a cargo de la Subsecretaría de Producción, la Secretaría de Gobierno, a través de la Dirección de Cultura, dependientes de la Municipalidad de esa ciudad, el Departamento de Desarrollo Rural de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la UNLP y la Cooperativa de la Costa de Berisso.

El Vino de la Costa ha sido históricamente un rasgo distintivo de Berisso. Las primeras vides fueron introducidas por inmigrantes durante las primeras décadas del siglo pasado. A pesar de que esta actividad productiva ha pasado una etapa de debilidad económica, mantuvo sin embargo una fuerte presencia en el imaginario colectivo de la Región. Así, demuestra hoy estar nuevamente viva.

Un núcleo de productores garantizó la continuidad de la tradición y desde hace más de cuatro años trabaja en un proyecto asociativo que cuenta con la asistencia técnica del Departamento de Desarrollo Rural de la Facultad de Cs. Agrarias y Forestales de la UNLP, y también con el apoyo de la Municipalidad de Berisso, se ha constituido una Cooperativa con la intención de poner en marcha una bodega, comercializar en conjunto, ofrecer un banco de plantines para asociados, planta procesadora de dulces y museo temático. Estas instalaciones funcionarán en tierras cedidas por la Comuna.

Con motivo de esta fiesta se realizarán las siguientes actividades: hoy a las 16, acceso a Playa Bagliardi; colocación de la piedra fundamental de la futura Bodega y Sede de la Cooperativa; a las 20, Escuela de Arte (Montevideo y 11); entrega de premios Torneo de Ajedrez- Copa "Vino de la Costa de Berisso"; a las 21, Sociedad Italiana (Montevideo entre 9 y 10). Cena de presentación a la comunidad berissense del proyecto de la Cooperativa de la Costa de Berisso.

Mañana, en el Gimnasio Municipal, de 168 y 9, a las 11, inauguración de la fiesta, recepción de autoridades; muestra ferial de productos locales y artesanales; degustación de productos; muestra fotográfica; realización de talla en madera, con Walter Dobrowski y un mural a cargo de Cristian Del Vito; a las 12, inauguración Patio de Comidas; a las 15, inicio del Festival Artístico. A las 16 y 18, quincho Municipal (frente a Pista de atletismo), ciclo de charlas sobre la producción del vino a cargo de profesionales y productores.

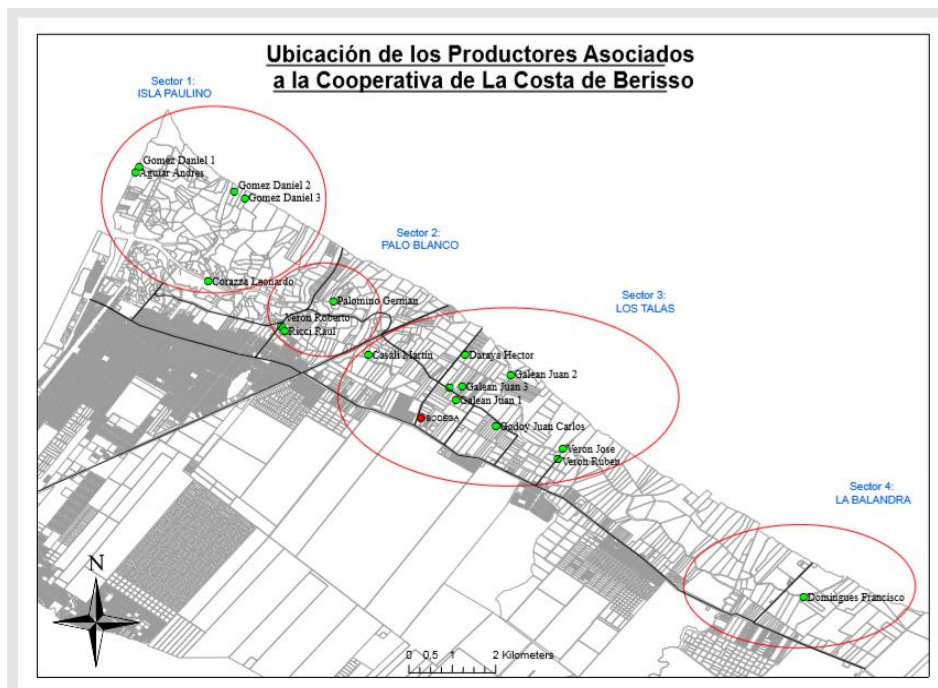
**Figura 2.16.** Foto del artículo del diario El Día de La Plata donde se anuncia la primera Fiesta del Vino de la Costa en Berisso (3 julio 2004).



**Figura 2.17.** Entrega de premios del concurso de vino en el año 2012 (izquierda) y folleto sobre el concurso popular de vinos del año 2019 (derecha).

La fiesta del vino de la Costa atrae a miles de personas, y ha cobrado relevancia como elemento generador de turismo (Alborghetti, 2018; Iglesias, 2018). En ella se exponen los productos de la economía popular, se realiza el concurso de vinos caseros, y se muestran numerosos espectáculos artísticos y culturales relacionados con la comunidad de Berisso.

Un acontecimiento importante, probablemente el más trascendental en la historia moderna de la Isabella de Berisso, fue el reconocimiento del Vino de la Costa como “vino regional” por un decreto del Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV), en el año 2013. Este decreto cubrió el vacío legal en el cual se hallaba inmerso el vino. Mediante la Resolución N° 23/13, el INV reconoció al Vino de la Costa como un «producto regional típico, con identidad propia, que representa una alternativa de desarrollo para la población local generadora de fuentes de trabajo, que mejoran las posibilidades de permanencia en el medio productivo, evitando el desarraigo» [sic]. De esta manera, se incorporaron al Registro Nacional de Viñedos los 26 productores vitivinícolas de Berisso y Avellaneda, que en su conjunto explotaban 23,8 hectáreas, con un rinde promedio de 50 quintales por hectárea (Tabla 2.1). Los viñedos se encuentran distribuidos en las zonas bajas inundables, preferentemente bajo la forma de parral, y en las zonas altas menos propensas a las crecidas del Río de La Plata con sistemas de conducción tanto parral como espaldera (Pierini & Ganganelli, 2017), (Figura 2.18 y Figura 2.19).



**Figura 2.18.** Ubicación actual de viñedos en Berisso (gentileza de Emiliano Alvarez Zanelli).

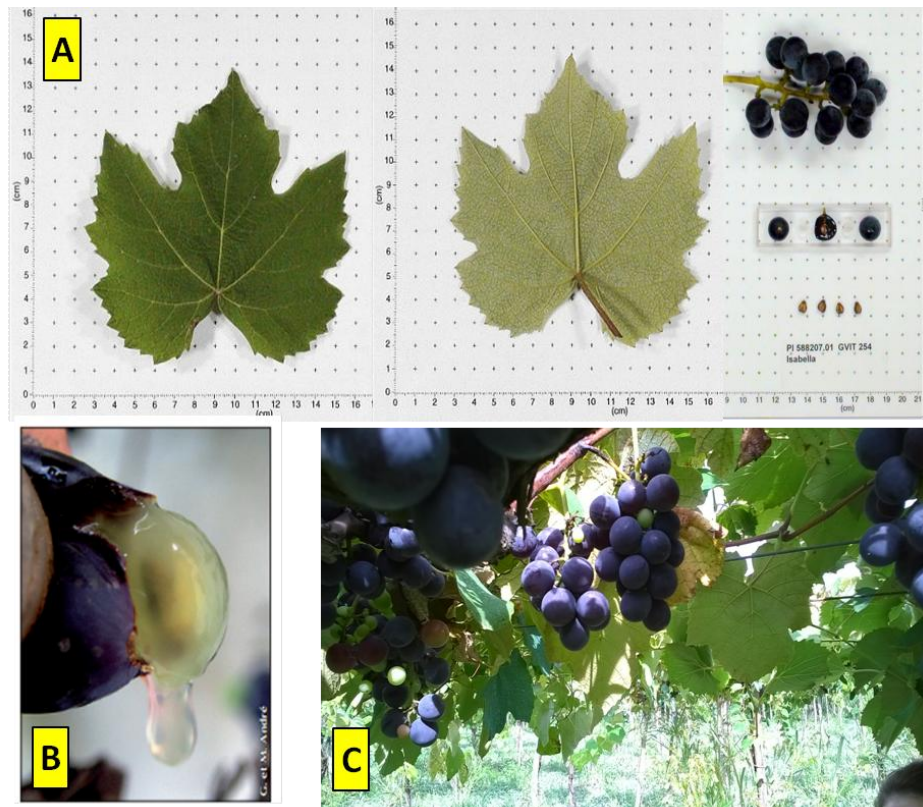




**Figura 2.19.** Viñedos en Berisso A) Parral con zanjillo en zona inundable (quinta Verón), B Espaldera en zona alta (quinta Galean).

### 2.11. Características y propiedades de Isabella y sus productos.

Las características fenotípicas de la uva Isabella original, y ciertos detalles del manejo del viñedo y de elaboración de vino con esta uva, se encuentran reportados en revistas técnicas agrícolas de la primera mitad del siglo XIX (Prince, 1830, Spooner, 1838) y en trabajos posteriores sobre las *Vitis* americanas (Heidrick, 1908; Munson, 1909). Como todo híbrido, Isabella ha heredado caracteres botánicos de sus progenitores. Es una variedad de vid prolífica, de racimos pequeños, poco compactos, con bayas de tamaño mediano, y hollejo de color azul intenso a negro. Es muy característica la elasticidad del hollejo y su fácil desprendimiento de la pulpa cuando se aplica una ligera presión con los dedos; la pulpa es jugosa y presenta una tonalidad verde-amarillenta (Figura 2.20). Un detalle interesante es que la variedad fue descrita en varias publicaciones con bayas ligeramente ovaladas (Prince 1830; Hedrick, 1908; Munson 1909), tal como se presenta en la imagen de la portada (Prince 1830), pero lo que se observa en los cultivos actuales en Berisso es que las bayas de Isabella tienen más bien una morfología redondeada. Su ascendencia de *V. labrusca* queda evidenciada en su capacidad para crecer en suelos con alta saturación de agua, como las llanuras aluviales, en su preferencia por suelos ácidos y en su baja resistencia a la caliza.



**Figura 2.20.** Características morfológicas de Isabella. **A:** Morfología de hojas y frutos de Isabella. National Plant Germplasm System, USDA, ARS <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/imgDisplay?id=1004783>. **B:** Pulpa globosa de una baya de *V. Labrusca* s.l (cultivar “Isabelle”, Doubs, Avanne-Aveney, France), André et al., 2017). **C:** Racimos maduros de Isabella, viñedos de Berisso, Argentina.

Isabella es tolerante al calor, al frío, e incluso a las heladas. Además presenta resistencia a ciertos hongos como *Botrytis* (podredumbre gris), lo que es ventajoso en climas tropicales, y al oídio, pero es medianamente sensible al mildiu, la filoxera y al fruto a la podredumbre negra. Las uvas de Isabella producen compuestos volátiles que inhiben al hongo *Botrytis cinerea* (Kulakiotu et al., 2004), lo cual podría explicar su resistencia a esta plaga. Es una vid de gran vigor y crecimiento rápido, y de productividad variable. Los extractos acuosos de las hojas tienen propiedades beneficiosas para la salud (Trindade et al., 2016). Es muy atractiva como uva de mesa, para hacer jugos y mermeladas, y como planta ornamental. Las propiedades fisicoquímicas de Isabella han sido reportadas en diferentes regiones vitícolas. Al igual que otras *Vitis* americanas y sus híbridos, el tenor de azúcar de Isabella es inferior al de las variedades *V. vinifera*, en general con un máximo 20-21 °Brix, por lo cual su potencial de alcohol rara vez supera el 11-11,5%. Las semillas contienen un alto contenido de aceite (21%) rico en oleico, linolénico y vitamina E, mientras que su

composición de ácidos grasos es comparable a la composición del aceite obtenido de las semillas de variedades *V. vinifera* (Sabir et al., 2012).

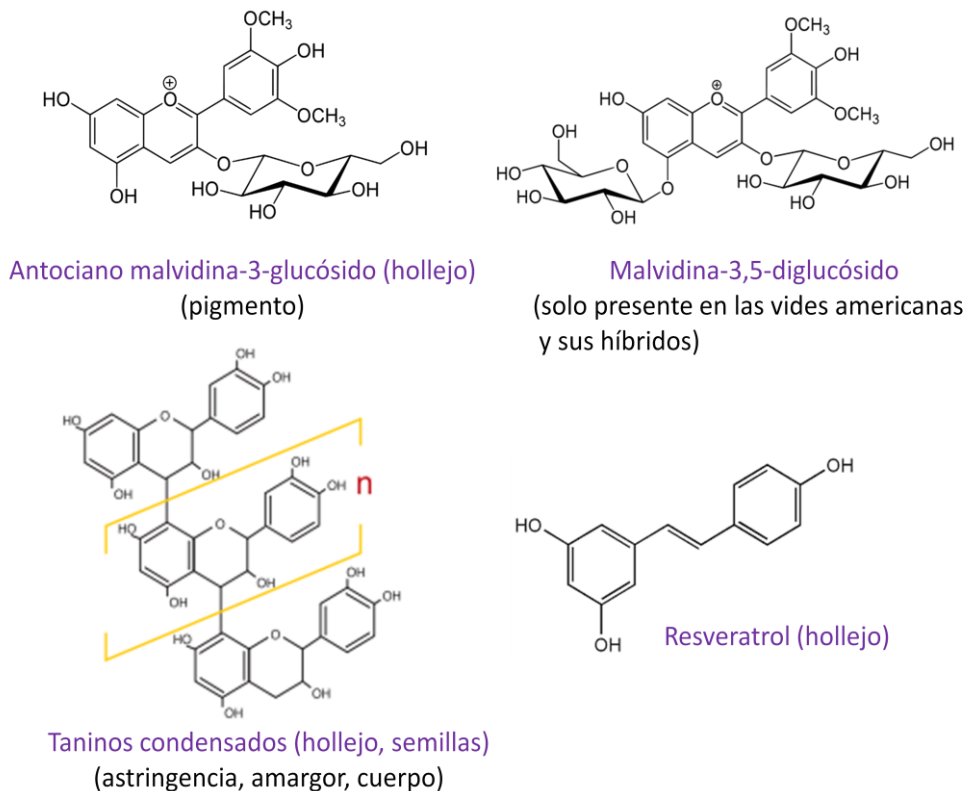
Desde el punto de vista sensorial la uva Isabella se caracteriza por un flavor dulzón, afrutillado o aframbuesado, persistente e intenso, por lo cual entre sus numerosos sinónimos se incluye el de uva fragola (fresa en italiano), strawberry grape (uva frutilla), frutilla, framboiser (frambuesa), frambua, etc. Algunos estudios iniciales catalogaron a Isabella como una variedad que expresa un débil caracter foxy (Munson 1909), atribuible según Power & Chesnat (1923), a su bajo contenido de antranilato de metilo, pero estudios posteriores mostraron resultados contradictorios respecto a su contenido de AM. Según diversos autores la baya de Isabella no contiene los típicos compuestos asociados al foxiness, como AM o 2-AAF (Nelson et al., 1977; Narduzzi et al., 2015; Dutra et al., 2018). Ghaste et al., (2015) analizó compuestos volátiles libres y conjugados en la baya de Isabella, y encontró furaneol, en una concentración 50 a 70 veces superior a las presentes en las variedades de *V. vinifera*, e incluso en dos especies americanas. La fracción unida a azúcares se evaluó luego del tratamiento enzimático con un producto comercial recomendado para liberar aromas. El tratamiento enzimático no solo liberó furaneol, sino también altas concentraciones de compuestos aromáticos como  $\beta$ -feniletanol, etil- $\beta$ -hidroxibutirato, alcohol bencílico y terpenos. Por su parte, Dutra et al. (2018), encontró altas concentraciones de furaneol, hasta  $\sim 6$  mg/l, en el jugo de Isabel Precoce. El furaneol es también un componente importante del flavor frutal (notas de frutilla) de uvas híbridas como Muscat Bailey A [*V. labrusca* (Bailey)  $\times$  *V. vinifera* (Muscat Hamburg)] (Sasaki et al., 2015; Masahiko & Sato, 2016) y Kyoho (*V. labrusca* (Bailey)  $\times$  *V. vinifera*) (Yang et al, 2017), utilizadas para elaborar vino en Japón y Corea del Sur respectivamente.

Otros compuestos aromáticos importante en el aroma de las uvas son los terpenos (Barreiro et al., 2013), pero Isabella contiene bajas concentraciones de terpenos libres o glicosilados, por lo cual es poco probable que estos compuestos jueguen un rol importante en el aroma varietal (Dutra et al., 2015; Narduzzi et al., 2015). Se puede inferir de estos estudios que Isabella no ha heredado o expresa débilmente los genes que codifican para la síntesis de AM o 2-AAF, y que el furaneol, con su aroma/sabor afrutillado sería el odorante clave del flavor que caracteriza a esta variedad de uva y que le transmite al vino durante la vinificación. Esta propiedad diferenciaría a Isabella de otros híbridos americanos de *V. labrusca*, en los cuales la presencia notoria de AAF y/o AM en la baya sería determinante en imprimir un marcado carácter foxy a los vinos (Rice, 2013)

Cualquiera sea el destino de la Isabella (uva de mesa, vino, jugo) es importante considerar en su composición aquellos compuestos que juegan un rol fundamental en las características fisicoquímicas, sensoriales y funcionales de sus productos. Una función importante lo cumplen los compuestos fenólicos que se localizan en la pulpa, hollejo y semillas de la baya (Teissedre & Jourdes, 2013). En el vino son responsables de importantes características sensoriales como el color, cuerpo, astringencia y amargor (Garrido & Borges, 2013; Teissedre & Jourdes, 2013) y también de ciertas propiedades potencialmente beneficiosas para la salud. Es importante mencionar que los compuestos fenólicos se van modificando a medida que la uva es procesada e incluso durante el almacenamiento del vino o jugo. Estos cambios depende de varios factores, como la tecnología de la elaboración del jugo o de la fermentación (de Castilhos et al., 2017) y el tiempo y condiciones de almacenamiento (de Freitas & Mateus, 2011). Por lo tanto, a la hora de interpretar los análisis de compuestos fenólicos hay que tener presente si el mismo se realizó en la uva, jugo o el vino, el tipo de fermentación o proceso empleado y el tiempo y condiciones de almacenamiento.

Según su estructura química, los compuestos fenólicos se pueden agrupar en no-flavonoides y flavonoides. Entre los compuestos no-flavonoides se encuentran los ácidos fenólicos localizados en la pulpa, flavanoles y estilbenos que se localizan principalmente en el hollejo; estos últimos incluyen el resveratrol (3,5,4'-trihidroxi-trans-estilbeno), al cual le han atribuido ciertos efectos terapéuticos (Berman et al., 2017). Entre los flavonoides se encuentran los antocianos (pigmentos) y los flavanoles o flavan-3-oles, ambos presentes en los hollejos y semillas. Los flavan-3-oles constituyen un subgrupo de compuestos fenólicos muy importantes cuya estructura va de monómeros (catequina, epicatequina, etc) llamados genéricamente catequinas, hasta dímeros, trímeros y polímeros llamados en su conjunto proantocianidinas. Las proantocianidinas formadas por varias unidades de flavan-3-oles se suelen denominar taninos condensados (Figura 2.21).





**Figura 2.21.** Compuestos fenólicos de los vinos: malvidina-3-glucósido, el pigmento mayoritario de la uva Isabella y de la mayoría de las uvas tintas; malvidina-3,5-diglucósido, ausente en las viníferas y presente en Isabella y otras especies americanas y sus híbridos; n: número de unidades de flavan 3-oles en los taninos condensados ; resveratrol.

Un estudio sobre la composición de flavonoides y no-flavonoides en hollejos de vides con diferentes background genético y origen, ubicó a los híbridos de *V. labrusca* x *V. vinifera* en un grupo junto a las *V. vinifera* e híbridos euroasiáticos, separado de la vides asiáticas y Muscadinia (Zhu et al., 2012). Esto significa que la ascendencia vinífera es importante en la composición fenólica de la Isabella. Los antocianos son pigmentos solubles en agua responsables del color del hollejo. Flamini & Tomasi (2000) determinaron el contenido de antocianos en el hollejo de Isabella, y hallaron a la malvidina 3-glucósido como el antociano de mayor concentración o (33%). El mismo resultado se encontró en jugos elaborados con “Isabel” proveniente del estado de Paraná, Brasil (Yamamoto et al., 2015). Por su parte, Narduzzi et al, (2015), encontró tanto a la malvidina 3-glucósido como a la peonidina 3-5 diglucósido y Kurt-Celebi et al., (2020) a la malvidina 3-glucósido y la peonidina 3- glucósido como las antocianinas mayoritarias. El diglucósido se lo encuentra en las uvas derivadas de *V. labrusca*, pero no en las variedades *V. vinifera*; por lo tanto, su presencia en un vino indica el empleo

de vides americanas en su elaboración. En el vino de la Costa de Berisso el antociano predominante fue la malvidina 3-glucósido (Voget et al., 2009).

Los taninos condensados o simplemente taninos, representan un alto porcentaje de los compuestos fenólicos presentes en las variedades tintas de uva, distribuyéndose principalmente en el hollejo y las semillas. Los taninos varían en el tipo de subunidades, grado de polimerización (cantidad de subunidades que contiene el tanino) y contenido de ácido gálico (Herderich & Smith, 2005). Las propiedades de los taninos dependen de su estructura. A mayor grado de polimerización (p. e.j.,  $n=10$  en la Figura 2.21) predomina la astringencia, mientras que a bajos valores de grado de polimerización predomina el amargor (Hornedo-Ortega et al., 2020). El contenido de ácido gálico también influye en la astringencia del tanino. Las concentraciones de taninos en las uvas híbridas, como Isabella, son inferiores a las presentes en las variedades de *V. vinifera*. En estas últimas se han encontrado concentraciones de taninos en los hollejos en el rango de 3-110 mg/g baya, y en las semillas entre 11 y 140 mg/g baya, mientras que en algunas variedades de uvas híbridas, el rango se reduce sustancialmente a 0,03 a 0,22 mg/g baya y 0,19-0,76 mg/g baya, para hollejo y semilla respectivamente (Watrelet & Norton, 2020). Según Narduzzi et al., (2015), los hollejos y semillas de Isabella contienen taninos en concentraciones y grado de polimerización intermedio entre las variedades de *V. vinifera* y las especies americanas no-labruscas (las de menor concentración). Una característica de los taninos de Isabella fue su mayor contenido de ácido gálico (3-5%). De acuerdo a Kurt-Celebi et al., (2020), las semillas maduras de Isabella contienen hasta un 20% en peso de taninos, mientras que Yamamoto et al., (2015) encontró mayoritariamente monómeros y dímeros de flavan 3-oles en los jugos de Isabel.

Una propiedad importante de los taninos es su capacidad de unión a las proteínas y a ciertos componentes de la pared celular vegetal. Esta interacción limita su extracción y solubilización durante la fermentación, y por ende su concentración final en el vino (Hanlin et al., 2010). En un estudio comparativo, Springer & Sacks (2014) observaron que los taninos de las uvas híbridas se unían con más fuerza que los taninos de las *V. vinifera* a las proteínas presentes en la pulpa, y en menor medida a la pectina de las paredes celulares del hollejo. Esta diferencia, a lo que se suma su menor concentración en la baya, explicaría por qué los vinos de las uvas híbridas contienen una concentración de taninos hasta 4 veces menor que los vinos elaborados con las variedades de *V. vinifera*.

En el proceso de vinificación los compuestos fenólicos y del aroma/gusto contenidos en la baya van pasando al vino durante la fermentación y serán la base química de importantes propiedades organolépticas. Teniendo en cuenta las propiedades de los taninos, pigmentos y compuestos del aroma que se han descrito, sería posible explicar algunas de las características aromáticas, visuales y la relacionada con la “sensación en boca (mouthfeel)” que los consumidores destacan de los vinos de Isabella: color intenso, cuerpo ligero, baja astringencia, con aroma y sabor frutado (Velarde et al., 2008). Otra característica destacable es su marcada acidez. En el vino la acidez crea a nivel organoléptico una sensación de equilibrio y frescor. La acidez percibida en los vinos de Isabella tienden a definirse como “intensa”, sin embargo la acidez total y concentraciones de ácido málico y tartárico se encuentran dentro de los rangos encontrados en los vinos de variedades de *V. vinifera* (Rizzon et al., 2000). Evidentemente, la acidez en vinos no puede ser interpretada únicamente en función de la concentración de ácidos orgánicos, sino que se debe considerar el efecto matriz, es decir el efecto de la composición química global del vino en la percepción de este atributo.

Además de su influencia en la estructura y flavor del vino, los compuestos fenólicos tienen efectos beneficiosos para la salud, como por ejemplo, su actividad antioxidante. La actividad antioxidante en los vinos está determinada principalmente por la concentración de varios compuestos fenólicos de bajo peso molecular.

La actividad antioxidante se determina mediante ensayos in vitro empleando diferentes técnicas, que si bien son útiles para comparar distintas muestras, no necesariamente reflejan lo que ocurre in vivo, es decir, dentro del organismo (Floegel et al., 2011; Schaich et al., 2015; Zhong & Shahidi, F., 2015).

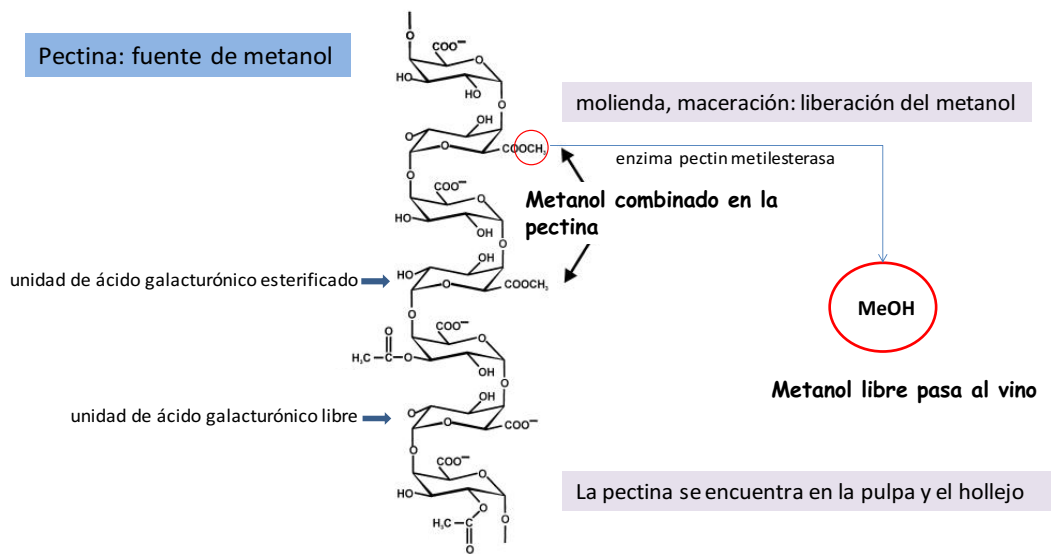
Arcanjo et al., (2017) encontró que la actividad antioxidante de los vinos elaborados con Isabel e Ives depende de las condiciones de producción del vino, y en especial de la variedad de uva, observando una alta correlación entre dicha propiedad y ciertos ácidos fenólicos presentes en el vino. Cazzarin et al., (2013) observó una fuerte correlación entre actividad antioxidante y contenido de antocianos en jugos de Isabel, y variaciones en dicha actividad según la temporada de cosecha. Por su parte, Pacifico et al., (2011) halló una fuerte actividad antioxidante y anticancerígena en las semillas y tallos de Isabella al analizar la composición fenólica de diferentes partes de la planta. Nixdorf & Hermosín-Gutiérrez (2010) estudiaron la composición fenólica de vinos de Isabel y encontraron que su capacidad antioxidante era media-baja comparada con los vinos de *V. vinifera*. Burin et al., (2014) determinó la composición

fenólica de variedades de uva de *V. vinifera* y de híbridos derivados de *V. labrusca* encontrando que el tipo y concentración de compuestos fenólicos dependió más de la variedad de uva que de la especie en particular. La concentración de trans resveratrol en Isabella (35 µg cada 100 g de uva fresca, 35 µg %) fue menor que la presente en las *V. vinifera* Merlot y Cabernet Sauvignon (~ 55 µg %) y las variedades Ives y Concord derivadas de *V. labrusca* (64-86 µg %). La actividad antioxidante de Isabella fue inferior a Ives y Concord, pero similar o inferior al de las variedades de *V. vinifera* según la técnica empleada.

Además de las uvas, vinos y jugos, también se ha investigado sobre el aprovechamiento del orujo de Isabella, el residuo sólido que queda luego del descube del vino. De acuerdo a Rockenbach et al., (2011), las semillas y el hollejo del orujo de Isabella representan una buena fuente de compuestos antioxidantes. Demirkol & Tarakci (2018) y Mammadova et al., (2020) determinaron que el agregado de orujo seco de Isabella mejora las propiedades funcionales del yogur. Por su parte, Troncozo (2019) estudió el aprovechamiento del orujo de Isabella mediante el cultivo de hongos saprófitos, obteniendo buenos resultados para su empleo como abono orgánico.

Los vinos elaborados con *V. labrusca* y sus híbridos, incluyendo la Isabella, han sido cuestionados por su alto nivel de metanol. La presencia de metanol “en exceso” fue uno de los argumentos sostenidos por la Unión Europea para prohibir los vinos producidos por las variedades híbridas. El metanol es un compuesto tóxico, y su concentración en vinos está regulada (INV, 2018). El metanol presente en los vinos no es debido a la acción fermentativa de las levaduras, sino a la presencia de pectina en la uva. La pectina es un polisacárido complejo que forma parte de la pared celular vegetal. Una parte de la pectina está formada por una cadena de unidades de ácido galacturónico, en la cual algunas unidades están libres y otras están esterificadas con metanol. Cuando se procesa la uva (molienda, maceración), la pectina comienza a degradarse y la enzima denominada pectinmetilesterasa, que está presente en la uva, comienza a actuar sobre las unidades esterificadas de ácido galacturónico, liberando el metanol (Figura 2.22).

Algunos productos enzimáticos comerciales que se emplean en enología para favorecer la degradación de la pared celular vegetal y facilitar la maceración y clarificación, contienen pectinmetilesterasa, por lo que es común observar un aumento del contenido de metanol en los vinos tratados con esos productos (Gnekow & Ough, 1976; Revilla & González-SanJosé, 1998).



**Figura 2.22.** Estructura de una región de la pectina esterificada con metanol y su liberación por la acción de la pectinmetilesterasa proveniente de la propia uva o bien la presente en algún producto enzimático empleado en enología.

La máxima cantidad de metanol que puede estar presente en el vino depende del contenido de pectina de la uva, de la cantidad de metanol esterificado que contenga dicha pectina y de cuanto metanol se libera durante el procesamiento. Existen pocos datos de contenido de pectina en distintas variedades de uva. Algunos estudios con variedades híbridas de *V. labrusca* mostraron contenidos de pectina que dependen de la variedad y el año de cosecha. La concentración de pectina en mostos frescos de las uvas híbridas varía entre 0,2 y 0,6 %, siendo la variedad Concord la que presenta mayor contenido de pectina (Rice, 1974). Asumiendo una concentración de pectina en el mosto del 0,6%, y un grado de esterificación con metanol del 70%, la concentración teórica máxima de metanol en el jugo y potencialmente en el vino sería de 550-600 mg/l, que es del orden encontrado en algunas variedades como Concord e Ives (Lee, 1975). Si bien estas concentraciones exceden el límite máximo de metanol permitido en la legislación para vinos tintos de *V. vinifera* (400 mg/l), no son lo suficientemente altas como para generar un problema de salud pública, y en general, tanto los vinos tintos como los blancos contienen concentraciones menores de metanol (Hodson, 2017). Si bien no hay datos del contenido de pectina en la uva Isabella, sí hay datos del metanol presente en vinos de Isabella producidos en distintas partes del mundo, y en todos los casos, los niveles de metanol estuvieron por debajo de los límites máximos permitidos por la legislación (Arcanjo et al., 2017; Tscheik et al., 2019;

Rizzon et al., 2000; Kucherenko & Bilko, 2020). Estudios de vinificación realizados con la Isabella de Berisso mostraron que el vino de la Costa contiene niveles intermedios de metanol, ~ 250 mg/L (datos no publicados).

Como se mencionó anteriormente, en la práctica es casi imposible que el metanol sea un problema en el consumo de vinos de Isabella y de vinos en general. Se puede considerar que la ingesta diaria admisible de metanol (que no generaría riesgo para la salud) es de 8 mg/kg de peso corporal/día, o sea 560 mg por día para una persona de 70 kg (peso que se toma como referencia) (Hodson et al., 2017). Esto significa que podrían consumirse 1,4 litros de un vino que contiene 400 mg/l de metanol, el límite máximo impuesto por la legislación, sin que se genere un problema de salud debido al metanol, pero incluso en esta situación se generaría un daño grave, no por el metanol, sino por el exceso de etanol. Con el fin de medir el consumo alcohólico se emplea la Unidad de Bebida Estándar (U.B.E), que se define como el contenido medio de alcohol de una consumición habitual, que puede variar entre 8 y 12,5 g de etanol según el país (Rodríguez-Martos y col, 1999). Por ejemplo, el valor de la UBE en Argentina se establece en 10 g (Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires, s.f.). Si se considera este valor de UBE, el consumo de bajo riesgo de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, es de 4 UBEs máximo por día para hombres y 2 UBEs para mujeres, o sea 40 g y 20 g de alcohol por día respectivamente. Un vino con 12% de alcohol en volumen contiene 95 g de alcohol por litro, o sea 9,5 UBEs por litro; por consiguiente, 1,4 litros de vino contienen 13,3 UBEs, es decir 133 g de alcohol, que representa más de 3 veces el límite diario recomendado. Por lo tanto, es imposible intoxicarse crónicamente con metanol sin antes dañar la salud por el consumo de etanol.

## **2.12. El germoplasma y conservación de Isabella.**

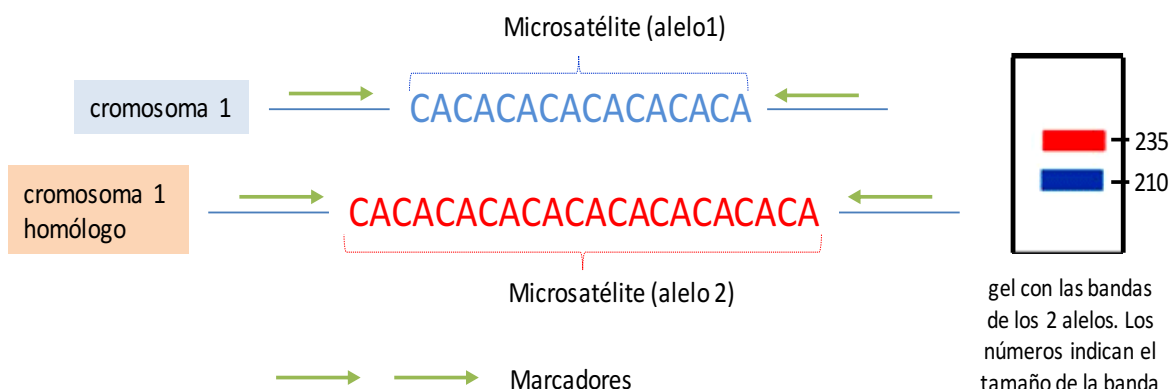
A finales del siglo XIX comenzaron a organizarse en Europa las denominadas colecciones de vid o bancos de germoplasma, que son lugares destinados a la conservación de especies vegetales, sean silvestres o cultivadas; dicho de otro modo, son reservorios genéticos vegetales. El germoplasma es cualquier parte de la planta que puede originar un nuevo individuo: semillas, material vegetativo, células reproductoras o la planta misma. Al conservarse el germoplasma se garantiza que no se pierda la variedad o especie, particularmente aquellas que por algún motivo se encuentran en peligro de extinción. En los bancos de germoplasma se encuentran datos morfológicos, fenotípicos, fenológicos (ciclo de la vid en relación con el medio

ambiente), y en algunos casos, fotos e información genética y ampelográfica (descripción de la vid) de las diferentes variedades de vid. Los bancos de germoplasma no solo brindan información, sino que pueden funcionar como repositorios, es decir, tienen disponible el material vegetal para estudio o cultivo. Gran parte de la información sobre las *Vitis* presentes en diferentes bancos y repositorios y/o descritas en la bibliografía, se han recopilado en el *Vitis* International Variety Catalogue (VIVC), que es una base de datos enciclopédica con alrededor de 23000 cultivares, líneas de mejoramiento y especies de *Vitis* (Maul & Töpfer, 2015). El VIVC es una fuente de información para criadores, investigadores, curadores de depósitos de germoplasma e interesados en el vino. Para acceder a la información, se busca en el catálogo el nombre del cultivar (así se denominan a las diferentes vides en el catálogo). Cuando se accede al VIVC con el nombre de “cultivar Isabella”, aparecen distintas accesiones; en este caso, la accesión de interés es 5560 (Tabla 2.2), según la cual Isabella se encuentra registrada en al menos 45 instituciones de diversas partes del mundo y tiene al menos 104 sinónimos que provienen de citas bibliográficas, aunque no está claro si todas realmente corresponden específicamente a la misma variedad. Se indica además que el pedigrí de Isabella es un híbrido de *V. labrusca* L. con la *V. vinifera* Meslier Petit, confirmado por marcadores genéticos. Este dato es llamativo, ya que en la literatura científica se menciona que la ascendencia vinífera de Isabella es desconocida. De hecho, la accesión probablemente más relacionada con la Isabella original, que es la del Banco de Germoplasma de Plantas de Geneva, Nueva York, la describe como un híbrido de *V. labrusca* x *V. vinifera* desarrollado por W. Prince en 1816 (cabe aclarar que erróneamente se indica el año 1916), pero el pedigrí no se menciona. Lo mismo ocurre en el IVD (Italian *Vitis* Database), donde Isabella o su sinónimo Fragola (fresa en italiano), es catalogada como una variedad de *V. labrusca* L. Situaciones similares ocurren en Brasil, donde “Isabel” está registrada en los Bancos de Germoplasma del EMBRAPA-Semiárido (Petrolina, Pernambuco) y del Embrapa Uva e Vinho (Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul), en las cuales el pedigrí de Isabella no se especifica. La coincidencia en todos los bancos de germoplasma reside en que se reconoce a Isabella como una variedad híbrida de carácter hermafrodita derivada de *V. labrusca*.

Una cuestión clave es como saber si las accesiones de los distintos registros se refieren a la misma Isabella, ya que como se mencionó anteriormente, la variedad tiene numerosos sinónimos y es cultivada en diferentes lugares. Para resolver esta cuestión, se puede recurrir a la ampelografía y ampelometría, pero principalmente a

los datos genéticos. Las *Vitis* son plantas diploides, es decir, que todas las células de la planta, a excepción de las células sexuales, contienen cromosomas en pareja, uno de cada progenitor. Con excepción de Muscadinia, el genoma (conjunto de cromosomas) de las *Vitis* americanas es pequeño y está organizado en 19 pares de cromosomas ( $2n = 38$ ). A lo largo del genoma hay una secuencia de ADN formada por pequeños segmentos que se repiten varias veces uno al lado del otro. La secuencia se denomina microsatélite o SSR (repeticiones de secuencia simple). Los diferentes microsatélites pueden tener distintas longitudes y ser diferentes en el segmento que se repite. Mediante técnicas moleculares como la PCR, se pueden obtener miles de copias de cada uno de los microsatélites usando un primer específico o marcador. Las copias se pueden visualizar en forma de banda en un gel, donde se separan por tamaño (Fig. 2.23). Cuanto mayor es la longitud del microsatélite, mayor es el tamaño de la banda. Diferencias en el tamaño de las bandas para un mismo marcador revela diferencias genéticas entre individuos. En el gel aparecerán una o dos bandas, según si el microsatélite seleccionado es exactamente igual en cada uno de los dos cromosomas (un alelo) o es diferente (dos alelos). También puede aparecer una sola banda porque algún alelo tiene mutaciones que impiden amplificar. El conjunto de bandas (alelos) obtenido con varios marcadores representa la “huella digital”, que identifica a la variedad (Thomas et al., 1994; This et al., 2004; Martinez y col., 2006).

En los bancos de germoplasma, el análisis genético mediante SSR es muy útil para identificar cultivares, identificar sinónimos y reconstruir el pedigrí (Dokupilova et al., 2013). En general, se emplea un set de 9 marcadores, que son los recomendados por la OIV (OIV, 2019), aunque también pueden reportarse datos de otros alelos.



**Figura 2.23.** Representación de microsatélites. El segmento que se repite es CA. En los cromosomas homólogos (que provienen de cada progenitor), la longitud del microsatélite es diferente, es decir, hay 2 alelos. Se selecciona un marcador que amplifica el microsatélite de los dos alelos, y como tienen diferente longitud aparecen dos bandas de distinto tamaño en el gel.



En la Tabla 2.2 se presentan los alelos SSR de Isabella usando diferentes marcadores SSR que han sido reportados en los bancos de germoplasma y catálogos. La información se obtuvo del NPGS, VIVC, IVD y en el caso de Brasil se incluye datos de microsatélites para la Isabella reportados por Embrapa Uva e Vinho (Passaia et al., 2014) y del banco de germoplasma del Embrapa semiarido. Con fines comparativos, se muestran también los alelos SSR del clon Isabel Precoce y de la variedad Concord, la típica uva fox derivada de *V. labrusca*. En Isabella cada marcador genera dos bandas (alelos) diferentes, excepto el marcador VVMD5, donde hay una sola banda (un alelo). Se observa cierta variación en los tamaños de los alelos al comparar las distintas bases de datos, y todos los alelos reportados por el NPGS (que se toma como referencia) son ligeramente superiores al de las otras fuentes. Estas pequeñas diferencias también se observan al comparar los alelos de Isabel Precoce y Concord entre el VIVC y el EMBRAPA Uva e Vinho. Sin embargo, cuando en una misma base de datos se compara Isabella con su clon Isabel Precoce, la coincidencia es total, ya que ambas variedades tienen la misma constitución genética. Esta situación induce a pensar que las pequeñas diferencias de tamaño de los alelos obtenidos con un determinado marcador y reportados por diferentes fuentes no necesariamente implica que se trata de variedades diferentes, sino que puede deberse a la varianza natural entre laboratorios de cualquier análisis genético.

Hasta el presente no se han realizado estudios genéticos de la uva Isabella que se encuentra en Berisso y otras zonas ribereñas del Río de La Plata. Hurrel (2014) identificó por primera vez a la especie *V. labrusca* como parte de la flora adventicia naturalizada que crece en la costa del Río de La Plata, entre Quilmes y Magdalena. Es probable que se trate de la Isabella teniendo en cuenta los comentarios que se realizan en el trabajo, pero este nombre no es mencionado por el autor. En Argentina, el INV reconoce más de 200 variedades de vid para vinificar (RESOL-2021-22-APN-INV#MAGYP), entre las cuales incluye a Isabella (Código 951) como un híbrido productor directo. Se requieren futuras investigaciones para elucidar la genética de la Isabella cultivada en los distintos viñedos de Berisso y compararla con las accesiones presentes en los bancos de germoplasma.

**Tabla 2.2.** Alelos para diferentes microsatélites (SSR) de híbridos de *V. labrusca* L. informada por bancos de germoplasma y catálogos de vides.

Bancos de germoplasma y catálogos	Nombre	Accesión	Pedigrí	Marcadores moleculares																	
				VVS2		VVMD5		VVMD7		VVMD 25		VVMD 27		VVMD 28		VVMD 32		VRZAG 62		VRZAG 79	
				A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
NPGS <sup>a</sup>	Isabella	588207	<i>V. labrusca</i> x <i>V. vinifera</i>	126	155	241	241	239	252			181	185					206	208	243	253
VIVC <sup>b</sup>	Isabella/Isabella Blaue	5560	<i>V. Labrusca</i> x Meslier Petit	123	151	240	240	235	249	241	249	180	184	226	236	248	272	202	204	237	247
	Isabel Precoce	23779	clon de Isabel	123	151	240	240	235	249	241	249	180	184	226	236	248	272	202	204	237	247
	Concord	2801	Catawba x <i>V. labrusca</i> L.	122	133	238	238	235	241	241	241	186	186	230	244	250	272	202	206	247	259
IVD <sup>c</sup>	Isabella (Fragola)	IVD-var_108	<i>Vitis labrusca</i> L.	123	153	237	237	235	249	242	250	179	183	229	239	249	273	204	204	237	247
	EMBRAPA Semiárido <sup>d</sup>	Isabel	BGUVA 228	<i>Vitis Labrusca</i> L.	123	151	236	236	235	249			183	183					203	205	237
EMBRAPA Uva e Vinho <sup>e</sup>		Isabel	1829	<i>Vitis Labrusca</i> L.	123	151			235	248			177	181					201	203	233
	Isabel precoce	2526	clon de Isabel	123	151			235	248			177	181					201	203	233	242
	Concord	1099	<i>Vitis labrusca</i> L.	125	133			235	240			182	184					200	204	242	258

Los números representan el tamaño de la banda en pares de bases. A: alelo 1, A2: alelo 2

<sup>a</sup> NPGS. National Plant Germplasm System, USDA-ARS, Germplasm Resources Information Network (GRIN-Taxonomy), <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/search>

<sup>b</sup> Maul et al. (2020). *Vitis* International Variety Catalogue, [www.vivc.de](http://www.vivc.de) (otros alelos VMC1B11 171-177; VVMD6 200-210; VVMD17 220-220; VVMD21 249-265; VVMD24 208-208)

<sup>c</sup> D'Onofrio C., 2015. Isabella. In: Italian *Vitis* Datababase. ISSN 2282-006X. <https://vitisdb.it/>. Release 30/05/2015

<sup>d</sup> EMBRAPA Semi-Árido, Petrolina, Banco de Germoplasma de Videira (BAG Uva Semiárido), <http://www.cpatsa.embrapa.br/germoplasma/index.php> (otros alelos VVM31 204-216);

<sup>e</sup> EMBRAPA Uva e Vinho, Bento Gonçalves (otros alelos Isabel VWS4 176-183; VVMD6 200-210; VVMD8 137-163, VVM36 261-268), datos tomados de Passaia et al., 2014.

### **2.13. Consideración finales.**

Isabella es y seguirá siendo una uva asociada con la producción en pequeña escala, con viñedos pequeños o medianos, típicos de la agricultura familiar. El vino y otros productos están identificados con lo “regional”, es decir, anclados a un pequeño territorio al que representan. Esta situación favorece su permanencia en países que han impuesto restricciones a su cultivo, aunque hay voces que piden reconsiderar esta situación, incluso en la Unión Europea, o como el caso de Argentina, donde el INV reconoció al vino de la Costa de Berisso como vino regional.

Con respecto a la situación actual de la Isabella en Berisso, transcurridos más de 20 años desde el inicio de la recuperación de la vitivinicultura en esta localidad, hoy se plantean nuevos desafíos referentes al vino de la Costa (Altavista, 2019). El cambio generacional fue crítico a la hora de mantener la producción de Isabella y del vino de la Costa, pero también supuso un impacto social importante porque se generaron nuevas necesidades económicas, sociales y de consumo. Al igual de lo que ocurre con la producción agrícola global, el cambio climático tendrá un impacto importante en la composición de la uva, en el rendimiento de los viñedos y en las características del vino. En la práctica, estas cuestiones implican la búsqueda de nuevas formas de llevar a cabo la producción vitivinícola. El gran desafío del futuro supone también la inversión para desarrollar prácticas y tecnologías que incluyan aspectos sociales, ambientales y de seguridad alimentaria.

A modo de epílogo, se muestra en la Figura 2.24 el itinerario de la Isabella, desde su origen en la costa este de Estados Unidos, hasta su llegada a las costas del Río de la Plata y Brasil, según se deduce de la información obtenida en el presente trabajo.

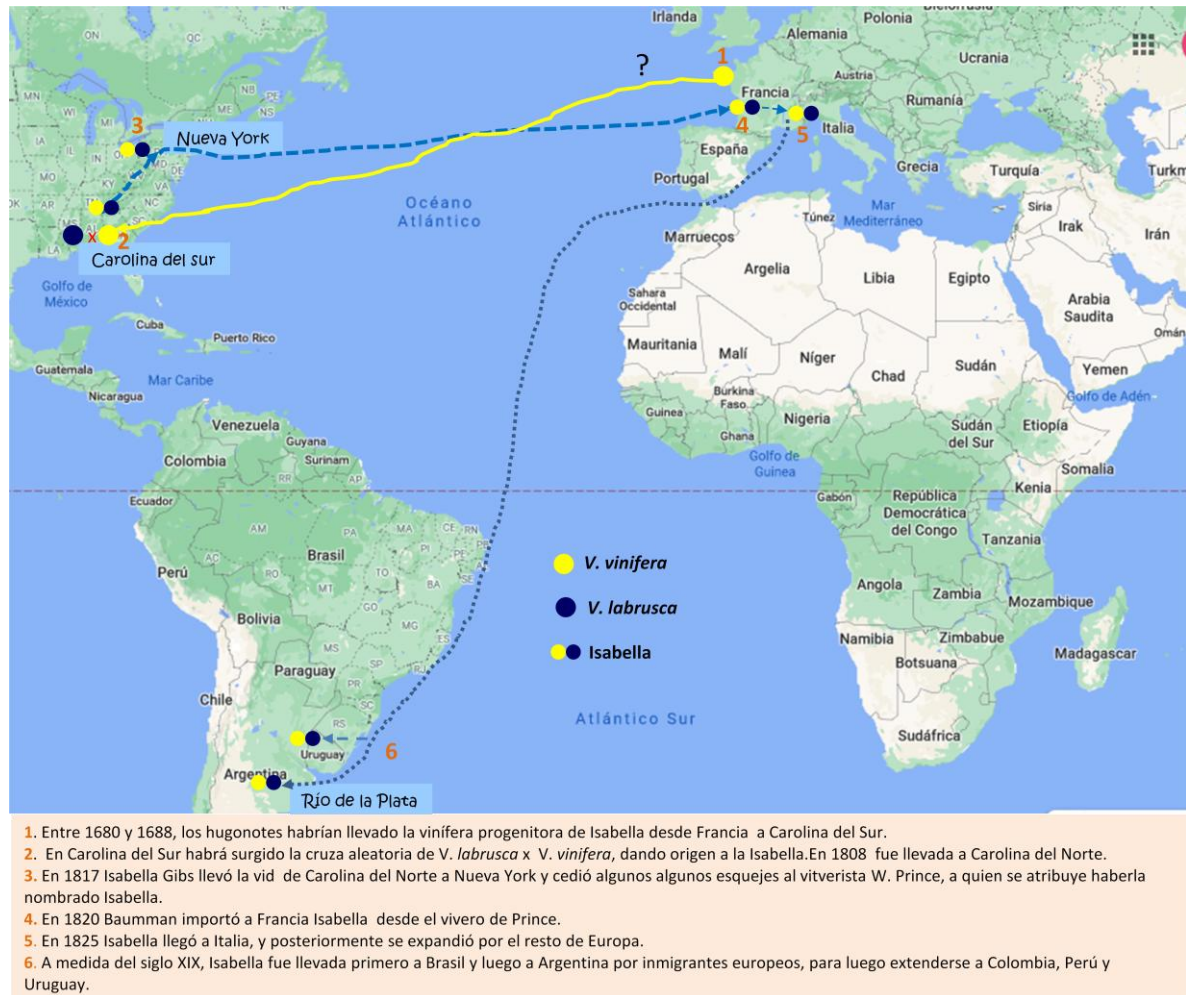


Figura 2.24. Origen y posible itinerario de la Isabella desde Carolina del Sur a Berisso.

## 2.14. Referencias.

Aboitiz, P. (2016, enero 7). Osvaldo Paissan y la tradición del vino patero. Desde la costa de Domínico, mantiene una viva una parte de la historia de Avellaneda. Quintas de Sarandí. Recuperado de <http://quintasdesarandi.blogspot.com/2016/01/>.

Acree, T.E. (1981). The odor quality of *labrusca* grapes. In R. Teranishi., & H. Barrera-Benitez (Eds.). *Quality of selected fruits and vegetables of North America*. ACS Symposium Series, vol 170, Chap 2 (pp. 11-19). ACS Publications.

Acree, T.E., Lavin, E.H., Nishida, R., & Watanabe, S. (1990). O-amino acetophenone the “Foxy” smelling component of *labruscana* grapes. In Y. Bessiere & A.F. Thomas (Eds.), *Flavour Science and Technology*, 6th Weurmann Symposium (pp.49-53). Wiley.

Agnelli, C. (2009, julio 3). Las bodegas Andres Rosso de Ezpeleta. El Quilmero. Recuperado de <https://elquilmero.blogspot.com/2009/07/las-bodegas-andres-rosso-de-ezpeleta.html>.

Alborghetti, L. E. (2018). El Vino de la Costa como generador de identidad y desarrollo turístico en Berisso (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).

Alston, J.M., & Sambucci, O. (2019). Grapes in the World Economy. In D. Cantu., & M. A. Walker (Eds.), *The Grape Genome* (pp.1-24). Springer.

Altavista, C. (2019, abril 14). Golpeada por la crisis, la “sociedad” que resucitó al vino de la Costa dobla la apuesta. El Día. Recuperado de <https://www.eldia.com/nota/2019-4-14-2-18-8-golpeada-por-la-tesis-la-sociedad-que-resucito-al-vino-de-la-costa-dobla-la-apuesta-la-region>.

André, G.; André, M., & Lacombe, T. (2017). *Vitis labrusca* L. et ses principaux hybrides en Franche-Comté, contribution à leur caractérisation. *Les Nouvelles Archives de la Flore jurassienne et du nord-est de la France*, 15, 93-111.

Arcanjo, N.M. O. (2015). Qualidade de vinho tinto produzido com uvas da cultivar Isabel (*Vitis labrusca*) proveniente de duas regiões do Brasil (Nordeste e Sul). <https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/tede/7918/2/arquivototal.pdf>.

Arcanjo, N. M. D. O., Neri-Numa, I. A., Bezerra, T. K. A., Silva, F. L. H. D., Pastore, G. M., & Madruga, M. S. (2017). Quality evaluation of red wines produced from the Isabella and Ives cultivar (*Vitis labrusca*): physicochemical parameters, phenolic composition and antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 37, 184-192.

Ardenghi, N.M.G., Galasso, G., Banfi, E., Zoccola, A., Foggi, B., & Lastrucci, L. (2014). A taxonomic survey of the genus *Vitis* L. (Vitaceae) in Italy, with special reference to Elba Island (Tuscan Archipelago), *Phytotaxa*, 166(3), 163-198.

Noah, A. (2016). Forbidden Fruits: The fabulous destiny of Noah, Othello, Isabelle, Jacquez, Clinton and Herbemont.

Arroyo-García, R., Ruiz-García, L., Bolling, L., Ocete, R., López, M.A., Arnold, C., Ergul, A., Söylemezoğlu, G., Uzun, H.I., Cabello, F., Ibáñez, J., Aradhya, M.K., Atanassov, A.; Atanassov, I., Balint, S., Cenis, J.L., Costantini, L., Goris-Lavets, S., Grando, M.S., Klein, Martinez-Zapater, J.M.(2006). Multiple origins of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L. sp. sativa) based on chloroplast DNA polymorphisms. *Molecular Ecology*, 15(12), 3707–3714.

Atlas: Izabella. (2009). Recuperado de <https://web.archive.org/web/20120316141546/http://uzum.az/index2en.php?page=atlasen%2Fizabella>.

Baek, H.H., Cadwallaver, K.R., Marroquin, E., & Silva, J.L. (1997). Identification of predominant aroma compounds in Muscadine grape juice. *Journal of Food Science*, 62(2), 249-252.

Bailey, L.H. (1934). The species of grapes peculiar to North America. *Gentes Herbarum*, Vol III, 149-244. <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/1934%20Species%20of%20Grapes.pdf>.

Bakos, P.M. (2015). Comprender para acompañar la innovación. La valorización del “Vino Colono” de Misiones a partir del enfoque SIAL. Argos. Universidad Nacional de Misiones. pp.106.

Berman, A. Y., Motechin, R. A., Wiesenfeld, M. Y., & Holz, M. K. (2017). The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. *NPJ Precision Oncology*, 1(1), 1-9.

Berisso (h), J.C. (1987). Los Berisso en la Argentina, 1848-1987. Est. Gráf. Gaglianone.

Bates, T. (2019). Simultaneous measurement of key odorants at their sensory thresholds in juice grapes. [https://ecommons.cornell.edu/bitstream/handle/1813/67281/Bates\\_cornell\\_0058O\\_10468.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://ecommons.cornell.edu/bitstream/handle/1813/67281/Bates_cornell_0058O_10468.pdf?sequence=1&isAllowed=y).

Biasoto, A.C., María, F.N., Marques, E.J.N., & Silva, M.A.A.P. (2014). Acceptability and preference drivers of red wines produced from *Vitis labrusca* and hybrid cultivars. *Food Research International*, 62, 456-466.

Brickell, C.D., Crinan, A., Cubey, J.J., David, J.C., Hoffman, H.M.A., Leslie, A.C., Malécot, V., & Jin, X. (2009). International Code of cultivated plants, 8 ed. *Scripta Horticulturae*, 10, 1-206.

Browne, D.J. (1846). The trees of America; native and foreign, pictorially and botanically delineated and scientifically and popularly described (pp 133-148). Harper & Brothers.

Burin, V. M., Ferreira-Lima, N. E., Panceri, C. P., & Bordignon-Luiz, M. T. (2014). Bioactive compounds and antioxidant activity of *Vitis vinifera* and *Vitis labrusca* grapes: Evaluation of different extraction methods. *Microchemical Journal*, 114, 155-163.

Callen, S.T., Klein, L.L., & Miller, A.J. (2016). Climatic niche characterization of 13 North American *Vitis* species. *American Journal of Enology and Viticulture*, 67, 339-3493.

Camargo, U. A. (2004). 'Isabel Precoce': alternativa para a vitivinicultura brasileira. Embrapa Uva e Vinho-Comunicado Técnico (INFOTECA-E).

Casassa, L. F., & Harbertson, J. F. (2014). Extraction, evolution, and sensory impact of phenolic compounds during red wine maceration. *Annual Review of Food Science and Technology*, 5, 83-109.

Cazarin, C.B.B., Correa, L.C., da Silva, J.K., Batista, A.G., Furlan, C.P.B., Biasoto, A.C.T., Pereira, G.E., Rybka A. C. P, & Maróstica Junior , M.R. (2013). Tropical Isabella grape juices: bioactive compounds and antioxidant power depends on harvest season. *Journal of Food Science and Engineering*, 3, 64-70.

CNA (Censo General Agropecuario. 1908). Viñedos. Tomo 2. 2da parte, pag 428. <http://www.deie.mendoza.gov.ar/#!/censos-productivos/1908-censo-agropecuario-nacional-37>.

Chen, Z.D., Ren, H. y Wen, J. (2007). Vitaceae. En: Z. Y. Wu, D.Y., & P.H. Raven (Eds.) Flora of China, vol 12. Beijing: Science Press and St. Louis :Missouri Botanical Garden Press. Recuperado de <http://flora.huh.harvard.edu/china/mss/volume12/Vitaceae.pdf>.

Childe, G.V. (1996). Los orígenes de la civilización. 2da ed, Fondo de Cultura Económica.

Chueco, M.C. (1886). Los pioneros de la industria nacional. Vol. 1. pp 126-165. <https://books.google.com.ar/books?id=XIRKAAAAYAAJ&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>.

Colmenarejo, R.A. (2017, febrero 27). Vinos de Córdoba.#QUESECEPA:LAUVA ISABELLA. Recuperado de <http://vinosencordoba.blogspot.com/2017/02/quesecepa-la-uva-isabella.html>.

Comeaux, B. L. (1984). Taxonomic studies on certain native grapes of the eastern United States (*Vitis*) (Doctoral dissertation, North Carolina State University).

Christnacher, F., Hartmann, A., & Baumann, A. (n.d). L'épopée des pépinières Baumman de Ballwiller (1730-1990)- et leur influence sur les parcs et jardins botaniques à travers le monde, Recuperado de <https://es.calameo.com/read/000302142f504aec13fa5>.

Cooperativa de Provisión y Comercialización de la Costa de Berisso. (2009). Pliego de condiciones de vino de la Costa de Berisso de calidad garantizada y vino espumoso de la costa de Berisso de calidad garantizada. Titular Cooperativa de Provisión y Comercialización de la Costa de Berisso, limitada. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales,-UNLP, Facultad de Ciencias Exactas-UNLP, CINDEFI (CONICET-UNLP), Municipalidad de Berisso. Enólogo-Fruticultor Héctor Becerra.

Cortes, B. (2010, abril 5). La Costa y las quintas de Villa Domínico. La Tumba de Villa Domínico. Recuperado de <http://latumbadevilladominico.blogspot.com/p/la-costa-y-las-quintas-de-villa.html>.

Cristaldi, F., Leonardi, S., & Licata, D. (2015). L'emigrazione italiana in un bicchier di vino: tra viti, vini e culture. Edizioni Nuova Cultura.

D'Amico, G.; Carut, C.B.; Ghetti, G.; Arbide, D.; Luciano, M. (2016). Transformaciones de las costas estuariales: El caso del Puerto La Plata y la Isla Paulino (Argentina). *Tiempo y Espacio* (35), 150-168. Recuperado de [http://www.memoria.fahce.unlp.edu.ar/art\\_revistas/pr.7748/pr.7748.pdf](http://www.memoria.fahce.unlp.edu.ar/art_revistas/pr.7748/pr.7748.pdf).

De Castilhos, M. B. M., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Del Bianchi, V. L., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2017). Isabel red wines produced from grape pre-drying and submerged cap winemaking: A phenolic and sensory approach. *LWT-Food Science and Technology*, 81, 58-66.

De Freitas, V., & Mateus, N. (2011). Formation of pyranoanthocyanins in red wines: A new and diverse class of anthocyanin derivatives. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401, 1463-1473.

De la Fuente Lloreda, M. (2018). Use of hybrids in viticulture. A challenge for the OIV. *OENO One*, 52(3), 231-234.



De Majo, C., & Relly, E. (2020). American vines, European potatoes: an evolutionary history of European migrations in Southern Brazil. *International Review of Environmental History*, 6(1), 5-29.

Devoto, F.J. (2008). Historia de los italianos en la Argentina. Editorial Biblos.

Demirkol, M., & Tarakci, Z. (2018). Effect of grape (*Vitis labrusca* L.) pomace dried by different methods on physicochemical, microbiological and bioactive properties of yoghurt. *Lwt*, 97, 770-777.

Dion, M. R. Note sur les origines de l'invasion phylloxérique en France. (1970). *Bulletin de l'Association de Géographes Français* 377-378, 31-33.

D'Onofrio, C. (2015). Isabella.

Dokupilova, I., Sturdik, E., & Mihalik, D. (2013). Characterization of vine varieties by SSR markers. *Acta Chimica Slovaca*, 6(2), 227-234.

Dong, Y., Duan, S., Xia, Q., Liang, Z., Dong, X., Margaryan, K., ... & Chen, W. (2023). Dual domestications and origin of traits in grapevine evolution. *Science*, 379(6635), 892-901.

Dutra, M.C.P., de Souza, J. F., Arão, C. V., de Oliveira, D., Giuliano, E.P., & dos Santos Lima, M. (2018). Rapid determination of the aromatic compound methyl-anthranilate, 2'-aminoacetophenone and furaneol by GC-MS: Method validation and characterization of grape derivatives. *Food Research International*, 107, 613-618.

El Tiempo. (4 de agosto de 2016,). Casa Domecq intensificará el cultivo de uva Isabella. Recuperado de <https://www.eltiempo.com/colombia/cal/casa-domecq-intensificara-el-cultivo-de-uva-isabella-37643>.

Enolife. (15 de enero 2020). La colección ampelográfica mundial de la OIV ya tiene 8.000 muestras diferentes. Recuperado de <https://enolife.com.ar/es/la-coleccion-ampelografica-mundial-de-la-oiv-ya-tiene-8-000-muestras-diferentes/>.

Enolife (2021, octubre 20). Nueva lista del INV: en Argentina hay 243 variedades de vid permitidas para vinificar, mesa y pasas. Recuperado de <https://enolife.com.ar/es/nueva-lista-del-inv-en-argentina-hay-243-variedades-de-vid-permitidas-para-vinificar-mesa-y-pasas/>.

Etchandi, M. (2016, enero 26). Vino Pasión, Recuperado de <https://vino-pasion.blogspot.com/2016/01/clarete-tradicional-frutilla-bouza.html>.

Expreso del Tiempo. (2011, noviembre 20). Consumos del Ayer. Comidas, bebidas y tabaco en la Argentina de los siglos XIX y XX. Las bodegas perdidas de

Escobar y Quilmes. Recuperado de <http://consumosdelayer.blogspot.com/2011/11/las-bodegas-perdidas-de-escobar-y.html>.

Faucon, L. (1870). Note sur la nouvelle maladie de la vigne dans le territoire de la commune de Graveson (Bouches-du-Rhône) , Montpellier, p. 10.

Ferreira, V., & Lopez, R. (2019). The actual and potential aroma of winemaking grapes. *Biomolecules*, 9(12). 818.

Fiquepron, R. M. (2017). Los vecinos de Buenos Aires ante las epidemias de cólera y fiebre amarilla (1856-1886), *Quinto Sol*, 21(3), Recuperado de <http://dx.doi.org/10.19137/qs.v21i3.1230>.

Flamini, R., & Tomasi, D. (2000). The anthocyanin content in berries of the hybrid grape cultivars Clinton and Isabella, *Vitis*, 39(2), 79-81.

Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 1043-1048.

Fontaine, M. C., Labbé, F., Dussert, Y., Delière, L., Richart-Cervera, S., Giraud, T., & Delmotte, F. (2021). Europe as a bridgehead in the worldwide invasion history of grapevine downy mildew, *Plasmopara viticola*. *Current Biology*, 31(10), 2155-2166.

Fortes, A.N., & Pais, M.S. (2016). Grape (*Vitis* species). En: M, Simmonds., & V, Preedy (Eds.). *Nutritional composition of fruit cultivars*, (pp. 257-286). Academic Press.

Frankel, C. (Ed.). (2019). *Volcanoes and Wine: From Pompeii to Napa*. The University of Chicago Press.

Freeman Hunt, A.M. (1855). Brief history of the Catawba grape. *Merchants' Magazine and commercial Review*, XXXII (No. II) (pp. 247-248). Recuperado de [https://fraser.stlouisfed.org/files/docs/publications/merchmag/merchmag\\_v32\\_185502.pdf](https://fraser.stlouisfed.org/files/docs/publications/merchmag/merchmag_v32_185502.pdf).

Gaina, B., Fedorchukova, S., & Kobirman, G. (2020). Development of grapes and wine-making industry of Moldova on the basis of modern achievements of science and innovations. In *Agrarian Economy and Rural Development-Realities and Perspectives for Romania*. International Symposium. 11th Edition (pp. 219-223). Bucharest: The Research Institute for Agricultural Economy and Rural Development (ICEADR).

Galet, P. (1988). *Cépages et vignobles de France*. Tome 1. Les vignes Américaines, 2nd ed., Montpellier, France.

Garrido, J., & Borges, F. (2013). Wine and grape polyphenols. A chemical perspective. *Food Research International*, 54, 1844-1858.

Gennari, A., & Estrella, J. (2015) Análisis del mercado de vinos en países de Latinoamérica. Perú. Recuperado de [https://www.tb.camcom.gov.it/uploads/CCIAA/Corsi/Atti/2015\\_06\\_23/Market\\_Analysis\\_Peru.pdf](https://www.tb.camcom.gov.it/uploads/CCIAA/Corsi/Atti/2015_06_23/Market_Analysis_Peru.pdf).

Genovese, A., Piombino, P., Lisanti, M. T., & Moio, L. (2005). Occurrence of furaneol (4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2h)-furanone) in some wines from Italian native grapes. *Annali di Chimica*, 95, 4115-419.

Gessler, C., Blaise, P., & Jermini, M. (2006). Blackrot on the hybrid *Vitis* cultivar Isabella. *IOBC WPRS BULLETIN*, 29(11), 95.

Ghaste, M., Narduzzi, L., Carlin, S., Vrhovsek, U., Shulaev, V., & Mattivi, F. (2015). Chemical composition of volatile aroma metabolites and their glycosylated precursors that can uniquely differentiate individual grape cultivars, *Food Chemistry*, 188, 309-319.

Gil, G.F., & Pszczółkowski, P. (Eds.). (2015). *Viticultura. Fundamentos para optimizar producción y calidad*. 2da ed. Ediciones Universidad Católica de Chile.

Gnekow, B., & Ough, C. S. (1976). Methanol in wines and musts: source and amounts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 27(1), 1-6.

Glossary wein-plus/Clinton.

Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires (s.f.). *Cuidados en el consumo de alcohol*. Ministerio de Salud. <https://buenosaires.gob.ar/salud/prevencionensalud/cuidados-en-el-consumo-de-alcohol>.

Godbout, T.M. (2012, March 2). Wine 101: Isabella. WineCompass. Recuperado de <http://winecompass.blogspot.com/2012/03/wine-101-isabella.html>.

Goldstein, D. (1958). *The Georgian Feast: The vibrant culture and savory food of the Republic of Georgia*. University of California Press, p.4.

González-Barreiro, C., Rial-Otero, R., Cancho-Grande, B., & Simal-Gándara, J. (2015). Wine aroma compounds in grapes: a critical review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55, 202-218.

González-Centeno, M. R., Rosselló, C., Simal, S., Garau, M. C., López, F., & Femenia, A. (2010). Physico-chemical properties of cell wall materials obtained from ten grape varieties and their byproducts: grape pomaces and stems. *LWT-Food Science and Technology*, 43(10), 1580-1586.

Gray, B. (10 de Enero 2019). Fuimos en busca del vino de la costa (y encontramos una tierra detenida en el tiempo). VICE Argentina. Recuperado de [https://www.vice.com/es\\_latam/article/59vxez/fuimos-en-busca-del-vino-de-la-costa-y-encontramos-una-tierra-detenida-en-el-tiempo](https://www.vice.com/es_latam/article/59vxez/fuimos-en-busca-del-vino-de-la-costa-y-encontramos-una-tierra-detenida-en-el-tiempo).

Guedes de Pinho, P., & Bertrand, A. (1995). Analytical determination of furaneol (2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone). Application to differentiation of white wines from hybrid and various *Vitis vinifera* cultivars. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 181-186.

Haba, J. P. (2005). La filoxera en España y su difusión espacial. *Cuadernos de Geografía*, 77, 101-136.

Hanlin, R. L., Hrmova, M., Harbertson, J. F., & Downey, M. O. (2010). Condensed tannin and grape cell wall interactions and their impact on tannin extractability into wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16(1), 173-188.

Harsich, G. M. (2021). El vino de la memoria. El caso de Avellaneda-Argentina. file:///C:/Users/Usuario/Downloads/EI%20vino%20de%20la%20memoria.%20El%20ca so%20de%20Avellaneda-Argentina.%20Harsich%202021.pdf.

Herderich, M. J., & Smith, P. A. (2005). Analysis of grape and wine tannins: Methods, applications and challenges. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 205-214.

Hedrick, U.P. (1908). The grapes of New York, Isabella. JB Lyon Company, State Printers. Recuperado de [https://www.gutenberg.org/files/45978/45978-h/45978-h.htm#page\\_308](https://www.gutenberg.org/files/45978/45978-h/45978-h.htm#page_308).

Heinitz, C. C., Uretsky, J., Dodson Peterson, J. C., Huerta-Acosta, K. G., & Walker, M. A. (2019). Crop wild relatives of grape (*Vitis vinifera* L.) throughout North America. In *North American Crop Wild Relatives*, Volume 2 (pp. 329-351). Springer, Cham.

Herrera, N. (2018). Inmigración en Berisso (Argentina, 1909-2010). Dinámicas migratorias, caracterización demográfica y segregación espacial. *Século XXI, Revista de Ciências Sociais*, 8(1), 166-202. Recuperado de file:///C:/Users/Usuario/Downloads/35671-169797-1-PB%20(1).pdf.

Hodson, G., Wilkes, E., Azevedo, S., & Battaglene, T. (2017). Methanol in wine. *Bio Web Conf.* 9. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20170902028>.

Honan, K. ABC Rural. (20 mayo de 2013). Vineyard celebrates first planting. Recuperado de <https://www.abc.net.au/news/rural/2013-05-08/winery-celebrates-150-years-first-planting/4675458>.

Hornedo-Ortega, R., González-Centeno, M.R., Chira, K., Jourdes, M., & Teissedre, L. (2020). Phenolic compounds of grapes and wines: key compounds and implications in sensory perception. In: F. Cosme, F.M. Nunes, & L. Filipe-Ribeiro (Eds.) *Chemistry and Biochemistry of Winemaking, Wine Stabilization and Aging*. Chap 2, IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.93127

Hoy (2003 febrero 17). A pesar de la debacle, Berisso todavía conserva el sabor del "Vino de la Costa". Recuperado de <https://studylib.es/doc/5479405/a-pesar-de-la-debacle--berisso-todav%C3%ADa-conserva-el-sabor->.

Huber, F., Röckel, F., Schwander, F., Maul, E., Eibach, R., Cousins, P., & Töpfer, R. (2016). A view into American grapevine history: *Vitis vinifera* cv. Sémillon is an ancestor of 'Catawba' and 'Concord'. *Vitis*, 55(2), 53–56.

Huetz de Lemps, A. (1992). La vigne américaine au secours de l'Europe. *Les Cahiers d'Outre-Mer*, 45(179), 461-478.

Hurrel, J.A., Cabanillas, P.A., Delucchi, G. y Guerrero, E.L. (2014). Naturalización y etnobotánica de *Vitis labrusca* L. (Vitaceae) en la región rioplatense, Argentina. *Revista Museo Argentino de Ciencias Naturales, n.s.*, 16 (1), 13-18.

Ickert-Bond, S., Lutz, S & Wen, J. (2018). A detailed study of leaf micromorphology and anatomy of New World *Vitis* L. subgenus *Vitis* within a phylogenetic and ecological framework reveals evolutionary convergence. *Journal of Systematics and Evolution*. 56 (4), 309-330.

IBGE. Banco de datos agregados (2013). Pesquisa industrial anual produto. Recuperado de <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=3337&z=t&o=22&i=P>.

Iglesias, A.M. (2018). Análisis de la "Fiesta del vino de la costa de Berisso" como producto enoturístico. Tesis de grado. Universidad Nacional del Centro de La Provincia de Buenos Aires. <https://www.ridaa.unicen.edu.ar/xmlui/bitstream/handle/123456789/2180/Analia%20Iglesias.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

INAVI. (2018). Estadística de viñedos 2018. Datos nacionales. Recuperado de <https://southamericawineguide.com/wp-content/uploads/2018/09/Uruguay-wine-production-statistics-2018.pdf>.

INV. (2018). Límites y tolerancias analíticas. Res-2018-2-APN-INV#MPYT.

Ito, Y., Sugimoto, A., Kakuda, T., & Kubota, K. (2002). Identification of potent odorants in Chinese jasmine green tea scented with flowers of *Jasminum sambac*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17), 4878-4884.

Jackson, R.S. (Ed.). (2014). *Wine Science. Principles and applications*. 4<sup>th</sup> ed. Academic Press.

Kartesz, J.T. (2015). The Biota of North America (BONAP). Taxonomica Data Center. <http://www.bonap.net/tdc>.

Keller, M. (Ed.). (2015). The Science of grapevines. *Botany and Anatomy* 2<sup>nd</sup> ed. (pp. 1-57). Academic Press.

Klein, L.L., Miller, A.J., Ciotir, C., Katie Hyma, K., Uribe-Convers, S., & Londo, J. (2018). High-throughput sequencing data clarify evolutionary relationships among North American *Vitis* species and improve identification in USDA *Vitis* germplasm collections. *American Journal of Botany*, 105(2): 215–226.

Kotseridis, Y., Razungles., A., Bertrand., A and Raymond Baumes, R. (2000). Differentiation of the aromas of Merlot and Cabernet Sauvignon wines using sensory and instrumental analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5383-5388.

Kucherenko, V., & Bilko, M. (2020). Quantitative content of methanol in wines of isabel grape varieties and its impact on consumer health. *Редакційна колегія*, 16.

Kulakiotu, E. K., Thanassouloupoulos, C. C., & Sfakiotakis, E. M. (2004). Biological control of *Botrytis cinerea* by volatiles of 'Isabella'grapes. *Phytopathology*, 94(9), 924-931.

Kurt-Celebi, A., Colak, N., Hayirlioglu-Ayaz, S., Kostadinović Veličkovska, S., Ilieva, F., Esatbeyoglu, T., & Ayaz, F. A. (2020). Accumulation of phenolic compounds and antioxidant capacity during berry development in black "Isabel" grape (*Vitis vinifera* L. x *Vitis labrusca* L.). *Molecules*, 25(17), 3845. MDPI AG.

Lara, M., Iriarte-Chiapusso, M. J., Cantos, M., Jiménez, J. L. G., Morales, R., Ocete, C. A., & Ocete, R. (2017). La vid silvestre. Un importante recurso fitogenético sin protección legal en España. *Revista Iberoamericana de Viticultura, Agroindustria y Ruralidad*, 4(12), 46-69.

Leão, P.C.S., Riaz, S., Graziani, R., Dangl, G.S., Motoike, S.Y., & Walker, M.A. (2009). Characterization of a Brazilian grape germplasm collection using microsatellite markers. *American Journal of Enology and Viticulture*, 60(4), 517-524.

Lee, C.Y., Robinson, W.B., Van Buren, J.P., Acree, T.E., & Stoewsand, G.S. (1975). Methanol in wines in relation to processing and variety. *American Journal of Enology and viticulture*, 26(4), 184-187.

Linneo, C. (1753). *Species Plantarum*, 1:203. Recuperado de <http://www.botanicus.org/title/b12069590#>.

Lloreda de la Fuente., M. (2018). Use of hybrids in viticulture. A challenge for the OIV. *Oeno One*, 52(3), 231-234.

Lobato, M. Z. (2004). La vida en las fábricas: Trabajo, protesta y política en una comunidad obrera, Berisso (1904-1970). 2da ed. Prometeo Libros. Recuperado de <https://libros.unlp.edu.ar/index.php/unlp/catalog/view/776/769/2573-1>.

Lobato, M. Z. (2016). Vino de la Costa. Museo 1871 Berisso. <http://museo1871berisso.org.ar/portfolio-posts/vino-de-la-costa/>.

Love, K., & Paull, R.E. (2014). Growing Grapes in Hawai'i. Recuperado de [https://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/F\\_N-26.pdf](https://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/F_N-26.pdf).

Lund, K. T., Riaz, S., & Walker, M. A. (2017). Population structure, diversity and reproductive mode of the grape phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae*) across its native range. *PLoS One*, 12 (1), e0170678.

Lukacs, P. (Ed.). (2000). American vintage: the rise of American wine. Houghton Mifflin.

Mabberley, D.J. (1999). *Vitis* × *alexanderi* Prince ex Jacques (Vitaceae), the first 'American Hybrid' grapes. *Telopea*, 8(3), 377-379.

Majo, C., & Moretto, S.P. (2021). From slash and burn to winemaking: the historical trajectory of Italian colonos in the uplands of Rio Grande do Sul, Brazil. *Modern Italy*, 26 (2), 141–158.

Mammadova, S. M., Fataliyev, H. K., Gadimova, N. S., Aliyeva, G. R., TAGIYEV, A. T., & Baloglanova, K. V. (2020). Production of functional products using grape processing residuals. *Food Science and Technology*, 40, 422-428.

Marín, D. (2010, enero 31). Don Renzo, la voz de los viñateros olvidados del Río de La Plata. Ciudad Berisso. Recuperado de <http://www.berissociudad.com.ar/nota.asp?id=97707&t=Don-Renzo-la-voz-de-los-vinateros-olvidados-del-Rio-de-la-Plata>. 31-01-2020.

Martínez, L., Cavagnaro, P., & Masuelli, R. W. (2006). Caracterización molecular de variedades de vid (*Vitis vinifera* L.) de calidad enológica por marcadores microsatelitales. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 38 (1), 77-86.

Martinson, T & Reisch, B. Will Europe embrace hybrid wine grapes?. 8-7-2018. <https://winesvinesanalytics.com/news/article/201942/Will-Europe-Embrace-Hybrid-Wine-Gra>.

Masahiko Y., & Sato, A. (2016). Advances in table grape breeding in Japan, *Breeding Science*, 66(1), 34-45.

Maul, E., & Töpfer, R. (2015). *Vitis* International Variety Catalogue (VIVC): A cultivar database referenced by genetic profiles and morphology. In BIO Web of conferences (Vol. 5, p. 01009). EDP Sciences.

Maul et al., (2019) *Vitis* International Variety Catalogue ([www.vivc.de](http://www.vivc.de)).

Mayson, R. (2020). The wines of Portugal. Infinite Ideas.

McLeRoy, S.S., & Renfro, R.E. (Eds.). (2008). Grape man of Texas. Thomas Volney Munson and the origin of American viticulture. The Wine Appreciation Guild.

Meloni, G., & Swinnen, J. (2012). The Political Economy of European Wine Regulations, LICOS Discussion Paper, No. 320, Katholieke Universiteit Leuven, LICOS Centre for Institutions and Economic Performance, Leuven. Recuperado de <https://www.econstor.eu/handle/10419/74854>.

Merchán, P. J. A., Reyes, A. J., Luis-Ayala, M. A., Balaguera, W., & Serrano-Cely, P. A. (2015). Evaluación sensorial del vino artesanal de uva Isabella (*Vitis labrusca* L.). *Revista Ciencia y Agricultura*, 12(2), 71-81.

McGovern et al., (2017) Early Neolithic wine of Georgia in the South Caucasus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114 (48), E10309-E10318

Moore, M.O. (1991). Classification and systematics of eastern north American *Vitis* L. Vitaceae north of Mexico. *Sida*, 14(3):339–367.

Moore, M.O., & Wen, J. (2016). Vitaceae. In Flora of North America Editorial Committee [eds.], *Flora of North America North of Mexico*, Vol. 12. Oxford University Press.

Morano, L. D., and Walker, M. A. (1995). Soils and plant communities associated with three *Vitis* species. *American Midland Naturalist*, 134(2), 254–263.

Munson, T.V. (Ed.). (1909) Foundations of the American Grape culture. Orange Judd Company. Recuperado de <https://archive.org/details/foundationsofame00munsrich>.



Narduzzi, L., Stanstrup, J., & Mattivi, F. (2015). Comparing wild american grapes with *Vitis vinifera*: A metabolomics study of grape composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(30), 6823–6834.

Nelson, R.R., Acree, T.E., Lee, C.Y., & Butts, R. M. (1977). Methyl anthranilate as an aroma constituent of American wine. *Food Chemistry*, 42,57-59.

Nixdorf, S. L., & Herмосín-Gutiérrez, I. (2010). Brazilian red wines made from the hybrid grape cultivar Isabel: Phenolic composition and antioxidant capacity. *Analytica Chimica Acta*, 659(1-2), 208-215.

Nuñez, G.E (2016, agosto 7). Domecq, un brandy de pura cepa. La Economía.com. Recuperado de <https://diariolaeconomia.com/erase-una-vez/item/2441-domecq-un-brandy-de-pura-cepa.html>.

Ocete, C.A et al., (2018) La vid silvestre euroasiática, un recurso fitogenético amenazado ligado a la historia de la humanidad. *Enoviticultura*, 50,1-16.

O Correio-Mor (2015, febrero 2). O “Morangueiro”. Recuperado de <http://correio-mor.blogspot.com/2015/02/o-morangueiro.html>.

OIV. (2013). International list of vine varieties and their synonyms. <http://www.oiv.int/public/medias/2273/oiv-liste-publication-2013-complete.pdf>.

OIV. (2019, abril 11). Con 292,3 millones de hectolitros, la producción mundial de vino alcanza un récord en 2018. <http://www.oiv.int/public/medias/6667/es-nota-de-prensa-oiv-11042019.pdf>.

OIV. (2019). Protocolo de identificación de variedades de la OIV. Resolución OIV-VITI 609-2019. <https://www.oiv.int/public/medias/6903/oiv-viti-609-2019-es.pdf>.

OIV. (2022). Actualidad de la coyuntura del sector vitivinícola mundial en 2022. [https://www.oiv.int/sites/default/files/documents/OIV\\_Actualidad\\_de\\_la\\_coyuntura\\_del\\_sector\\_vitivinicola\\_mundial\\_en\\_2022\\_0.pdf](https://www.oiv.int/sites/default/files/documents/OIV_Actualidad_de_la_coyuntura_del_sector_vitivinicola_mundial_en_2022_0.pdf).

Olien, W.C. (1990). The muscadine grape: botany, viticulture, history, and current industry. *HortScience*, 25(7), 732-739.

Ollat, N., Bordenave, L., Tandonnet, J.P., Boursiquot, J.M., & Marguerit, E. (2016). Grapevine rootstocks: origins and perspectives. In F. Gaiotti, F. Battista., & D. Tomasi (Eds.). I International Symposium on Grapevine Roots (pp. 11-22).

Ospital, M.S. (2003). Vino en la pampa. La actividad vitivinícola en la provincia de Buenos Aires, 1900-1940. *Mundo Agrario*, 4(7), 2do semestre.

Otero, J. (2013). Factores de la reactivación de un producto agroalimentario típico: el vino de la costa de Berisso, Argentina. *Cuaderno de Desarrollo rural*, 10(71), 37-58

Pacifico, S., D'Abrosca, B., Scognamiglio, M., Gallicchio, M., Potenza, N., Piccolella, S., & Fiorentino, A. (2011). Metabolic profiling of strawberry grape (*Vitis labruscana* cv.'Isabella') components by nuclear magnetic resonance (NMR) and evaluation of their antioxidant and antiproliferative properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(14), 7679-7687.

Panighel A., Dalla Vedova. A., De Rosso. M., Gardiman. M., & Flamini. R. (2010). A solid-phase microextraction gas chromatography/ion trap tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of 'foxy smelling compounds' and 3-alkyl-2-methoxypyrazines in grape juice. *Rapid communications in mass spectrometry*, 24(14), 2023-2029.

Parma, S. (2013). El patrimonio cultural inmigratorio y su uso como recurso turístico. Caso: ciudad de Berisso. Recuperado de [https://digital.cic.gba.gob.ar/bitstream/handle/11746/939/11746\\_939.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://digital.cic.gba.gob.ar/bitstream/handle/11746/939/11746_939.pdf?sequence=1&isAllowed=y).

Passaia, G., Margis-Pinheiro, M., Fialho, F.B., Sbeghen, F., Porto, D.D., & Revers, L.F. (2014) Characterization of an early berry development grapevine somatic variant (*Vitis labrusca* L. cv. Isabel Precoce). *American Journal of Plant Sciences*, 5, 3848-3865.

Perry, D.M., & Hayes, J.E. (2016). Effects of matrix composition on detection threshold estimates for methyl anthranilate and 2-aminoacetophenone. *Foods*, 5(35).

Perry, D.M., Byrnes, N.K., Heymann, H., & Hayes, J.E. (2019). Rejection of *labrusca*-type aromas in wine differs by wine expertise and geographic region. *Food Quality and Preference*, 74, 147-154.

Perry, R.L., & Sabbatini, P. (2015). Grape rootstocks for Michigan. Recuperado de <https://www.canr.msu.edu/uploads/resources/pdfs/graperootstockbulletinweb.pdf>.

Pierini, P.J., & Ganganelli, I. (2017). Evaluación de diferentes formas de conducción del viñedo en la zona costera del Río de La Plata (tesina de licenciatura). Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata. Recuperado de [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/60116/Documento\\_completo.pdf?sequence=3&isAllowed=y](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/60116/Documento_completo.pdf?sequence=3&isAllowed=y).

Pinney, T.A. (Ed.). (1989). *History of Wine in America, Volume 1: From the Beginnings to Prohibition*. University of California Press.

Planchon, M.J.E. (1874). Les Vignes Sauvages Des États-Unis De L'Amérique Du Nord, *Bulletin de la Société Botanique de France*, 21(4), 107-113.

Polo, L.M. (2014, julio 23). Los sabores de la Isabella, la uva prohibida del vino, El Tiempo, Bogotá. Recuperado de <https://www.eltiempo.com/archivo/documento/CMS-14293343>.

Posada, M., & Velarde, I. (2000). Estrategias de desarrollo local a partir de productos alimentarios típicos: el caso del vino de la Costa en Buenos Aires, Argentina. *Problemas del Desarrollo, Revista Latinoamericana de Economía*.121, (abril/junio, 31), 63-84.

Power, F.B & Chesnat, V.K. (1923). Examination of authentic grape juices for methyl anthranilate. *Journal of Agricultural Research*. XXIII, 47-53.

Prince, W.R. (1830). Isabella (Gibbs grape). *Vitis labrusca* v. Isabella. Treatise on the vine; embracing its history from the earliest ages to the present day, with description of about two hundred foreign, and eighty American varieties; together with a complete dissertation on the establishment, culture, and management of vineyards (pp. 165-167). J Seymour Printer. Recuperado de <https://archive.org/details/treatiseonvineem00prinrich?ref=ol&view=theater>.

Ramírez, E. (2017, febrero 23) Isabella:Borgoña peruana. Recuperado de <http://elprofe-sabe.blogspot.com/2017/02/isabella-borgona-peruana.html>

Rapp, A., Knipser W., Engel, L., Ullemeyer, H., & Heimann, W. (1980). Off-flavor compounds in the berry and wine aroma of grapevine hybrids. 1. The strawberry-like flavor. *Vitis*, 19(1), 13–23.

Ravaz, L. (1902). Les vignes américaines/ Porte-greffes et producteurs-directs / Caractères – Aptitudes. <https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k6338712v/f17.image> Masson, 376.

Revilla, I., & González-SanJosé, M. L. (1998). Methanol release during fermentation of red grapes treated with pectolytic enzymes. *Food chemistry*, 63(3), 307-312.

Rice, A.C. (1974). Chemistry of winemaking from native american grape varieties. In A. Dinsmoor Webb, *Chemistry of wine making*, Chapter 4, pp 88-115, ACS Publications.

Rizzon, L.A., Miele, A., & Meneguzzo, J. (2000). Avaliação da uva cv. Isabel para a elaboração de vinho tinto. *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas*, 20(1), 115-121.

Robinson, J., Harding, J., & Vouillamoz, J. (Eds.) (2012). Wine grapes. A complete guide to 1.368 vine varieties, including their origins and flavours. Penguin Books Ltd.

Robinson, J. (Ed.). (2006). The Oxford Companion to wine. 3rd ed. Oxford University Press.

Rockenbach, I. I., Gonzaga, L. V., Rizelio, V. M., Gonçalves, A. E. D. S. S., Genovese, M. I., & Fett, R. (2011). Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. *Food Research International*, 44(4), 897-901.

Rodríguez-Martos Dauer, A., Gual Solé, A., & Llopis Llácer, J. J. (1999). La unidad de bebida estándar como registro simplificado del consumo de bebidas alcohólicas y su determinación en España. *Medicina clínica*, 112(12), 446-450.

Roggio, A. (13 de marzo de 2019). La reivindicación de la uva frambua: ahora también en espumante y helado. FM Comunicar. Colonia Caroya. <https://fm-comunicar.com.ar/contenido/11416/la-reivindicacion-de-la-uva-frambua-ahora-tambien-en-espumante-y-helado>.

Rombough, L. (Ed.). (2002) The Grape Grower. A guide to organic agriculture. Chelsea Green Publishing.

Rorato, G. (6 de mayo de 2009,). I vini proibiti. Recuperado de <http://giampierororato.blogspot.com/2009/05/i-vini-proibiti.html>.

Sabbatini, P., & Howell, S.G. (2014, January) *Vitis* hybrids: history and current status. *Wines & Vines*, 135-142. Recuperado de <https://winesvinesanalytics.com/features/article/125976/emVitis-em-Hybrids-History-and-Current-Status>.

Sabir, A., Unver, A., & Kara, Z. (2012). The fatty acid and tocopherol constituents of the seed oil extracted from 21 grape varieties (*Vitis* spp.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(9), 1982-1987.

Sasaki, K., Takase, H., Tanzawa, F., Kobayashi, H., Saito, H., Matsuo, H., & Takata, R. (2015). Identification of furaneol glucopyranoside, the precursor of strawberry-like aroma, Furaneol, in Muscat Bailey A. *American Journal of Enology and Viticulture*, 66(1), 91-94.

Savchuk, S. A., Palacio, C., Gil, A., Tagliaro, F., Kuznetsov, R. M., Brito, A., & Appolonova, S. A. (2020). Determination of the chemical composition of alcoholic beverages by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(9), e14676.

Sayavedra, L. (2017). Berisso brinda con vino propio. Crónicas nacidas al pie de la viña. [http://berisso.gov.ar/fiestadelvino/pdf/Berisso\\_brinda\\_con\\_vino\\_propio.pdf](http://berisso.gov.ar/fiestadelvino/pdf/Berisso_brinda_con_vino_propio.pdf)

Sawler, J., Reisch, B., Aradhya, M. K., Prins, B., Zhong, G. Y., Schwaninger, H., Simon, C., Buckler, E., & Myles, S. (2013). Genomics assisted ancestry deconvolution in grape. *PLoS one*, 8(11), e80791.

Schaich, K. M., Tian, X., & Xie, J. (2015). Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of Functional Foods*, 14, 111-125.

Schuck, M.R., Moreira, F.M., Guerra, P.M., Voltolini, J.A., Grando, M.S., & daSilva, A.P. (2009). Molecular characterization of grapevine from Santa Catarina, Brazil, using microsatellite markers. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44(5), 487-495.

Shikhamany, S.D. (2011). Grapes of India. In M.K, Papademetriou., & F. J, Dent (Eds.). *Grape production in the Asian-Pacific region*, FAO. p.28.

Simpson, M. G. (2019). *Plant systematics*. Academic press.

Sisterna, M., Ronco, L., Voget, C., Marasas, M., Abbona, E., Romero, M., Daniele, J., Artaza, S., Otero, J., Sepúlveda, C., Avila, G., Loviso, C., Orozco, E., Bonicatto, M., Condes, C., & Velarde, I. (2010). American Grapevine Culture and Research in Berisso, Argentina. *The Americas Journal of Plant Science and Biotechnology*, 3 (Special Issue 1), 38-53.

Soares, S., Brandão, E., Mateus, N. & de Freitas, V. (2017). Sensorial properties of red wine polyphenols: astringency and bitterness. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(5), 937-948.

Smith, P. A., McRae, J. M., & Bindon, K. A. (2015). Impact of winemaking practices on the concentration and composition of tannins in red wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21, 601-614.

Spooner, J. A. (1838). Isabella Grape Vines-Wine,&c. *American Silk Grower and Farmer's Manual, Vol 1*,19-21.

Spooner, A. J. (Ed.). (1858). History of the Isabella grape vine. *The cultivation of American grapes vines, and making of wine*, 2<sup>nd</sup> ed., (pp. 13-16). A, Spooner & Co. Printers. Recuperado de [https://books.google.com.ar/books?id=XUJKAAAIAAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.ar/books?id=XUJKAAAIAAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false).

Springer, L.F., & Sacks, G. I. (2014). Protein-precipitable tannin in wines *from Vitis vinifera* and interspecific hybrid grapes (*Vitis* ssp.): differences in concentration,

extractability, and cell wall binding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 7515–7523.

Sun, Q., Gates, M.J., Lavin, E.H., & Acree, T. (2011). Comparison of odor-active compounds in grapes and wines from *Vitis vinifera* and non-foxy American grape species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(19), 10657-64.

Swift, J.G. (1858). History of the Isabella Grape. *Hunt's Merchants' Magazine and Commercial Review*, 38, p 374.

Tabbia, M. (2018, marzo). Colonia Caroya sigue apostando por el fortalecimiento del sector vitivinícola. Primer Día. Recuperado de <http://www.semanarioprimerdia.com.ar/2018/03/colonia-caroya-sigue-apostando-por-el.html>.

Tagliabue, P. (2011) Entre los montes, la isla y el continente: Continuidades y cambios de la agricultura familiar en Berisso [1955- 2010]. Trabajo final de grado. Universidad Nacional de La Plata. <http://www.memoria.fahce.unlp.edu.ar/tesis/te.722/te.722.pdf>.

Teissedre, P.L & Jourdes, M. (2013). Tannins and anthocyanins of wine: phytochemistry and organoleptic properties. In: K, Ramawat., & J. M, Mérillon, J.M. (Eds.). *Natural Products*. Springer.

Tischelmayer, N. (2019, December 19). Isabella. Wein-Plus Glossary. Recuperado de <https://glossary.wein-plus.eu/isabella>.

The Plant List. (2013). Version 1.1. <http://www.theplantlist.org/> (accessed 1st January).

This, P., Jung, A., Boccacci, P., Borrego, J., Botta, R., Costantini, L., ... & Maul, E. (2004). Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 109, 1448-1458.

Thomas, M. R., Cain, P., & Scott, N. S. (1994). DNA typing of grapevines: A universal methodology and database for describing cultivars and evaluating genetic relatedness. *Plant Molecular Biology*, 25(6), 939-949.

Töpfer R., Hausmann. L., Harst, M., Maul, E., Zyprian, E., & Eibach, R. (2011). *New horizons for grapevine breeding*, Global Science Books.

Trindade, C., Bortolini, G. V., Costa, B. S., Anghinoni, J. C., Guecheva, T. N., Arias, X., & Henriques, J. A. P. (2016). Antimutagenic and antioxidant properties of the aqueous extracts of organic and conventional grapevine *Vitis labrusca* cv. Isabella leaves in V79 cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 79(18), 825-836.

Troncozo, M. I. (2019). Biotransformación de los residuos del vino de la costa de Berisso (provincia de Buenos Aires) por hongos saprótrofos (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).

Tscheik, G., Gangl, H., Batusic, M., Tiefenbrunner, W., & für Weinbau, B. (2019). Charakterisierung des weins ("uhudler") und des traubensafts von reb-interspezieshybriden des südurgenlandes. *Mitteilungen Klosterneuburg*, 69(2019), 40-58.

Turone, G.O. (n.d.) El vino de la Costa. Revisionistas. Acceso 05-04-2020. Recuperado de <http://www.revisionistas.com.ar/?p=15543>.

Upadhyay, A., Aher, L. B., Shinde, M. P., Mundankar, K. Y., Datre, A., & Karibasappa, G. S. (2013). Microsatellite analysis to rationalize grape germplasm in India and development of a molecular database. *Plant Genetic Resources*, 11(3), 225-233.

Van Ruymbek, B. (2006). From New Babylon to Eden: the Huguenots and their migration to colonial South Carolina. University of South Carolina Press.

Velarde, I., Marasas, M., Otero, J., & Theiller, M. (2006). Desarrollo local agroecológico: diferenciación y valorización de recursos locales de Berisso, Buenos Aires, (pp. 395-410). Desarrollo Rural: Organizaciones, Instituciones y Territorios. Ciccus

Velarde, I., Voget, C., Avila, G., Loviso, C., Orozco, E., Sepúlveda, C., & Artaza, S. (2008). Influencia de la calidad en el consumo de productos patrimoniales: el caso del sistema agroalimentario del vino de la costa de Berisso, (pp. 29-63). Sistemas Agroalimentarios Localizados en Argentina. INTA, INRA.

Velarde, I. (2010). Valorización de los recursos agroalimentarios locales como estrategia de desarrollo rural: estudio de caso del vino de la costa de Berisso, Argentina (Tesis de Magister). Recuperado de [http://syal.agropolis.fr/thesis%3Ftask=callelement&format=raw&item\\_id=237&element=8f9e6e95-745e-4e81-be7e-267ed2ad6623&method=download](http://syal.agropolis.fr/thesis%3Ftask=callelement&format=raw&item_id=237&element=8f9e6e95-745e-4e81-be7e-267ed2ad6623&method=download).

Velarde, I., Barrionuevo, C., Bruno, M. P., & Cendón, M. L. (2021). Las fiestas como estrategia de valorización de recursos territoriales: experiencias en la Provincia de Buenos Aires, Argentina. Instituto de Estudios Avanzados, Universidad de Santiago de Chile.

Viret, O., Spring, J. L., Zufferey, V., Gindro, K., Linder, C., Gaume, A., & Murisier, F. (2019). Past and future of sustainable viticulture in Switzerland. In BIO Web of Conferences (Vol. 15, p. 01013). EDP Sciences.

Voget, C., Orosco, E., Loviso., C, Condes, C., Sepúlveda, C., Ávila, G. y Velarde, I. (octubre, 2009). Vinificación de *Vitis labrusca* (syn. *V. labruscana* Bailey, Fox grape) variedad Isabella: el vino de la costa de Berisso. XII Congreso CYTAL-AATA. Concordia. Argentina.

Walker, M.A., Heinitz, C., Riaz, S. & Uretsky, J. (2019). Grape Taxonomy and Germplasm. In: D. Cantu., & M. A. Walker.(Eds.). *The Grape Genome*, (pp. 25-38), Springer.

Wan, Y., Schwaninger, H.R., Baldo, A.M., Labate, J.A., Zhong, G.Y., & Simon, C.J. (2013). A phylogenetic analysis of the grape genus (*Vitis* L.) reveals broad reticulation and concurrent diversification during neogene and quaternary climate change. *BMC Evolutionary Biology*, 13:141.

Wang, J., & De Luca, V. (2005). The biosynthesis and regulation of biosynthesis of Concord grape fruit esters, including 'foxy' methylanthranilate. *The Plant journal*, 44(4). 606-619.

WatreLOT, A. A., & Norton, E. L. (2020). Chemistry and reactivity of tannins in *Vitis* spp.: A review. *Molecules*, 25(9), 2110.

Wen, J., Harris, A. J., Kalburgi, Y., Zhang, N., Xu, Y., Zheng, W., Ickert-Bond, S. M., Johnson, G., & Zimmer, E.A. (2018). Chloroplast phylogenomics of the New World grape species (*Vitis*, Vitaceae). *Journal of Systematics and Evolution*, 56(4), 297-308.

Weiss, E., Zohary, D., & Hopf, M. (Eds.) (2000). Domestication of Plants in the Old World- *The origin and spread of domesticated plants in South-west Asia, Europe, and the Mediterranean Basin*, 4th ed. Oxford University.

Yamamoto, L. Y., de Assis, A. M., Roberto, S. R., Bovolenta, Y. R., Nixdorf, S. L., García-Romero, E., Gómez-Alonso, S., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2015). Application of abscisic acid (S-ABA) to cv. Isabel grapes (*Vitis vinifera* × *Vitis labrusca*) for color improvement: Effects on color, phenolic composition and antioxidant capacity of their grape juice. *Food Research International*, 77(3), 572–583.

Yang, E., Drosou, F., Dourtoglou, E. G., Chatzilazarou, A., & Dourtoglou, V. G. (2017). Approaches to outline the aromatic profile of Kyoho wines from South Korea. In *BIO Web of Conferences* (Vol. 9, p. 02034). EDP Sciences.

Zecca, G., Labra, M., & Grassi, F. (2020). Untangling the evolution of American wild grapes: admixed species and how to find them. *Frontiers in Plant Science*, 10:1814.



Zhong, Y., & Shahidi, F. (2015). Methods for the assessment of antioxidant activity in foods. In *Handbook of antioxidants for food preservation* (pp. 287-333). Woodhead Publishing.

Zhu, L., Zhang, Y., & Lu, J. (2012). Phenolic contents and compositions in skins of red wine grape cultivars among various genetic backgrounds and originations. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(3), 3492–3510.

Zohary, D., & Spiegel–Roy, P. (1975). Beginnings of fruit growing in the Old World. *Science*, 187(4174), 319–327.

Zohary, D., Hopf, M., & Weiss, E. (2012). The origin and spread of domesticated plants in Southwest Asia, Europe, and the Mediterranean Basin. *Domestication of Plants in the Old World*, 4th ed.; Oxford University Press

## **Capítulo 3.**

# **Composición y calidad de la uva Isabella y de los vinos obtenidos en microvinificaciones.**

### 3.1. Introducción.

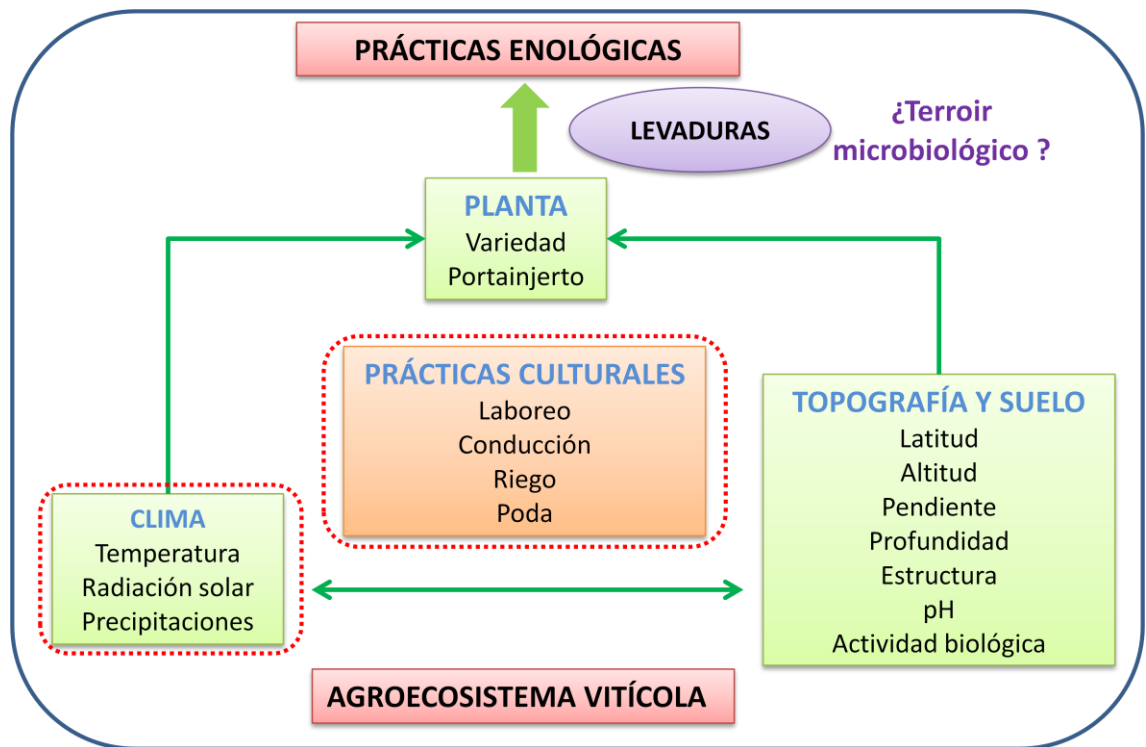
Las características de un vino dependen básicamente de cuatro factores: la especie y variedad de vid, las condiciones medioambientales, las prácticas culturales (conjunto de las prácticas y técnicas agronómicas aplicadas al cultivo de la vid) y las prácticas enológicas (Jackson, 2014). En la viticultura actual suele emplearse la palabra “terroir” (término de origen francés cuyo equivalente en español sería terruño) para definir un espacio tangible dentro del cual estos factores se combinan para obtener una uva y un vino de determinadas características (Van Leewuen & Seguin, 2006).

La OIV (Organismo Internacional de la Vid y el Vino) adoptó la siguiente definición de “terroir”: El “terroir” vitivinícola es un concepto que se refiere a un espacio sobre el cual se desarrolla un saber colectivo de las interacciones entre un medio físico y biológico identificable y las prácticas vitivinícolas aplicadas, que confieren unas características distintivas a los productos originarios de este espacio. El “terroir” incluye características específicas del suelo, de la topografía, del clima, del paisaje y de la biodiversidad.

Según este concepto, cada región productiva puede ser representada por un territorio caracterizado por un potencial vitícola que se verá reflejado finalmente en la tipicidad del vino elaborado en esa región, esto es, un vino con una composición fisicoquímica y características sensoriales que lo hacen único e irrepetible. La importancia de los factores mencionados en la calidad del vino puede ser ejemplificada con el Malbec. En Mendoza (e.j., valle de Uco), la variedad expresa propiedades muy diferentes a la uva tinta originaria de Cahors, una pequeña comarca al sur de Francia, cerca de la emblemática región de Burdeos (Soto, 2014). La historia del Malbec argentino empezó en 1850, convirtiéndose a lo largo del tiempo en el emblema de los vinos argentinos que ha ganado reconocimiento internacional. Su superioridad respecto a los Malbec de Francia y otras partes del mundo reside en la calidad enológica de la uva que le da origen, atribuible a las excepcionales condiciones edafoclimáticas que encuentra la variedad en determinadas geografías de Argentina (di Giacomo, 2015; Barnes, 2019).

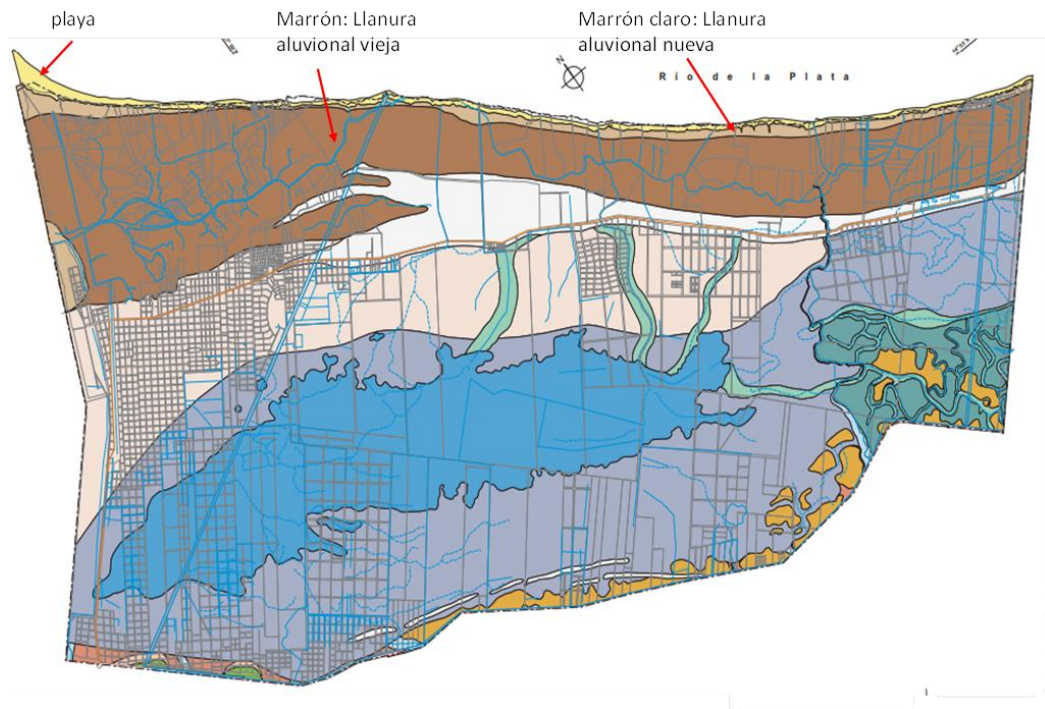
Algunos estudios recientes sugieren la existencia de un “terroir microbiológico”, es decir, la existencia de patrones biogeográficos en la microbiota de la baya que se correlacionarían con la composición final del vino y por ende con su tipicidad (Bokulich et al., 2016). Este concepto sigue siendo motivo de debate, ya que diversos estudios han demostrado que existe una gran variabilidad genética y fenotípica en las levaduras

que intervienen en la fermentación espontánea de cada vendimia, situación que hace poco probable la existencia de un patrón microbiológico único y constante en la fermentación espontánea a los largo de los años (Alexandre, 2020). En la Figura 3.1 se muestra un esquema simplificado del “terroir” vitivinícola.



**Figura 3.1.** Esquema del “terroir” vitivinícola (adaptado de Amoros, 2017).

La uva Isabella se ha adaptado muy bien a las condiciones edafo-climáticas predominantes en la franja costera de Berisso. Esta zona, situada a menos de 2 m sobre el nivel del mar, se encuentra comprendida entre la barranquilla costera (pequeño desnivel o escalón de 0,50 - 1,0 m paralelo a la costa) y la costa actual, e incluye a las Islas Santiago y Paulino (Figura 3.2). La franja costera está surcada de arroyos y canales y su suelo es de tipo aluvial formado principalmente por sedimentos del desborde del Río de La Plata. Los suelos son de textura variable: arenosa a arcillosa, más bien ácidos, con contenido en materia orgánica elevado (entre un 3 y 7,5%), con aporte freático y pluvial.



**Figura 3.2.** Geomorfología Berisso. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Instituto de Geomorfología y suelos. Mapa N°3.  
<http://berisso.gob.ar/pdfs/mapas/cartografia.pdf> (Amarilla & Conti, 2008).

Algunos viñedos se ubican en las zonas bajas de la franja costera, y reciben inundaciones generadas por sudestadas o combinación de estas con crecidas de la cuenca de los ríos Paraná y Uruguay, por lo cual suelen estar saturados de humedad la mayor parte del año (Amarilla & Conti, 2008). En general no necesitan riego, presentan el sistema de conducción tipo parral y contienen zanjillos para el drenaje del agua (Figura 3.3A). Otros viñedos se ubican en las zonas altas, con baja probabilidad de inundaciones y donde algunos productores han adoptado la conducción tipo espaldera (Figura 3.3B). En situaciones de escasez de lluvias, los viñedos de las zonas altas pueden necesitar riego.

Con respecto al clima, podemos considerar tres niveles: macro, meso y microclima en base a los datos meteorológicos globales y locales (DeLoire et al., 2005; Jones et al., 2012). Según el sistema de clasificación climática de Köppen-Geiger, el macroclima de la región de Berisso puede clasificarse como Cfa, esto es húmedo y templado (Peel et al., 2007). El clima Cfa se caracteriza por una temperatura media del mes más cálido superior a 22 °C y temperatura media del mes más frío entre 0 y 18 °C, con precipitaciones a lo largo de todo el año, es decir, sin estación seca. El clima

de la zona presenta influencias subtropicales que arriban al Río de La Plata desde el norte a través de los ríos Paraná y Uruguay, y pampeanas desde el este.



**Figura 3.3.** Viñedos en Berisso. **A.** Parral en zona baja (quinta Verón) con zanjillo de desagüe, a la derecha el viñedo inundado. **B.** Espaldera en zona alta (quinta Chango).

Dentro del macroclima podemos considerar las particularidades locales (clima local), como la influencia de la latitud, topografía, proximidad al río, etc., que definen el mesoclima. La región posee condiciones ambientales específicas de humedad y temperatura. La temperatura media anual es de 16,5°C, con una mínima y máxima promedio de 12,7 y 20,7°C, respectivamente. La duración del día varía entre 10 y 14 h, siendo diciembre el mes con días más largos (luz diurna 14,5 h promedio) y con mayor horas de sol (promedio de insolación 11,2 h). La cantidad anual de precipitaciones es ~ 1000 mm, siendo noviembre el mes más lluvioso. Los vientos predominantes son del norte, que provocan aumentos de temperatura y humedad relativa, y del sudeste que predominan entre septiembre y abril y son responsables de las crecidas del Río de La Plata. La velocidad promedio del viento es de ~18 km/h, pero suele haber ráfagas de hasta 80 km/h. La humedad relativa ambiente entre abril y diciembre varía en el rango 70-77 %, disminuyendo a 65% de enero a marzo. El período de maduración de Isabella (mediados de enero a principios de marzo) corresponde a la estación de



verano, por lo tanto es el período de menor humedad relativa promedio, mayor temperatura media y a excepción de enero, el período más lluvioso.

En la tabla 3.1 se muestran datos climáticos de Berisso en los períodos en que puede dividirse el ciclo anual de la Isabella: brotación a floración, crecimiento herbáceo de la baya (floración a envero), envero/maduración de la baya y parada o latencia.

Para la viticultura, el efecto del mesoclima puede ser cuantificado mediante determinados índices agroclimáticos o bioclimáticos, que tienen en cuenta la temperatura del aire y las lluvias (Aleixandre et al., 2013). Los índices bioclimáticos permiten la zonificación vitícola y son muy útiles para seleccionar la variedad óptima que debe cultivarse en cada zona, realizar estudios comparativos entre zonas, y estimar el efecto del cambio climático sobre la calidad de la uva y el vino. Los parámetros más usados para calcular los índices son: temperaturas mínimas y máximas, temperatura media y balance hídrico del suelo (que incluye las lluvias). Otra variable a considerar es la luminosidad o heliofanía, aunque es difícil separar el efecto de la radiación solar del aumento de temperatura que esta provoca en la baya (Reynolds, 2010). Algunos índices bioclimáticos empleados en viticultura son: Winkler (IW), heliotérmico de Huglin (IH), frescor nocturno o de noches frías (IFN), Fregoni (IF) y de sequía (IS). IW e IH se emplean para caracterizar el clima a lo largo de todo el ciclo vegetativo de la vid. El IW es la sumatoria de las temperaturas medias diarias (Tmd) que superan los 10°C, que es la temperatura del cero fisiológico, y se expresa en grados-días (GDD). Dicho de otro modo, el valor de GDD estima la cantidad de calor que recibe la planta cuando ocurren temperaturas por encima de 10°C (Amerine & Winkler, 1944). El IH es similar al IW, pero contempla además la temperatura máxima diaria (Tmax) y la longitud del día, que depende de la latitud (Huglin, 1986). El IFN y el IF están basados en temperaturas durante el mes previo a la cosecha: IF contempla la amplitud térmica (diferencia de temperatura máxima del día y la mínima de la noche) y las temperaturas menores a 10°C (Fregoni, 1973) mientras que el IFN calcula la media de las temperaturas mínimas diarias (Tonietto & Carbonneau, 2004). En relación al suelo, el IS estima la disponibilidad de agua para el cultivo considerando el intercambio de agua entre suelo, planta y aire (Tonietto & Carbonneau, 2004; Riou., et al, 1994); este índice incluye las precipitaciones. Otro índice importante, en este caso por ser un frutal de hoja caduca, son las horas de frío (HF). Cuando cae la hoja, la vid entra en reposo vegetativo y durante este período debe estar expuesta a bajas temperaturas para una adecuada brotación y floración.

**Tabla 3.1.** Datos climáticos de Berisso.

Fuente: <https://weatherspark.com/y/29090/Average-Weather-in-Berisso-Argentina-Year-Round>

<i>Parámetro climático</i>	<i>Latencia (período de reposo) (Abril/Agosto)</i>	<i>Brotación a floración (Septiembre/Octubre)</i>	<i>Crecimiento herbáceo (floración a grano cernido) (Noviembre/Diciembre)</i>	<i>Envero/Maduración (Enero/Marzo)*</i>
<b>Tmáx (°C)</b>	15-22	16-21	23-28	25-29
<b>Tmín (°C)</b>	9-15	8-12	15-20	15-20
<b>Humedad (%)</b>	72-77	76-77	71-76	62-68
<b>Lluvia (mm)</b>	342	170	200	316
<b>Días de lluvia</b>	9,5-9	9-11	9,7-9,2	8,5-10
<b>Luz diurna (h)</b>	9,8-11	12-13	14-14,5	14-12

Tmáx media 20,7 °C; Tmin media 12,7 °C; lluvia anual 1000 mm  
 \*Comienzo del envero 15-20 enero, cosecha 2da semana de marzo.



Las HF dependen de cada variedad; para su cálculo se consideran las horas debajo de 7,5°C, desde la caída del 50% de las hojas hasta unos días antes del desborre de las yemas. La *V. vinifera* requiere valores de HF entre 500 y 1400 horas, según la variedad (Sozzi et al., 2007). La *V. labrusca* tiene un menor requerimiento de HF. La Isabella y otros híbridos como Concord y Niagara necesitan 50 HF (temperaturas  $\leq 7.5^{\circ}\text{C}$ ) o 140 horas de frío si se toman las temperaturas hasta 10°C (Peruzzo y col., 2014). En Berisso, las horas frío son del orden de 300 (Pierini & Ganganelli, 2017), mientras que en Colonia Caroya donde se cultiva la Isabella, las HF son del orden de 600 (Lobato & Nanini, 2015). En la Tabla 3.2 se presentan las fórmulas para calcular los índices bioclimáticos y los rangos de valores que definen las diferentes clases de clima y características hídricas del ambiente. La combinación de algunos de estos índices (IH, IFN, IS) ha dado lugar a la Clasificación Climática Multicriterio (CCM) (Tonietto & Carboneau, 2004), utilizada como base para una macrocaracterización de las regiones vitícolas en Argentina (Catania, 2007; Cavagnaro et al., 2014;), Uruguay (Ferrer et al., 2007) y Brasil (Tonietto, 2006).

Dentro del viñedo hay que considerar el microclima, que si bien se encuentra íntimamente influenciado por el mesoclima, es distinto y puede ser modificado mediante las prácticas culturales (Yuste, 2013; Jackson, 2014). Es aquí donde adquiere importancia el factor humano, o sea la intervención del hombre orientada a la toma de decisiones previas a la plantación (como elección de la variedad-clon y portainjerto, forma geométrica de conducción del viñedo, densidad de plantación) y al manejo del viñedo durante el ciclo de la planta (como la poda seca, fertilización, laboreo del suelo, aplicaciones sanitarias, operaciones sobre la vegetación, entre otras).

Las particularidades locales a las que se expone el cultivo de Isabella son muy diferentes a las de los territorios tradicionales productores de vid europea (Sisterna y col., 2010). El clima afecta el desarrollo del cultivo y por ende la composición de la baya al momento de la vendimia. Hasta el presente no hay información sobre las variaciones en las características de la uva en varios ciclos de cultivo y su posible efecto en las propiedades del vino.

El objetivo del presente capítulo fue caracterizar la uva Isabella (análisis fisicoquímico) y los vinos (análisis fisicoquímico y sensorial) obtenidos por fermentación espontánea a escala de laboratorio durante cuatro campañas consecutivas. Complementariamente, se obtuvieron datos climáticos e información sobre las prácticas culturales realizada en el viñedo cada año.

**Tabla 3.2.** Índices agroclimáticos aplicados al cultivo de vid.

Índice	Fórmula o concepto	Clases	Rango de valores	Referencias
<b>Integral térmica de Winkler (GDD: grados-días)</b>	GDD = $\Sigma (T_m - 10)$ Tm: temp media <i>Septiembre a marzo</i>	I	< 1371	Amerine & Winkler (1944)
		II	1371 a 1649	
		III	1650 a 1926	
		IV	1925 a 2205	
		V	> 2205	
<b>Heliotérmico de Huglin (IH)</b>	IH = $\Sigma [(T_{max} - 10) + (T_m - 10)] / 2$ * l l coeficiente de longitud del día (se toma el valor 1 para Berisso ya que la latitud es < 40°) <i>Octubre a marzo</i>	Muy cálido	IH+3 > 3000	Huglin (1986) Tonietto & Carbonneau (2004)
		Cálido	2400 < IH+2 ≤ 3000	
		Templado-cálido	2100 < IH+1 ≤ 2400	
		Templado	1800 < IH-1 ≤ 2100	
		Fresco	1500 < IH-2 ≤ 1800	
<b>Índice de Fregoni (AmpT)</b>	IFAmpT = $\Sigma (T_{máx} - T_{mín}) * dd$ (T <sub>mín</sub> < 10°C) dd número de días con temp mínima < 10°C Se calcula treinta días anteriores a la realización de la cosecha, en °C			Fregoni (1973)
<b>Índice frescor nocturno (IFN)</b> (se relaciona con el aroma y el color)	Media de las temperaturas mínimas diarias durante los treinta días anteriores a la realización de la cosecha, en °C	Muy frías (IF+2)	IF ≤ 12 °C	
		Frías (IF+1)	12 °C < IF ≤ 14 °C	
		Templado (IF-1)	14 °C < IF ≤ 18 °C	
		Cálido (IF-2)	IF > 18 °C	
<b>Índice de sequía (IS) en mm</b> (relaciona la maduración con el agua disponible del suelo)	IS = W = Wo + P - TV - ES W = estimación de la reserva hídrica del suelo al momento de la cosecha Wo = reserva hídrica inicial útil del suelo explorable por las raíces P = precipitaciones TV = transpiración potencial del viñedo ES = evaporación directa del suelo	Muy seco (DI+2)	IS ≤ -100	Tonietto & Carbonneau (2004) Riou et al., 1994
		Moderadamente seco (DI+1)	100 < IS ≤ 50	
		Subhúmedo (DI-1)	50 < IS ≤ 150	
		Húmedo (DI-2)	IS > 150	

## 3.2. Materiales y métodos.

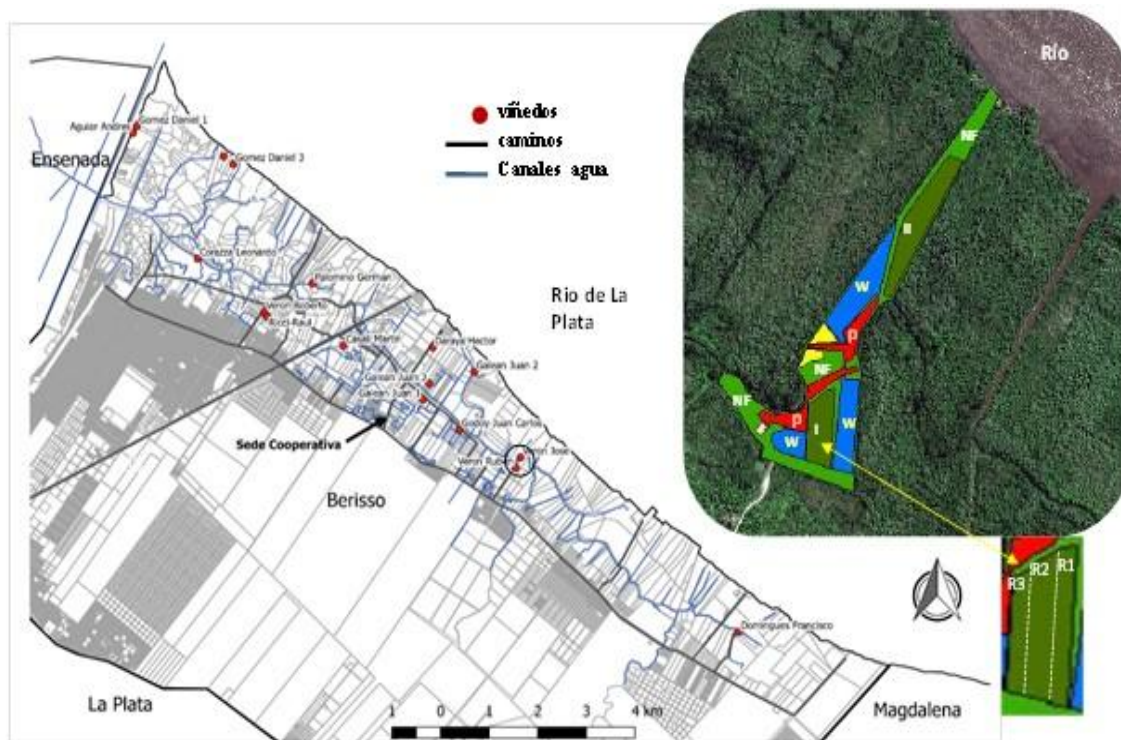
### 3.2.1. Descripción del lugar.

El estudio se desarrolló durante cuatro campañas consecutivas (2014/2015, 2015/2016, 2016/2017, 2017/2018), referidas en este trabajo como vendimias v15, v16, v17, v18, respectivamente. La quinta con los viñedos pertenece al productor Rubén Verón (Los Talas, latitud 34° 53' Sur, longitud 57° 54' Oeste), Provincia de Buenos Aires, Argentina. En la quinta se encuentran dos viñedos con conducción tipo parral (I y II) de 0,74 y 1,2 ha, respectivamente (Figura 3.4); además, se combina la producción de vid con la producción de ciruelas y mimbres (Figura 3.5).

Por razones prácticas, el experimento se llevó a cabo con el viñedo I (por ser más pequeño y de fácil acceso. El mismo se instaló en 1998, con aproximadamente 1400-1500 cepas compradas al productor Raúl Ricci. La producción regular de uva comenzó en el año 2003. Los rendimientos son variables, pero en promedio se puede considerar ~5000 kg/ha.



**Figura 3.4.** Vista aérea de los 2 viñedos (I y II) de la quinta de Rubén Verón. Se observa el canal que los divide. El río se encuentra a 200 m a la derecha del viñedo II. Google (s.f.).



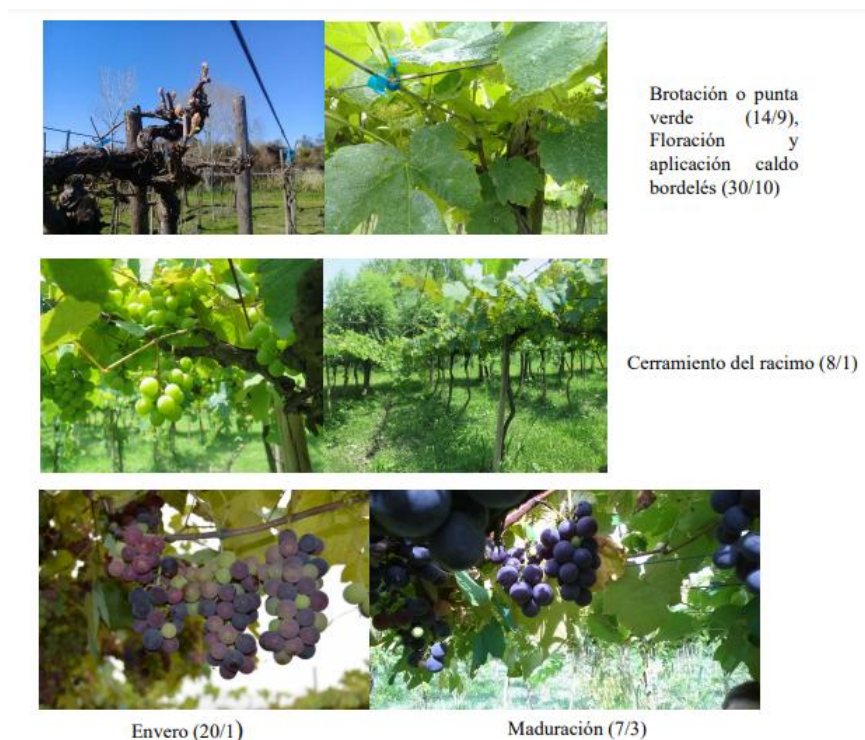
**Figura 3.5.** Izquierda: Distribución de viñedos en la costa ribereña (gentileza Emiliano Zanelli). Los círculos rojos son los viñedos, el círculo azul indica los dos viñedos de la quinta de Rubén Verón. Derecha: Detalles de la quinta (imagen satelital): p cielos, w mimbre, NF monte natural, v vivienda, R1, R2 y R3: subparcelas en la cuales se dividió el viñedo I para el muestreo (se denominaron réplicas).

La parcela en estudio contiene 18 hileras o filas de vides con el siguiente marco de plantación: separación entre filas (anchura de la calle) 2,5-3,0 m y distancia entre cepas dentro de la misma línea 1,5 m. Con este marco, la densidad de plantación es del orden 2000 cepas/ha. Al ser un viñedo de zona baja tiene un sistema de drenaje compuesto por canales pequeños llamados zanjillos (Figura 3.3A), que permiten el drenaje del agua luego de las crecidas del río y la conducen a canales más grandes o colectores que desembocan en el río. Los zanjillos se ubican cada seis metros, entre dos hileras de plantas.

### 3.2.2. Fenología, prácticas de manejo del viñedo y cosecha.

A lo largo del año, la vid pasa por diferentes etapas que se repiten año a año: lograr el receso invernal, brotación, desarrollo de hojas (foliación), floración, fructificación, envero y maduración. Durante estos períodos se realizan diferentes

operaciones destinadas a lograr el equilibrio vegetativo de la cepa, es decir, un balance cuidadoso entre la producción de hojas, madera y fruto a fin de optimizar la producción y la calidad enológica de la baya. Las prácticas culturales realizadas cada temporada fueron suministradas por el productor, de hecho, es el único viñatero que lleva un registro de los trabajos que se realizan anualmente en sus viñedos. Las operaciones realizadas en el viñedo consistieron en la poda de invierno, operaciones en verde, mantenimiento del suelo, como así también la aplicación de fertilizantes y fitosanitarios. La poda invernal se inició a mediados de julio y se extendió hasta mediados o fines de agosto. Como la poda invernal retrasa la brotación, se poda lo más tardíamente posible para minimizar los efectos nocivos de las heladas tardías sobre los brotes. Entre las operaciones en verde se destacaron el desbrote y el despunte. El desbrote se llevó a cabo en primavera, previo a la floración, y consistió en la eliminación de los brotes herbáceos que surgen de yemas diferentes a las yemas que se seleccionaron en la poda (carga), por ejemplo, yemas en el tronco principal o las feminelas. Por su parte, el despunte se realizó durante el envero, y consistió en recortar los pámpanos de la cepa, es decir, suprimir los extremos de pámpanos y tallos. El desbrote y el despunte mejoran el microclima de la cepa, homogenizan la vegetación, controlan el vigor de la planta y facilitan los tratamientos fitosanitarios (Jackson, 2014). En la Figura 3.6 se muestran distintos estados fenológicos de la Isabella en el viñedo en estudio y la fecha en que se tomaron las fotos.



**Figura 3.6.** Distintos estados fenológicos de la Isabella de Berisso. Viñedo I. Rubén Verón. Vendimia 2016.

Dentro del mantenimiento del suelo se realizó la limpieza de los zanjillos al inicio de cada ciclo vegetativo, depositando el material removido como fertilizante al pie de las cepas. El desmalezado se efectuó regularmente dejando los residuos en el suelo para ser transformados por el proceso de mineralización, lo que contribuye a la nutrición de la planta (Abonna y col, 2007). A estos residuos se sumaron los provenientes de las operaciones en verde y la poda, los cuales en general se quemaron. Otro factor importante del manejo del viñedo fue la aplicación de fitosanitarios para evitar el desarrollo de enfermedades o el ataque de plagas. Las aplicaciones más importantes fueron con caldo bordelés (Bouillie Bordelais), que es una mezcla de cal hidratada y sulfato de cobre, y en v15 se aplicó Mancozeb, un fungicida de contacto.

### **3.2.3. Caracterización bioclimática.**

Los datos climáticos fueron suministrados por el Observatorio de La Plata, ubicado en Lon: 57° 55' 56" W, Lat: 34° 54' 24" S, Alt: 15 m; distante unos 11 km del viñedo. Los datos comprendieron observaciones diarias de temperaturas máximas ( $T_{máx}$ ), mínimas ( $T_{mín}$ ), medias ( $T_{med}$ ) y precipitaciones, desde la brotación hasta la cosecha (septiembre a marzo). Con las temperaturas se calcularon los siguientes parámetros bioclimáticos: grados-días (GDD) o Winkler, heliotérmico de Huglin e IFN (tabla 2.2). GDD se calculó desde el 1 de septiembre e IH desde el 1 de octubre, ambos hasta el 31 marzo o bien hasta la cosecha. Para el IFN se tomaron las  $T_{min}$  de los 30 días anteriores a la cosecha. El IF no se puede calcular según la fórmula ya que no se registraron noches con  $T_{min} < 10\text{ °C}$  y por lo tanto el índice daría cero, en este caso la fórmula se utilizó para calcular la amplitud térmica. No hubo registros sobre la radiación solar, pero en forma indirecta se evaluó a partir de datos de nubosidad suministrados por el sitio web <https://es.weatherspark.com/>.

### **3.2.4. Vendimia.**

Desde el punto de vista enológico, la vendimia debe hacerse cuando las bayas han alcanzado la madurez adecuada; esto implica un compromiso entre el nivel de azúcar, la acidez y el contenido de antocianos y taninos del hollejo y las semillas (Gill Giese, 2008; Blouin, 2012). Estos factores no siempre coinciden en su nivel óptimo (Meléndez et al., 2013). Desde el punto de vista práctico, las bayas no deben ser ni muy verdes ni muy sobremaduras, y deben haber alcanzado su máximo peso y relación azúcar/acidez (Catania & Avagnina, 2007). Los parámetros de madurez de Isabella que manejan los productores son sencillos y se basan en la experiencia

personal respecto a esta variedad de uva. La Isabella se cosecha para venta en fresco a partir de fines de febrero, y las uvas para vinificar se dejan madurar lo máximo posible en el viñedo, siempre y cuando no haya que anticipar la cosecha por factores climáticos. Los productores van observando los cambios en el color y sabor de la baya durante la maduración para determinar el momento de la cosecha. Con respecto al contenido azucarino, se miden los °Brix (°Bx) o se prepara mosto para medir los °Baumé, que es una medida de densidad que permite estimar rápidamente el grado de alcohol probable en % v/v. La relación de ambas escalas no es lineal y en ambos casos el cálculo del alcohol probable depende del factor de conversión de azúcar en alcohol (Bouin, 2012). En base a estas consideraciones, en v16, v17 y v18 la uva se cosechó entre el 9 y 11 de marzo. En v15 se efectuó en la tercera semana de febrero, para evitar que la lluvia anunciada produjera una pérdida importante de rendimiento y calidad.

### **3.2.5. Muestreo de racimos y bayas.**

El muestreo implicó cosechar racimos representativos de todo el viñedo. El viñedo es uniforme y de tamaño reducido (< 2 Ha), por lo cual puede ser considerado como un bloque o parcela de muestreo (Ford-Kapoor, 2010). No obstante, para el tratamiento estadístico de los datos se dividió al viñedo en 3 bloques independientes o subparcelas llamadas R1, R2 y R3 (Fig. 2.3). De este modo, se obtuvieron verdaderas réplicas que en su conjunto representaron la totalidad del viñedo. Para la recolección de los racimos se evitaron las plantas del perímetro y los mismos se tomaron a partir de la segunda o tercer cepa de la hilera, y posteriormente al azar de plantas separadas regularmente hasta completar el bloque. La cantidad total de racimos recolectados de cada bloque obedeció a un criterio económico, juntando la cantidad mínima necesaria para realizar las microvinificaciones y los análisis fisicoquímicos de las bayas. Se recolectaron entre dos y cuatro racimos de ambos brazos de cada cepa hasta obtener un peso total de ~ 8.2-8,5 kg. El peso de los racimos fue muy variable con valores en el rango de 75 a 170 g. El tiempo total de cosecha fue de 3-4 h y se realizó por la mañana. Para las microvinificaciones se emplearon entre 7,2 y 7,5 kg de uva despallada que se procesaron el mismo día de la cosecha.

Para realizar los análisis fisicoquímicos se tomaron bayas de racimos seleccionados al azar del total cosechado de cada réplica. De cada racimo se sacaron cinco bayas: dos de la parte superior, dos de la zona central y una de la punta, hasta juntar un total de 100 bayas. Luego se mezclaron en una bandeja para uniformar la



muestra y se dividieron en dos submuestras de 50 uvas cada una, las cuales una vez pesadas, se congelaron a -20 °C en bolsas de plástico selladas. El total de bayas recolectadas para el análisis fisicoquímico fue la recomendada para una parcela de muestreo (Blouin, 2012; Ford-Kapoor, 2010).

### **3.2.6. Análisis fisicoquímico de las bayas.**

Para caracterizar la composición de la uva, se determinaron las variables más relevantes que describen su madurez (Blouin, 2012): peso de la baya y peso porcentual húmedo de las diferentes partes de la baya (piel u hollejo, pulpa y semillas), sólidos solubles totales (SST), acidez titulable (AT), pH, nitrógeno asimilable por la levadura (YAN) y contenido de antocianos de la piel. El peso fresco de las bayas en forma individual se midió con una muestra de 30/50 bayas en una balanza analítica previo al congelamiento. Para el resto de los análisis fisicoquímicos se descongeló una submuestra de 50 bayas a temperatura ambiente y se trituró manualmente dentro de una bolsa. El mosto obtenido se volcó a un recipiente de vidrio y se mantuvo a 40 °C durante 30 minutos para garantizar la disolución de los ácidos orgánicos (Iland et al., 2010); luego se filtró a través de un lienzo mediante presión manual. En el filtrado se determinaron los SST con un refractómetro automático (ATAGO, Master-T) y se expresaron como °Brix. La relación entre grados Brix y la concentración de azúcares fermentables se tomó de las tablas del INV, mientras que el alcohol probable se calculó a partir de la relación 17 g/l de azúcar = 1 % de alcohol (Blouin, 2012). La determinación de pH, acidez titulable (AT, % de ácido tartárico [p/v]) y YAN (mg/l) se efectuó en una muestra de 10 ml de filtrado utilizando metodologías oficiales (OIV), y en el caso del YAN mediante la titulación de formol, como lo describe Gump et al (2002), empleando 2,5 ml de formol neutralizado. Con los datos de Brix y acidez titulable se calculó el índice de madurez de Cillis - Odifredi (Blouin, 2012), que es el cociente Brix/AT, y es ampliamente utilizado para caracterizar la madurez tecnológica de la uva al momento de la vendimia, ya que incluye parámetros fáciles de medir. La otra submuestra de 50 uvas se procesó para determinar el peso húmedo de las diferentes partes de las bayas y extraer antocianinas del hollejo. Para reducir el error analítico, se separaron cuidadosamente el hollejo y las semillas de todas las bayas, se prensaron ligeramente sobre papel absorbente y luego se pesaron en balanza analítica. Cabe destacar que la piel se separó fácilmente de la baya apenas la uva comenzó a descongelarse, lo cual es una característica de esta variedad. El peso de la



pulpa se calculó restando al peso total de la baya el peso del hollejo y las semillas. El peso seco del hollejo y las semillas se determinó a 60 °C.

Para la extracción de antocianinas y su cuantificación por espectrofotometría, se utilizó el protocolo descrito por Iland et al, 2000. Los hollejos provenientes de las 50 bayas (~ 15-17 g) se mezclaron y mantuvieron en hielo hasta su procesamiento (máximo una hora). Una muestra entre 3 y 5 g de hollejo se homogenizó durante 5 min en un Sorvall Omni Mixer Homogenizer con 40 ml de etanol al 50% ajustado a pH 2,0 con HCl 0,1 N. El recipiente se mantuvo en un baño de hielo durante la homogenización. La muestra obtenida se transfirió a un tubo Falcon de 50 ml y la extracción se realizó en un mezclador rotatorio (MX-RD-Pro, Dragon Lab, China) a ~ 10 rpm durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, se centrifugó a 3000 g x 15 min en una centrífuga Sorvall ST-16R, y en el sobrenadante se determinó antocianinas totales midiendo la absorbancia a 520 nm. El extracto se diluyó con HCl 1 M. La concentración de antocianinas totales se cuantificó como clorhidrato de malvidina-3-O-glucósido (MW 529), empleando el coeficiente de extinción molar de 28000 l/(cm.mol) (Lee et al., 2008). El procesamiento del hollejo se realizó inmediatamente después de haberlo separado de la pulpa. Los análisis fisicoquímicos se efectuaron por duplicado o triplicado. En la tabla 3.3 se muestran los valores de desviación típica de los análisis fisicoquímicos a partir de los datos de las repeticiones.

**Tabla 3.3.** Desviación típica de las determinaciones analíticas.

<i>Variable</i>	<i>DE</i>
<b>Brix*</b>	0,1
<b>Acidez titulable</b> (% tartárico)	0,008
<b>pH*</b>	0,02
<b>YAN</b> (mg/l)	2,0
<b>Pigmentos</b> (mg %)	1,73

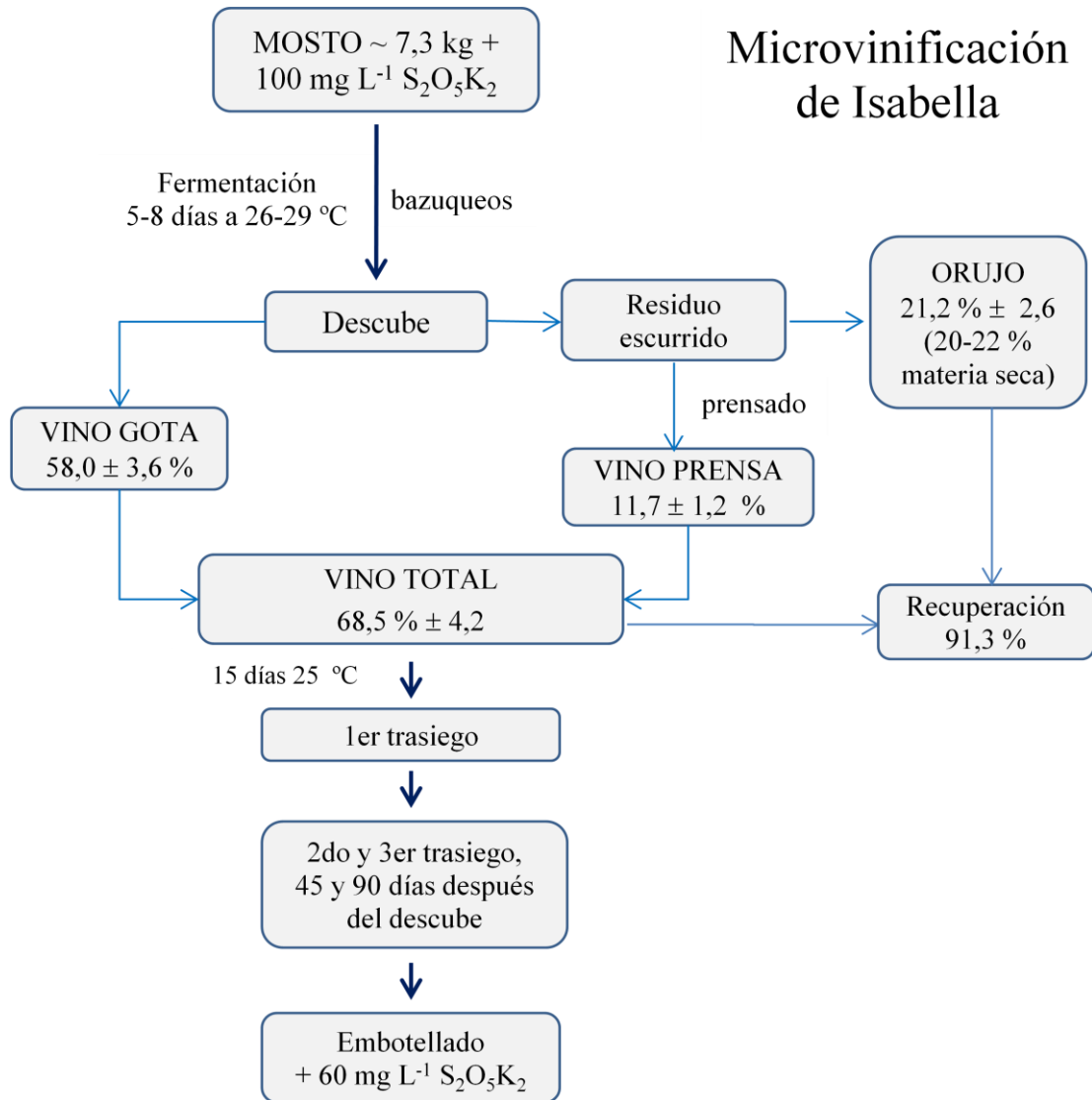
\* Resolución del instrumento empleado en la medición, DE desviación estándar

Para la identificación de antocianinas por HPLC la extracción se realizó con metanol al 50% para evitar la hidrólisis parcial de antocianinas acetiladas (Revilla et al., 1998). El análisis de composición de las diferentes antocianinas se realizó en el CIATI (Villa Regina, Río Negro, Argentina) de acuerdo con el método oficial del INV.

### 3.2.7. Microvinificaciones.

Las microvinificaciones v15, v16, v17 y v18 se llevaron a cabo siguiendo las sugerencias del protocolo descrito para el vino de la Costa (Cooperativa de la Costa, 2009) y se dejó que la fermentación espontánea se desarrollara naturalmente en la totalidad del mosto, empleando como única barrera metabisulfito de potasio (MBK,  $K_2S_2O_5$ ). Con cada réplica de uva cosechada se llevó a cabo una fermentación. Para preparar el mosto para la vinificación, se despalillaron manualmente lotes de un kg de uvas, se aplastaron en una bandeja limpia con la ayuda de un pisapapas y se mezclaron con 1 ml de solución de MBK al 10% (concentración en mosto: 100 mg/kg uva, que rinde ~ 45 mg  $SO_2/l$ ). El mosto se colocó en un recipiente de plástico (balde de helado) de 10 litros sanitado con alcohol de 70°. La operación se repitió hasta procesar 7,3 kg de bayas, que representaron la mayor parte de las uvas cosechadas en cada bloque. El recipiente se cerró con su tapa correspondiente, a la cual se le colocó en su parte central una salida de gas con una manguera de silicona cuyo extremo se sumergió en un erlenmeyer con agua para que funcione como un airlock. Después de 36 hs de fermentación, se realizaron bazuqueos programados con un pistón de PVC perforado. El bazuqueo consistió en sumergir lentamente el pistón hasta el fondo del recipiente sin aplastar la uva y levantarlo cuidadosamente hasta el tope para que escurra el vino; esta acción se repitió 5 veces. Los bazuqueos se hicieron diariamente hasta un día antes de la finalización de la etapa de maceración/fermentación. Cuando los °Bx se mantuvieron constantes durante dos días consecutivos se procedió al descube. El vino de gota se recogió por escurrimiento y los sólidos retenidos en la tela se prensaron (aproximadamente 10 bar x 2 min) en una prensa hidráulica de laboratorio para extraer el vino ocluido en los sólidos, al cual se denomina vino de prensa. El vino de prensa se mezcló con el vino de gota, tal como se efectúa en la bodega, y la mezcla se colocó en una damajuana de 5 l con un airlock. La maduración del vino se llevó a cabo a temperatura ambiente permitiendo que sedimente naturalmente. Después de 15 días, el vino se trasegó por primera vez para eliminar las lías más pesadas, operación que se repitió a los 45 días, 75 días y antes del embotellado (aproximadamente 4 meses). Luego de cada trasiego, el vino se guardó en recipientes herméticos llenos para evitar oxidaciones, aunque durante los trasiegos que se realizaron por sifonamiento, el vino fue aireado. Finalmente, el vino fue sulfitado con 60 mg/l de metabisulfito de potasio, embotellado, encorchado y sellado con capuchón termocontraíble; las botellas se almacenaron a temperatura ambiente en la oscuridad. Todas las operaciones descriptas previas al encorchado se

llevaron a cabo dentro de una cabina de flujo laminar para garantizar condiciones asépticas durante el procesamiento de las uvas y el vino. En la Figura 3.7 se presenta un esquema de las microvinificaciones con los balances de materia promedio de las 4 campañas, y en la Figura 3.8 se muestran los elementos empleados para vinificar.



**Figura 3.7.** Esquema microvinificaciones y balance de materia.



**Figura 3.8.** Vinificación de Isabella en plena fermentación tumultuosa, bazuqueo, orujo luego de prensar, damajuanas de la etapa de clarificación y vino envasado.

### 3.2.8. Análisis fisicoquímico y sensorial del vino.

El análisis fisicoquímico de los vinos se realizó en el laboratorio del Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV, Buenos Aires, Argentina). El análisis sensorial (cata) se realizó en la fiesta del vino de la Costa de Berisso (primera semana de julio). En dicha fiesta y desde el año 2015 se lleva a cabo el concurso de vinos, en este caso los vinos se concursaron en la categoría vino tinto seco de la Costa. Se utilizó una cata a ciegas, es decir, el jurado conoce previamente el vino a evaluar pero desconocen el origen de las muestras. El panel de jueces se puede clasificar como panel de jueces consumidores que no necesitan entrenamiento previo (Catania & Avagnina, 2007), pero que si deben ser habituales consumidores del vino de la Costa. Este criterio de selección es importante, dado que el flavor característico de los vinos de Isabella puede ser considerado un defecto si se los compara con los vinos de *V. vinifera*, cuando en realidad es una característica que proviene de la variedad de uva. El jurado realizó una evaluación de los vinos en base a la observación visual, el aroma y sabor, otorgando a cada muestra un puntaje global consensuado entre todos los jueces que fue empleado para establecer un ranking de “calidad”, a partir del cual se definió la premiación. Se tomó un valor mínimo de 60 para ser considerado aceptable. Recién a

partir del año 2019 el jurado cuantificó cada atributo en base a las recomendaciones de la OIV (ver capítulo 5).

### **3.2.9. Análisis estadístico.**

Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA y componentes principales (PCA), utilizando el software estadístico MINITAB (Minitab, LCC, State College, PA).

## **3.3. Resultados.**

### **3.3.1. Prácticas de manejo del viñedo.**

En la tabla 3.4 se resume la información brindada por el productor relativa al manejo del viñedo durante las 4 campañas. En v15 se empleó la poda mixta y en los ciclos posteriores se adoptó la poda corta, que ahorra mano de obra y es la más conveniente para las variedades que presentan fuerte acrotonía (dominancia apical) (Aliquó y col., 2010) como es el caso de la Isabella. En v15 y v16 se aplicó fertilización foliar cerca de la floración y durante la maduración, en v16 se incluyó fertilización con urea en noviembre. El principal fungicida empleado fue el caldo bordelés con 2 aplicaciones. La última aplicación de caldo bordelés se realiza a principios de enero y al momento de la vendimia es común observar las hojas y bayas manchadas con este fungicida. En v15 por las condiciones climáticas se aplicó Mancozeb para el control de enfermedades fúngicas. El manejo del viñedo en v17 y v18 fue el mismo. Dado que el estudio se realizó en un viñedo comercial, la cosecha la decidió el productor cuando consideró que la uva ya había alcanzado su maduración característica (Brix o Baumé y análisis visual/gustativo) para su venta en fresco o para vinificar. Para la venta en fresco se cosechó más temprano, generalmente con un grado Brix menor a la uva empleada para vino. La vendimia en v16, v17 y v18 se realizó entre el 8 y 11 de marzo, pero en v15 el productor decidió cosechar en la tercera semana de febrero debido a un pronóstico de lluvias intensas. Si se toma en cuenta el período que va desde la brotación (inicio segunda semana de septiembre) hasta la cosecha (segunda semana de marzo), el ciclo normal de la Isabella en Berisso se extiende por aproximadamente 185 días.

**Tabla 3.4.** Prácticas culturales durante el ciclo de la Isabella.

Estación	Ciclo del cultivo	Campañas			
		v15 (sept 2014/feb 2015)	v16 (sept 2015/mar 2016)	v17 (sept 2016/mar2017)	v18 (sept 2017/mar2018)
Invierno	Receso invernal	Poda mixta <sup>a</sup> julio-agosto	Poda corta <sup>b</sup> julio-agosto	Poda corta <sup>b</sup> julio-agosto	Poda corta <sup>b</sup> julio-agosto
Primavera	<b>Brotación</b> (principios de septiembre), <b>floración y cuajado</b>	Desbrote, fertilización foliar <sup>c</sup> , Mancozeb, caldo bordelés	Desbrote, fertilización foliar y urea <sup>d</sup> , caldo bordelés	Desbrote, caldo bordelés	Desbrote, caldo bordelés
Verano	<b>Envero</b> (mediados de enero)	Fertilización foliar, caldo bordelés, despunte	Fertilización foliar, caldo bordelés, despunte	Caldo bordelés, depunte	Caldo bordelés, despunte
	<b>Cosecha</b>	feb-20	mar-08	mar-11	mar-09
Otoño	Poscosecha	Curación			

<sup>a</sup> **poda mixta:** tipo Guyot dejando un pitón de dos a tres yemas y un cargador largo de 6-8 yemas.

<sup>b</sup> **poda corta:** pitón con dos a tres yemas.

<sup>c</sup> Fertilización foliar: Yogen N°3: N, P, K, microelementos, hormonas.

<sup>d</sup> Urea: dos aplicaciones en noviembre 70 g/planta.

**Fungicidas:** Mancozeb 30 %; caldo bordelés 15%.

**Desbrote:** antes de la floración; **Despunte:** durante el envero

**Actividades generales:** desmalezado, limpieza de canales y zanjillos, quemado de ramas de poda, triturado de material.

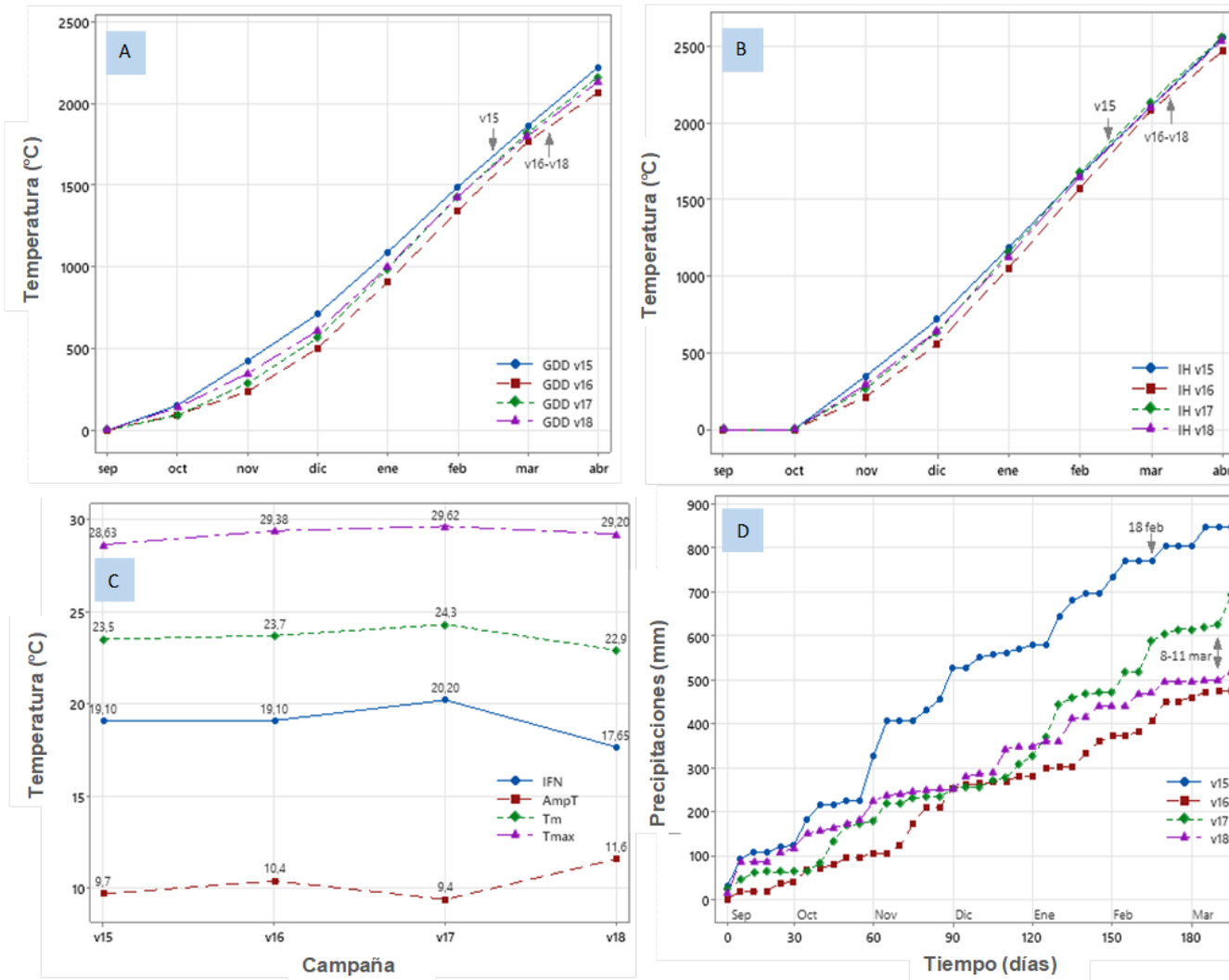
### 3.3.2. Parámetros bioclimáticos.

Los datos de diferentes índices bioclimáticos evaluados en las 4 campañas se muestran en la Figura 3.9.

Con respecto a los índices relacionados con la temperatura ambiental, si bien se observa una mayor acumulación de grados días durante la fase vegetativa de v15 y una menor acumulación en v16 (Fig.3.9A), durante la maduración las diferencias entre campañas tienden a disminuir y finalmente los GDD para v15, v16, v17 y v18, considerando el período indicado para el hemisferio sur (septiembre a marzo), fueron de 2221, 2066, 2162 y 2133 °C respectivamente. Si se consideran los datos desde septiembre hasta la cosecha los GDD se reducen a 1757, 1857, 1945 y 1954°C respectivamente.

Se ha considerado que el efecto térmico sobre el cultivo puede ser mejor interpretado por el índice de Hughlin (IH), ya que este índice tiene en cuenta las temperaturas máximas diarias y permite diferenciar zonas que tienen temperaturas medias similares, pero con un gradiente diferente; además toma en cuenta un factor de corrección relacionado con la duración del día, es decir, considera la insolación, que depende de la latitud. En este trabajo se tomó el valor de 1,0 por estar la zona de estudio debajo de los 40° de latitud sur (Hughlin, 1986).. En la fase vegetativa el IH siguió una evolución similar a GDD, pero en la etapa de maduración, principalmente a partir de febrero los valores se igualaron, siendo el valor medio del IH de  $2530 \pm 43$  °C (Fig 3.9 B). Si se considera el IH desde octubre hasta la cosecha, los valores calculados fueron 1984, 2103, 2306 y 2259 °C para v15, v16, v17 y v18, respectivamente.

De acuerdo a Pierini y Ganganelli (2017), los requerimientos térmicos de Isabella en viñedos de Berisso de tipo espaldera requieren aproximadamente 1700-1800 GDD para completar el ciclo productivo; por consiguiente, si bien pudo haber ocurrido un desfasaje entre ciertos estados fenológicos en cada campaña por la diferencia del calor acumulado, el calor total recibido por Isabella fue el requerido para alcanzar plena madurez. Desde el punto de vista climatológico, la localidad de Los Talas, Berisso, quedaría clasificada como Región III (GDD 1668 a 1944), es decir, una región templada-cálida. La misma conclusión se obtiene para IH, es decir, la cantidad de calor recibida por el viñedo según este índice es representativo de una región cálida-templada o HI+1.



**Figura 3.9.** Parámetros bioclimáticos durante el cultivo de Isabella (v15 a v18). A) GDD: grados días; B) IH: índice de Hughlin; C) valores promedio de los 30 días anteriores a la cosecha, IFN: índice de frescor nocturno, AmpT: amplitud térmica, Tmáx: temperatura máxima; D) Lluvias acumuladas entre septiembre y la cosecha (valores acumulados cada 5 días). Las flechas sobre las gráficas indican aproximadamente la fecha de la cosecha: 18 febrero para v15 y 8, 11 y 9 de marzo para las campañas v16, v17 y v18 respectivamente.



.GDD e IH consideran el ciclo completo vegetativo/reproductivo de la vid. Otros parámetros complementan esta información teniendo en cuenta el efecto térmico sobre la planta durante el período crítico de maduración, en este caso, el mes previo a la cosecha. El fundamento de estos índices está dado por la estrecha relación existente entre las temperaturas y la síntesis de compuestos químicos en la baya durante el período final de la maduración. Días cálidos y noches frías durante el mes previo a la vendimia favorecen la calidad de la uva. Por un lado, altas temperaturas diurnas (no excesiva, 30 °C) favorecen la fotosíntesis y por ende un aumento del nivel de azúcares, antocianos y compuestos de aroma, mientras que las bajas temperaturas nocturnas (preferiblemente inferior a 10 °C) reducen la respiración de los azúcares acumulados, preservando los aromas y el color (Bavaresco et al., 2008; Jackson 2014; Gaiotti et al., 2018). Los índices del mes previo a la cosecha se indican en la Figura 3.9 C. No hubo diferencias significativas en la  $T_{m\acute{a}x}$  ( $29 \pm 1,05$  °C), por lo tanto la amplitud térmica quedó definida por el IFN o la temperatura mínima promedio. El IFN fue significativamente menor ( $p < 0,05$ ) en v18 (17,6°C) con respecto al valor en v17 (20,1°C), pero sin diferencias significativas con v15 y v16. Dado que el IFN varió entre 17,65 (v18) y 20,2 (v17) Berisso quedó definida como una zona con predominio de noches cálidas (IF-2) (Tognnieto & Carbonneau, 2004). Una conclusión similar resulta de los datos de AmpT que fue significativamente mayor en v18/v16, pero a su vez no hubo diferencias significativas entre v16, v15 y v17.

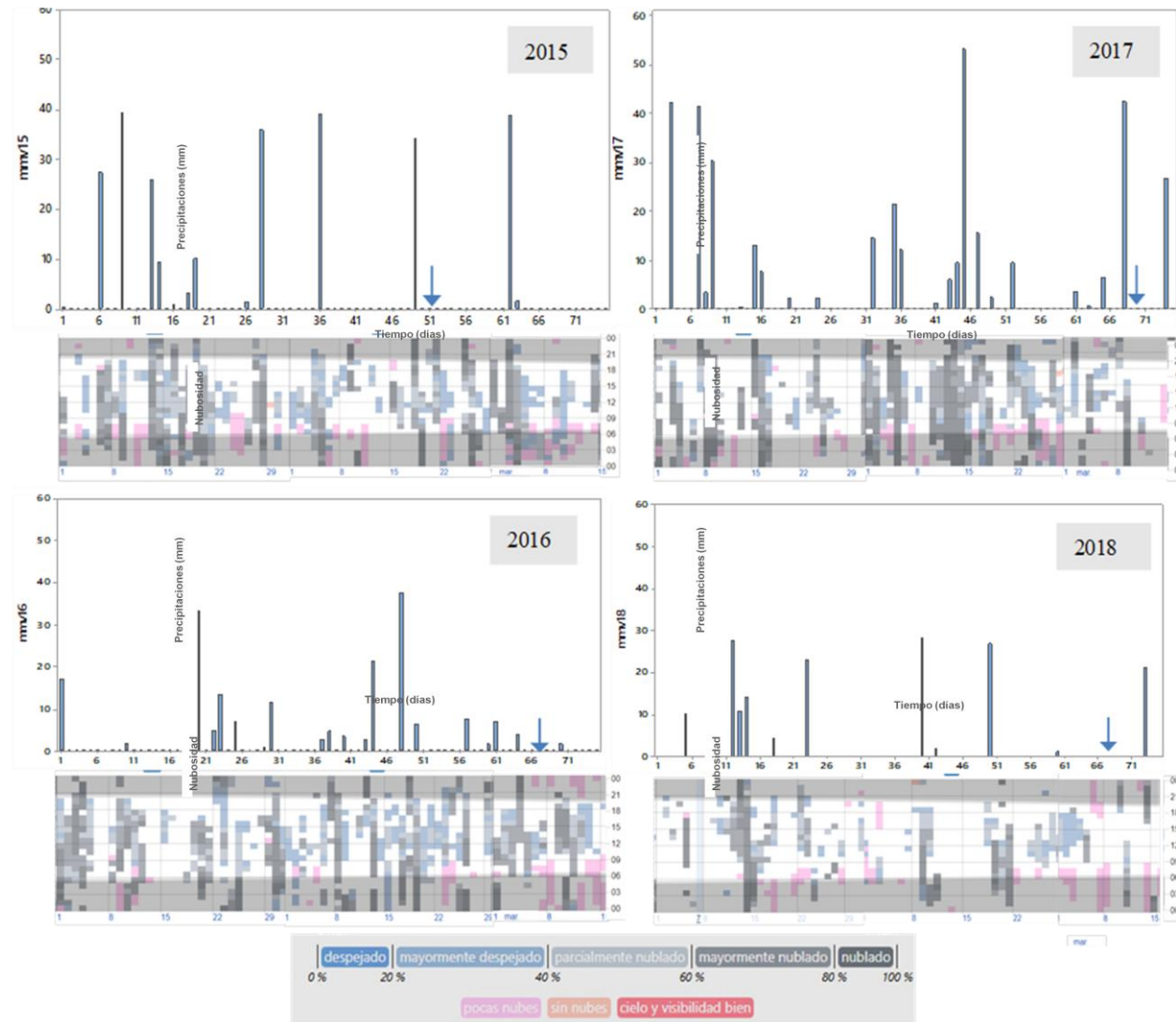
Las precipitaciones juegan un rol importante como factor climático porque contribuyen a la disponibilidad de agua del viñedo. La cantidad de lluvia acumulada cada 5 días desde el inicio del ciclo vegetativo hasta la cosecha se muestra en la Fig.3.9 D. Las campañas v15 y v17 fueron las más lluviosas, con la diferencia que en v15 la cantidad de lluvia caída se incrementó fuertemente a partir de octubre, mientras que en v17 el mayor incremento se dio a partir de la mitad de enero. Si tomamos en cuenta todo el ciclo de la vid, el total de lluvia caída fue de 770, 473, 664 y 496 mm para v15, v16, v17 y v18, respectivamente. Para observar con más detalle la pluviosidad durante la etapa crítica de maduración, se muestra en la Figura 3.10 la lluvia diaria caída desde enero hasta la cosecha. Lo que se destaca es que hubo días de intensa lluvia (30-40 mm/día) con intervalos de baja o nula pluviosidad, según la campaña que se considere. En v15 la lluvia fue intensa durante la primera quincena de enero y luego con intermitencias hasta incluso unos días previos a la cosecha. En v16 hubo más días con lluvia pero de baja intensidad durante las 3 semanas previas a la cosecha, mientras que v18 fue la temporada con mayor cantidad de días secos. En

v17 se registraron lluvias intensas en todo el período de maduración, alcanzando un total de 300 mm. El total de lluvia caída en la etapa de maduración para v15, v16 y v18 fue de 193, 190 y 148 mm respectivamente. Además de las lluvias, es importante considerar las crecidas del río debido a las sudestadas, que elevan su nivel provocando la inundación del viñedo; este dato no estuvo disponible, pero hay que tener en cuenta que el sedimento del río no solo aporta agua, sino también nutrientes (N, P, K) que contribuyen a la fertilidad del suelo (Abonna y col., 2007).

Tonietto & Carbonneau (2004) definieron el índice de sequía (IS) el cual se calcula sobre un período de 6 meses y permite estimar la disponibilidad de agua para la vid en una determinada región; entre las variables para el cálculo del IS se incluye las precipitaciones (Tabla 3.2). Si se considera que el ecosistema donde se ubica el viñedo es un humedal, entonces el ciclo de Isabella en las zonas bajas inundables ocurre en un ambiente sin limitación hídrica, que incluso en ciertas circunstancias puede verse afectado por un exceso de agua, como ocurre durante el anegamiento que generan las crecidas del Río de La Plata. El estrés por falta de agua puede ocurrir en los viñedos de zonas altas en temporadas muy secas, pero es muy improbable en las zonas bajas. Por lo tanto, si bien el IS no se calculó, se puede considerar a la zona del viñedo como húmeda según la clasificación de los mencionados autores (Tabla 3.2).

Otro factor climático que incide en la calidad de la uva es la radiación solar y las horas de sol (heliofanía), ya que una adecuada luminosidad favorece la acumulación de antocianinas y sólidos solubles, aunque a veces es difícil separar el efecto de la luminosidad del efecto de la temperatura (Reynolds, 2010). No se dispuso de datos específicos de estas variables, pero se obtuvieron en forma indirecta a partir de nubosidad en la ciudad de La Plata, según datos obtenidos de la web. En la Figura 3.10 se muestran las gráficas de nubosidad en la etapa de maduración junto a las gráficas de lluvia.

Lo que se aprecia de las gráficas es que la nubosidad se encuentra muy asociada a los días de lluvia. Las campañas menos lluviosas como v16 y v18 presentaron menor nubosidad (o mayor heliofanía) en comparación con v15 y v17. Las gráficas de las campañas v17 y v18 es donde mejor se aprecia la diferencia del régimen de lluvia y la nubosidad.



**Figura 3.10.** Precipitaciones y nubosidad diaria durante la maduración de Isabella. Las flechas indican el día de cosecha. Las gráficas de nubosidad están reportadas por hora categorizada según el porcentaje del cielo cubierto de nubes. Período: enero/febrero/10 marzo. (<https://es.weatherspark.com/y/29088/Clima-promedio-en-La-Plata-Argentina-durante-todo-el-a%C3%B1o>).

### 3.3.3. Análisis fisicoquímico de la uva Isabella.

Por razones prácticas, las bayas fueron congeladas para su conservación hasta el momento del procesamiento. Distintos estudios han mostrado que el congelamiento de las bayas puede dar lugar a variaciones en los datos de composición comparados con los obtenidos con la uva fresca (Cynkar et al., 2004; Trelfall et al., 2008; García et al., 2011). La respuesta al congelamiento suele ser variable y depende de diferentes factores, entre ellos la variedad de uva y el análisis fisicoquímico posterior. En general, se observa que los °Brix y antocianos no se modifican significativamente dentro de los 3 meses de congelamiento, mientras que el pH puede variar 0,1-0,2 unidades y los valores de YAN disminuir hasta un 10%. La disminución más importante (~ 25%) se da en TA, atribuible principalmente a la precipitación del ácido tartárico (Trelfall et al., 2008). Este fenómeno se puede revertir realizando un tratamiento térmico del mosto descongelado. En el presente trabajo el mosto de uvas descongeladas se incubó 30 min a 40°C para asegurar la resolubilización del ácido tartárico (Iland et al., 2000). En un trabajo preliminar se determinó que la incubación a 40 °C fue efectiva ya que no se observaron diferencias significativas (test t,  $p < 0,05$ ) entre bayas frescas y congeladas para pH, °Brix y YAN, e incluso los valores de TA con uva congelada fueron un 13 % superior a los TA de la uva fresca.

Las características de la uva Isabella y el ANOVA de los datos obtenidos en las 4 vendimias se detallan en la Tabla 3.5. Las fuentes de variación fueron las vendimias, las réplicas y el análisis de los parámetros. La varianza analítica en el mayor de los casos representó un 13% de la varianza total, que correspondió a la variable concentración de antocianos cada 100 g de bayas (Ant%). En el resto de los parámetros, la varianza analítica fue menor al 2% (Tabla 3.3), por lo tanto la fuente principal de variación de los datos fueron las réplicas y vendimias. El ANOVA muestra que los parámetros fisicoquímicos de las bayas tuvieron diferencias significativas entre vendimias. Como primera tendencia se observó que el índice de maduración (Brix/acidez) alternó entre dos valores con diferencias estadísticamente significativas entre ellos: uvas v16/v18 con índice de madurez (IM) 31-33 y las uvas v15/v17 con IM 22-23. El mayor IM para v16/v18 estuvo determinado por el aumento de los °Bx y un menor contenido de acidez de la baya, tal como se observa en la maduración de los frutos en general. Los valores de °Bx oscilaron entre 17,3 (v15/v17) y 20,3-20,7 (v16/v18), y para AT entre 0,74-0,70 (v17/v15) y 0,62-0,68% (v18/v16). Es interesante destacar que no se observó una relación inversa entre AT y el pH. A diferencia de la

AT, el pH fue aumentando significativamente en las 4 campañas, desde un valor de 2,99 en v15 a 3,46 en v18.

Un análisis global de los datos mostró que el peso de la baya fue variable, entre 3,3 (v16) y 3,75 g/baya (v18), con un valor promedio global de 3,5 ( $\pm$  0,17) g). Estos valores representan el promedio del peso individual de 30/50 bayas cuyo coeficiente de variación fue del 17-20%, valor que puede observarse en muchas producciones de vid (Dai et al., 2011). El número de semillas promedio fue de  $\sim$  1,3 semillas/baya, con un peso constante que representó el 2,5% del peso fresco total. La humedad típica de las semillas fue del 30%. El hollejo es una parte fundamental de la vinificación en tinto ya que aporta los pigmentos, componentes del aroma y taninos (Jackson, 2014). El porcentaje de hollejo húmedo varió entre 7 y 10 % del peso total de la baya, correspondiendo el valor más alto a la baya de mayor peso (v18). Si se considera la materia seca del hollejo, el porcentaje expresado en mg de hollejo seco cada 100 g de bayas varió entre 2,15% (v15) y 2,77 % (v18). Cabe aclarar que no se observó una constancia en el porcentaje de materia seca del hollejo (rango 25 - 34 %). Esta situación puede atribuirse a variaciones reales en el contenido de sólidos del hollejo o a variaciones en el contenido de humedad del hollejo húmedo debido al procesamiento de la muestra. La relación hollejo/pulpa osciló entre 0,076 y 0,11, que es muy inferior a la relación que presentan las principales variedades tintas de *V. vinifera* empleadas en vinificación ( $\geq$  0,15) (Gez y col., 2009). Esto se debe al menor tamaño de las uvas de *V. vinifera*, cuyo peso promedio se encuentra en el rango de 1,1-2,0 g/baya (con excepción de la Criolla Grande y Cereza).

El contenido de antocianos de las bayas es un factor importante en el color de los vinos tintos. Los valores de antocianos por peso de hollejo seco no mostraron diferencias significativas en v15, v16 y v18 sin embargo, las variaciones en el contenido de hollejo seco de la baya determinaron que hubiera diferencias significativas entre las uvas v15/v17 respecto a las uvas v16/v18, cuando los antocianos se expresaron cada 100 g de bayas (Ant%). La concentración de antocianos por gramo de hollejo seco, expresados como malvidina-3-glucósido, varió entre 22 y 25 mg para v15, v16 y v18 y el valor significativamente menor de 16,1 mg para v17. Por su parte, los Ant% resultaron máximos para v16/v18 ( $\sim$ 61 mg), siendo significativamente menor en v15 (41,1 mg) y v17 (37,9 mg). Los máximos valores de Ant% fueron entre 2 y 6 veces mayores que los reportados por Koyama et al. (2014) para Isabella cultivada en el sur de Brasil.

**Tabla 3.5.** Análisis fisicoquímico de la uva Isabella de Berisso.

Parámetros	v15		v16		v17		v18	
	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE
<b>Peso baya (g)</b>	3,46 <sup>ab</sup>	0,12	3,31 <sup>b</sup>	0,09	3,50 <sup>ab</sup>	0,15	3,75 <sup>a</sup>	0,18
<b>% Hollejo fresco (g/100 g bayas)</b>	8,3 <sup>b</sup>	0,3	7,3 <sup>bc</sup>	0,2	6,9 <sup>c</sup>	0,4	10,0 <sup>a</sup>	0,6
<b>% Hollejo seco (g/100 g bayas)</b>	2,15 <sup>c</sup>	0,05	2,25 <sup>bc</sup>	0,07	2,35 <sup>b</sup>	0,05	2,77 <sup>a</sup>	0,06
<b>% Semillas (g/100 g bayas)</b>	2,9 <sup>a</sup>	0,1	2,3 <sup>a</sup>	0,2	2,5 <sup>a</sup>	0,4	2,4 <sup>a</sup>	0,3
<b>% Pulpa (g.100/.g bayas)</b>	88,8 <sup>b</sup>	0,29	90,2 <sup>a</sup>	0,29	90,6 <sup>a</sup>	0,6	87,5 <sup>b</sup>	0,72
<b>Hollejo/pulpa</b>	0,09		0,08		0,076		0,11	
<b>Grados Brix (°Bx)</b>	17,3 <sup>b</sup>	0,3	20,3 <sup>a</sup>	0,8	17,4 <sup>b</sup>	0,1	20,7 <sup>a</sup>	0,3
<b>Azúcares reductores en mosto (g/l) *</b>	161,5		195,3		162,6		203	
<b>Alcohol probable (% v/v)**</b>	9,6		11,3		9,6		11,7	
<b>pH</b>	2,99 <sup>d</sup>	0,02	3,12 <sup>c</sup>	0,01	3,32 <sup>b</sup>	0,02	3,46 <sup>a</sup>	0,05
<b>AT (ácido tartárico %p/p)</b>	0,78 <sup>a</sup>	0,02	0,66 <sup>b</sup>	0,02	0,74 <sup>a</sup>	0,01	0,62 <sup>b</sup>	0,02
<b>N-asimilable (YAN) (mg/l)</b>	204 <sup>a</sup>	14	140 <sup>b</sup>	7,5	228 <sup>a</sup>	4,9	207 <sup>a</sup>	25
<b>Antocianos en hollejo seco (mg/g)</b>	21,9 <sup>a</sup>	1,3	24,9 <sup>a</sup>	2,4	16,1 <sup>b</sup>	1,0	21,9 <sup>a</sup>	1,8
<b>Antocianos cada 100 g baya (mg% p/p)</b>	47,1 <sup>b</sup>	1,9	56,1 <sup>a</sup>	4,2	37,9 <sup>c</sup>	1,6	60,7 <sup>a</sup>	4,6
<b>Índice de madurez Cillis-Odifredi, IM (Brix/AT)</b>	21,6 <sup>b</sup>	1,6	30,8 <sup>a</sup>	2,1	23,3 <sup>b</sup>	1,0	33,3 <sup>a</sup>	0,8

Valores medios con igual letra no difieren significativamente: test Tukey (p < 0.05).

\*azúcares reductores calculados a partir de los grados Brix según tablas del INV.

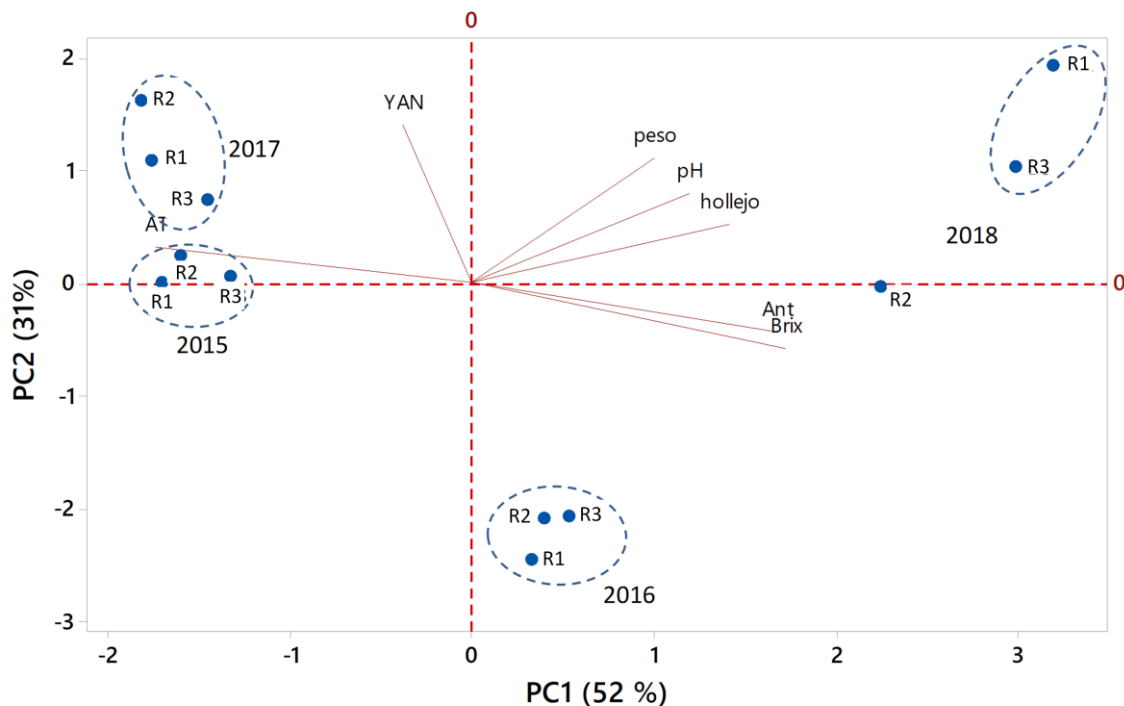
\*\* alcohol probable calculado de tablas donde se asume una relación de 17 g/l de azúcar para producir 1% de alcohol.

En general, el perfil de antocianinas en las uvas es característico de la variedad (Dai et al., 2011). Un análisis de composición de antocianinas realizado en un extracto de hollejo de Isabella v16 (mezcla de las 3 réplicas) mostró que la malvidina 3-O-monoglucósido fue el antociano mayoritario (56%), seguido de malvidina 3-O-monoglucósido cumarilado (11,5%), peonidina 3-O-monoglucósido (11,4%) y petunidina 3-O-monoglucósido (11,4%), peonidina 3-O-monoglucósido cumarilado (4,9%), delphinidina 3-O-monoglucósido (3,6%) y cianidina 3-O-monoglucósido (2,5 %). También se detectó la malvidina y peonidina 3-O-monoglucósido acetilados y el 2,5-diglucósido de malvidina, pero en concentraciones debajo del límite de cuantificación del método. Estos datos coinciden parcialmente con lo reportado por Flamini & Tomasi (2000), y las diferencias pueden deberse a la metodología empleada para extraer las antocianinas.

La pulpa contiene los componentes básicos necesarios para que ocurra la fermentación alcohólica, ya que aporta los nutrientes y un ambiente ácido propicio para el crecimiento de las levaduras. Los principales nutrientes son los azúcares y la fuente de nitrógeno asimilable (YAN). De acuerdo al análisis por HPLC, la glucosa y fructosa fueron los azúcares mayoritarios de la baya, con una relación fructosa/glucosa de 1,02, 1,09, 1,08 y 1,2 para v15, v16, v17 y v18, respectivamente. Los valores de YAN fueron cercanos (v16) o mayores a 130-150 mg/l, que es la concentración mínima requerida para una adecuada fermentación alcohólica con mostos que contienen concentraciones de azúcar del orden de 200 g/l (Bely et al., 1990; Zamora, 2009).

Para una mejor visualización de las tendencias de los parámetros en relación a las vendimias, los datos se analizaron mediante ACP (Figura 3.11). Se observó que las réplicas, independientemente de las diferencias entre ellas, se pueden agrupar en clusters, con excepción de la réplica R2 de v18. El primer y segundo componente representaron en conjunto el 84% de la variabilidad. Las principal fuente de variación según el primer componente (53% de la varianza) fueron los parámetros °Bx, Ant% y AT. Las uvas v15 y v17 se asociaron con altos valores de AT, mientras que ocurrió lo inverso con v16y v18, que además presentaron los mayores valores de °Bx y antocianos %. Las bayas v18 se diferenciaron de v16 por un mayor pH, peso y contenido de hollejo (tanto húmedo como seco). En el segundo componente (32 % de la varianza), la principal contribución fue el YAN, que separó v16 con menor contenido de nitrógeno asimilable del resto de las vendimias que no mostraron diferencias significativas. Dado que los componentes principales son ortogonales, se puede inferir

que el contenido de nitrógeno asimilable de las bayas no guarda relación con los parámetros relevantes °Bx, Ant% y AT.



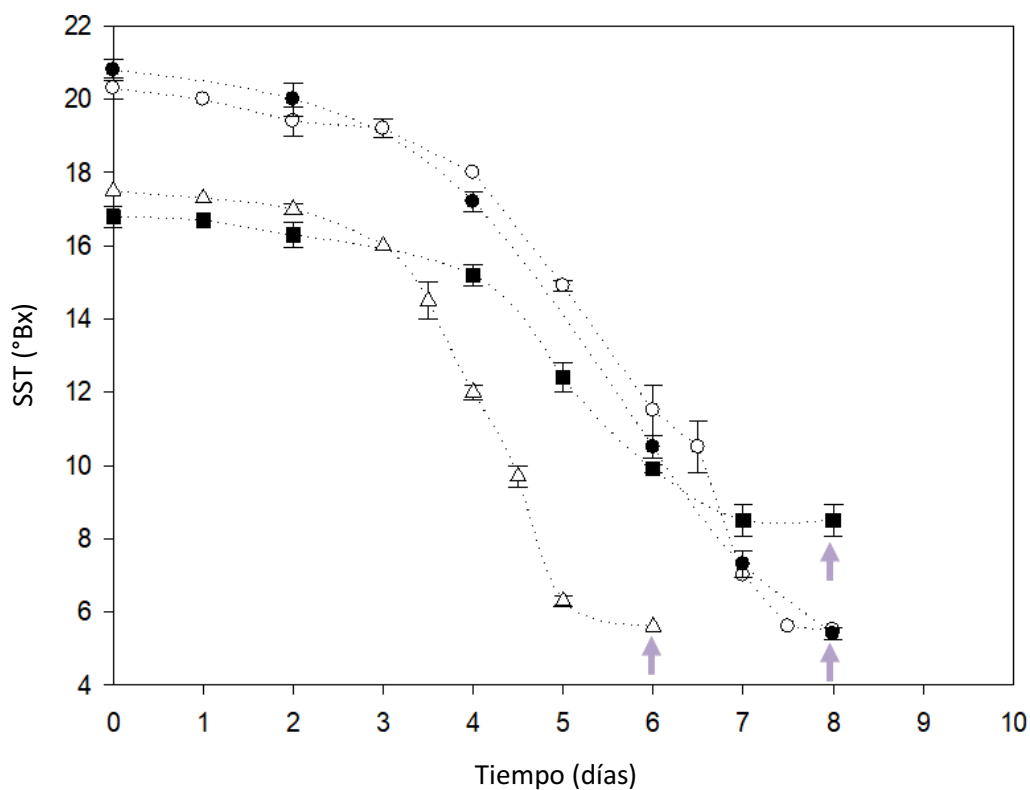
**Figura 3.11** Gráfico Bi-plot correspondiente a ACP de la composición de las bayas. R1, R2 y R3 son las réplicas del muestreo del viñedo. Peso baya, hollejo: % húmedo.

### 3.3.4. Microvinificaciones, balance de materia en el descube y análisis fisicoquímico y sensorial de los vinos.

En la Figura 3.12, se muestra la evolución de los Brix promedio de las tres réplicas y su correspondiente desviación estándar para las microvinificaciones llevadas a cabo con las cuatro vendimias. La excepción fue v16, en la cual no se consideró la réplica R3 debido a que la disminución de los °Bx se aceleró marcadamente a partir de los 3 días de fermentación (capítulo 4). En la evolución de los °Bx con el tiempo, tanto en v16, v17 y v18 se distinguieron las tres fases típicas de la fermentación espontánea del vino (Zamora, 2009): un período inicial de 2 a 3 días durante el cual los °Bx disminuyeron 1,0 o 1,5 °Bx llamada a veces fase de latencia, una fase de máxima velocidad de fermentación, en este caso de de 2 - 3 días, y la fase final de desaceleración hasta el momento del descube. El período inicial o fase de latencia podría atribuirse a que la biomasa inicial es baja, y por lo tanto, los cambios en los °Bx no son perceptibles en las primeras horas de la fermentación, pero también al hecho



de que las levaduras provienen de la superficie de la baya y deben adaptarse a la anaerobiosis, la presión selectiva del  $\text{SO}_2$  y la alta acidez del mosto hasta alcanzar su máxima capacidad fermentativa (Jouhten et al., 2012).



**Figura 3.12.** Evolución de los °Bx durante las microvinificaciones v15 (■), v16 (○), v17 (△) y v18 (●). Los °Bx no se corrigieron por alcohol. Al final de la fermentación el valor de °Bx fue de 5,5 y los Baumé cero. Las flechas indican el descube. En v15 la fermentación continuó luego del descube hasta alcanzar los 5,5 °Bx.

Todas las fermentaciones finalizaron cuando el vino alcanzó los 5,0 - 5,5 °Bx, lo que fue equivalente a un valor de cero Baumé, como corresponde a un vino seco. Los °Bx no alcanzan el valor de cero debido a la presencia de alcohol y otros compuestos solubles presentes en el vino que modifican el índice de refracción. En v16 y v18 la fermentación fue muy similar, y se completó alrededor de los 8 días; mientras que en v17 el tiempo de fermentación fue de 6 días. Esta diferencia en el tiempo de fermentación podría atribuirse al mayor contenido de azúcar de las bayas v16 y v18 respecto a v17, ya que al aumentar el nivel de alcohol en el medio se ralentiza la velocidad de fermentación y por ende se prolonga la fase de fermentación activa (Ansanay-Galeote et al., 2001).

En v15 la situación fue muy diferente a pesar que las uvas tenían valores de °Bx similares a v17. La curva de disminución de °Bx muestra cierta anomalía; el período de latencia se extendió hasta 4 días y la fase de desaceleración fue muy breve ya que la fermentación tuvo una parada a partir del séptimo día, cuando el vino tenía 8 °Bx. De acuerdo a los protocolos de elaboración del vino de la Costa, se procedió al descube, y luego de 15 días se realizó el primer trasiego. La muestra del trasiego dio un valor de 5,5 °Bx (no mostrado), lo cual indica que la parada de fermentación fue transitoria y la vinificación se completó después del descube.

En el descube de las 4 fermentaciones el mosto fermentado se separó en diferentes fracciones: vino de gota, vino de prensa y orujo. En la Tabla 3.6 se muestra el balance de materia en el descube de cada temporada. El ANOVA realizado con las diferentes fracciones del vino mostró que las diferencias entre temporadas no están claramente definidas. El rendimiento promedio de vino fue de ~ 68% (relación vino/uva), correspondiendo el 85% al vino de gota, que es un valor característico en la mayoría de las vinificaciones con uva tintas (Gill y Pszczólkowski et al., 2001). El volumen del vino de prensa y sus características depende del tipo de prensa empleada. En este trabajo se empleó una prensa hidráulica manual de laboratorio, la cual se operó a 10 milibares durante 2 min. En estas condiciones, el vino de prensa no presentó anomalías, siendo sensorialmente más fuerte e intenso que el vino de gota. Ambos vinos se mezclaron para obtener un producto único que es la práctica que realizan los productores en la bodega.

El orujo representó un 20% del peso total de la uva procesada, y su contenido de materia seca promedio fue del 22%. Algunos datos, como el valor de 283 g orujo/kg uva que corresponde a la muestra en R3 de v15, mostraron un residuo muy grande en el ANOVA y pueden ser considerados como un error experimental. Si bien la humedad residual del orujo depende del prensado y el grado de maceración de la uva, el valor de 22% es característico de este desecho (García-Lomillo & González-San José, 2017). En el balance de materia de las vinificaciones se observó una pérdida global de peso de ~9%, atribuible a la evaporación y principalmente a la producción de CO<sub>2</sub>. Al pH del vino, el CO<sub>2</sub> molecular es la especie química predominante y no es retenido como bicarbonato.

**Tabla 3.6.** Balance de materia en el descube.

Fermentación (°Bx descube)	Vino de gota (ml/kg uva)	Vino de prensa (ml/kg uva)	Rendimiento en vino (ml/kg uva)	Orujo (g/kg uva)
<b>v15 (Brix 8,0)</b>	533 <sup>b</sup> ±34	106 <sup>a</sup> ±10	640,0 <sup>b</sup> ±35	242 <sup>a</sup> ±38
<b>v16 (Brix 5,5)</b>	611 <sup>a</sup> ±19	111 <sup>a</sup> ±19	720,0 <sup>a</sup> ±17	194 <sup>a</sup> ±7
<b>v17 (Brix 5,5)</b>	588 <sup>ab</sup> ±21	94,4 <sup>a</sup> ±17	680,2 <sup>ab</sup> ±15	193 <sup>a</sup> ±7
<b>v18 (Brix 5,5)</b>	587 <sup>ab</sup> ±15	113 <sup>a</sup> ±12	700 <sup>ab</sup> ±26	203 <sup>a</sup> ±18
<b>Media global</b>	580 ± 36	107 ± 15	680,5 ± 4,2	208 ± 23,1

El análisis fisicoquímico de los vinos se muestra en la tabla 3.7. La primera conclusión es que los parámetros de los vinos se encuentran dentro de los límites legales establecidos por la legislación específica para las variedades de *Vitis vinifera* (INV, 2018). En el caso del metanol este resultado es muy importante, ya que se ha mencionado que ciertos híbridos de uvas americanas podrían generar vinos con alto contenido de metanol (Lee et al., 1975). El INV solo indica si el metanol se encuentra debajo del límite máximo permitido (400 mg/l). Análisis cuantitativos realizados mediante HPLC con vinos de Isabella v16 mostraron concentraciones de metanol del orden de 200-250 mg/l. En conclusión, el metanol no es un componente crítico en los vinos de Isabella. Mas aún, algunos autores consideran que el metanol presente en los vinos en general no implica un riesgo para la salud y por lo tanto sería innecesario exigirlo en la legislación (Hodson et al., 2017).

La concentración residual de azúcares reductores varió entre 1,8 y 2,4 g/l, y el nivel de alcohol coincidió con el valor probable calculado a partir de los grados Brix de la uva (Tabla 3.5), que corresponde a una relación de 17 g/l de azúcar fermentable para 1% (v/v) de alcohol. Un metabolito importante de la fermentación es el glicerol, ya que es el segundo componente mayoritario de la fermentación alcohólica y puede jugar un rol en algunos atributos del vino (Gawel et al., 2008). La concentración de glicerol varió entre 5,7 y 7,3 g/l. En v15 la relación final de alcohol/glicerol (g/g) fue de 10, mientras que en resto de las campañas varió entre 12 y 13 g/g.

El ANOVA mostró que hubo diferencias significativas en los valores de los diferentes parámetros analizados en el vino, y que existe cierta relación de estos valores con la composición de la uva. El análisis del pH y la acidez total es complejo, ya que durante la fermentación alcohólica se producen diferentes ácidos orgánicos, como acético y succínico. Dado que no se observó fermentación maloláctica, los vinos

mostraron una tendencia creciente del pH en las consecutivas campañas, al igual que lo observado con el pH las bayas. Un dato interesante es que la acidez volátil asociada a la producción de acético fue significativamente mayor en las uvas con menor índice de maduración.

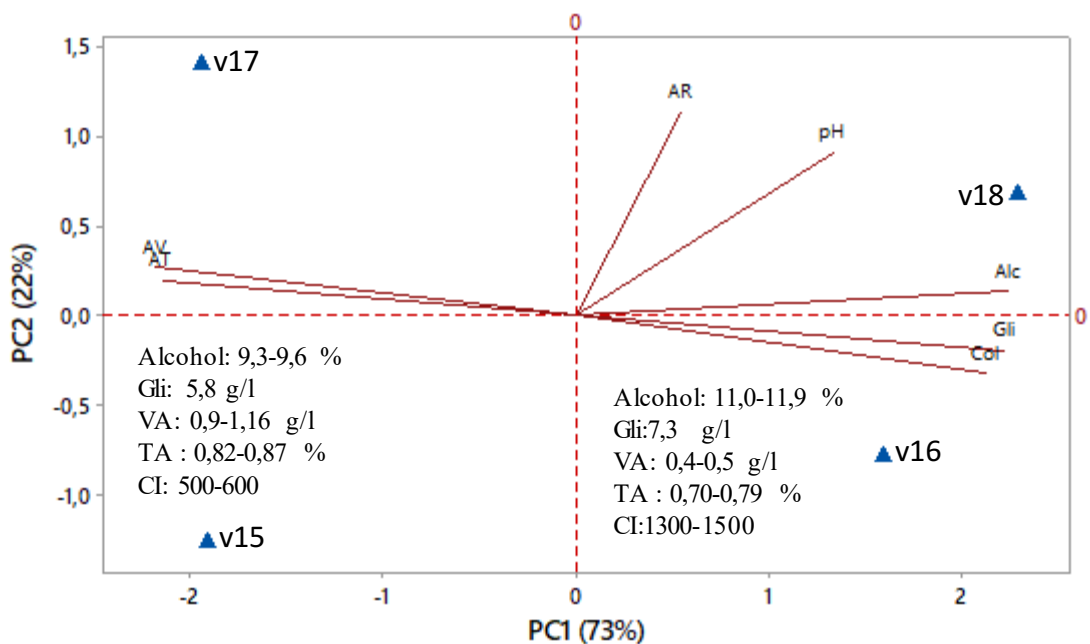
Con respecto al índice de color (IC) hubo diferencias significativas en los vinos de las cuatro campañas, no obstante, se observó que los vinos v16/v18 presentaron un IC muy superior a los vinos v15/v17. El IC del vino v17 se encontró en el límite del valor mínimo exigido por el INV. Si bien los vinos con mayor IC derivaron de bayas con mayor contenido de antocianos % (v16/v18), se observó que la relación entre antocianos en la baya y su concentración en el vino no fue directa y dependió de varios factores. Uno de ellos es la extractabilidad (Romero-Cascales et al., 2005). Cardona y col, (2010) reportaron una extractabilidad de antocianos en Isabella de alrededor del 40%, por lo que sugirieron emplear enzimas de maceración para aumentar la degradación del hollejo y la extractabilidad de los antocianos y otros compuestos de la bayas. Alternativamente, se podría recurrir a diferentes técnicas de vinificación, como la maceración carbónica (Tesniere & Flanzky, 2011).

Un dato a destacar es que los vinos no superaron el límite máximo de cobre a pesar de la aplicación de caldo bordelés como el principal fungicida empleado en el viñedo, el cual se observó incluso en el hollejo de las bayas al momento de la cosecha. Esta situación debe ser atribuida al hecho que normalmente el cobre reacciona durante la fermentación formando sales insolubles que son eliminadas en el descube o en los sedimentos durante los trasiegos (Tariba, 2011).

**Tabla3.7.** Análisis fisicoquímico de los vinos de Isabella obtenidos en microvinificaciones.

Parámetro	2015		2016		2017		2018		Legislación
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	
<b>Densidad (g/ml)</b>	0,9959		0,9939		0,9967	5 x 10 <sup>-4</sup>	-		
<b>Extracto seco (g/l)</b>	26,3	0,53	27,4	0,55	29,3	1,47	-		
<b>pH</b>	2,9 <sup>c</sup>	-	3,0 <sup>b,c</sup>	-	3,1 <sup>b</sup>	0,1	3,3 <sup>a</sup>	0,02	
<b>Acidez total (% ácido tartárico)</b>	0,82 <sup>a</sup>	0,03	0,75 <sup>b</sup>	0,04	0,87 <sup>a</sup>	0,031	0,7 <sup>b</sup>	0,014	
<b>Acidez volátil acético (g/l)</b>	0,9 <sup>a</sup>	0,05	0,42 <sup>b</sup>	0,02	0,99 <sup>a</sup>	0,15	0,49 <sup>b</sup>	0,04	Máx 1,2 ± 0,2
<b>Azúcares reductores (g/l)</b>	1,8 <sup>b</sup>	0,1	2,18 <sup>a</sup>	0,14	2,46 <sup>a</sup>	0,17	2,3 <sup>a</sup>	0,14	
<b>Alcohol (% v/v)</b>	9,3 <sup>c</sup>	0,2 <sup>b</sup>	11,2	0,26	9,5 <sup>c</sup>	0,115	11,9 <sup>a</sup>	0,3	
<b>Glicerol (g/l)</b>	6,9 <sup>a</sup>	0,11	7,15 <sup>a</sup>	0,22	5,66 <sup>b</sup>	0,12	7,1 <sup>a</sup>	0,32	
<b>Metanol (mg/l)</b>	< 400		< 400		< 400		< 400		Máx 400
<b>Cu (mg/l)</b>	<1				<1		< 1		Máx 1,0
<b>CaI como CaO (g/l)</b>	< 0,25				< 0,25		< 0,25		Máx 0,25
<b>Sulfatos como K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (g/l )</b>	<1				<1		<1		Vinos secos: máx 1

Para visualizar mejor la relación entre las características de los vinos y las vendimias, se realizó un ACP con los valores de composición promedio de las 3 réplicas (Fig. 3.13). Se observó que hay dos tipos de vinos asociados a los dos tipos de uva antes mencionados. Los vinos v16 y v18 tuvieron mayor nivel de alcohol y glicerol, mayor intensidad de color y menor acidez total y volátil. El mayor nivel de alcohol y glicerol es consistente con el mayor contenido de azúcar de las bayas v16/v18 y la intensidad de color estaría relacionada con la concentración de antocianos %. Sin embargo, se ha observado que la relación entre antocianos en la baya y en el vino no es directa y depende de varios factores. Uno de ellos es la extractabilidad (Romero-Cascales et al., 2005). Cardona y col, (2010) reportaron una extractabilidad de antocianos en Isabella de alrededor del 40%, por lo que sugieren emplear enzimas de maceración para aumentar la degradación del hollejo y la extractabilidad de los antocianos y otros compuestos de la bayas. Alternativamente se podría recurrir a vinificaciones diferentes, como la maceración carbónica (Tesniere & Flanzky, 2011). Los azúcares residuales (más asociados con el segundo componente), no guardaron relación con los demás parámetros; es decir que independientemente de las características de la uva, los azúcares se consumieron totalmente durante la fermentación. La ubicación en el gráfico de v15 se debió a que fue el vino más seco, es decir que tuvo menor azúcar residual, y menor pH. Por el contrario, v18 se asoció según este componente al vino con mayor azúcar residual y mayor pH.



**Fig 3.13** Gráfico Bi-plot correspondiente a ACP de parámetros de vinos. VA: acidez volátil (g/l acético), AT: acidez total (% tartárico), IC: índice de color Gli: glicerol, Alc: alcohol.

Con excepción de v15, los vinos obtenidos en las otras tres campañas fueron evaluados por un panel sensorial mediante una cata a ciegas en la fiesta del vino de la Costa. Los vinos se analizaron 3 semanas después de embotellar. En análisis fisicoquímicos previos realizados en el laboratorio no se apreciaron diferencias importantes entre las réplicas, por lo tanto, se decidió enviar muestras tomadas al azar de una de las réplicas. Los puntajes representan una evaluación global del vino consensuada entre los integrantes del panel de cata. Los puntajes obtenidos por los vinos v16, v17 y v18 fueron de 78, 70 y 84 respectivamente (Figura 3.14). Si bien el puntaje indica cierta “calidad” del vino, compararlos en forma absoluta tiene un valor relativo, ya que los vinos son diferentes cada año. Otra forma de evaluar el vino fue considerar su ubicación respecto del resto de las muestras, es decir dentro del rango mínimo/máximo del puntaje otorgado por el jurado. El valor mínimo establecido cada año por el jurado fue de 60, por lo que todos los vinos de calidad baja recibieron ese puntaje. El mayor puntaje otorgado por el jurado en el concurso corresponde al vino de “mejor calidad” y tiene el mayor premio, en los concursos de los años 2016, 2017 y 2018 los puntajes variaron entre 82 y 84. En ese contexto, el vino v16 recibió el tercer premio, el vino v17 una calificación media y el v18 el primer premio. El vino v15 presentó una ligera turbidez y organolépticamente fue poco aceptable, por lo que no fue enviado al concurso.

Cabe mencionar que el único vino al cual se le realizaron análisis fisicoquímicos fueron los realizados en este trabajo. Según la OIV (2009), los vinos presentados en una cata deben ir acompañados de un análisis químico básico (grado alcohólico, acidez titulable y volátil, azúcar residual y sulfuroso libre y total). Esto no sucedió con los vinos presentados por el resto de los participantes, ya que los organizadores del concurso no lo exigieron. La falta de información sobre la composición de los vinos presentados año tras año dificultó la interpretación de los resultados de la cata, no obstante, y considerando los objetivos del presente trabajo, los resultados permitieron evaluar la preferencia o aceptabilidad del vino obtenido en las diferentes vendimias.

Al la Caba  
No  
seca

1955  
Uva de Uva  
Familia de Uva, Exacto  
Degustador  
Numero 26  
Fecha 9 de julio 2016

		MAL	REGAL	BIEN	MUY BIEN	EXCELENTE					
		0	1	2	3	4	5	6	7		
OUO	Color Limpidez									1	
SARIZ	Olor										2
BOCA	Grasa, Sabor, Zarcos, Fin de Boca										4
EQUILIBRIO ARMONIA											3
Total de Puntos										20	

Recuerda que los votos fijos se califican a partir de los 10 Puntos.  
Y que el punto personal no debe influir en la calificación.

54 Pasa - Uva

Degustador  
Numero 47  
Fecha 17 de julio 2016

		MAL	REGAL	BIEN	MUY BIEN	EXCELENTE					
		0	1	2	3	4	5	6	7		
OUO	Color Limpidez										1
SARIZ	Olor										2
BOCA	Grasa, Sabor, Zarcos, Fin de Boca										4
EQUILIBRIO ARMONIA											3
Total de Puntos										30	

Recuerda que los votos fijos se califican a partir de los 10 Puntos.  
Y que el punto personal no debe influir en la calificación.

Degustador  
Numero 127 (96)  
Fecha 7/1/18

		MAL	REGAL	BIEN	MUY BIEN	EXCELENTE					
		0	1	2	3	4	5	6	7		
OUO	Color Limpidez										1
SARIZ	Olor										2
BOCA	Grasa, Sabor, Zarcos, Fin de Boca										4
EQUILIBRIO ARMONIA											3
Total de Puntos										84	

Recuerda que los votos fijos se califican a partir de los 10 Puntos.  
Y que el punto personal no debe influir en la calificación.

Figura 3.14. Fichas con el puntaje otorgado a los vinos obtenidos en las microvinificaciones v16, v17 y v18.



### **3.4. Discusión y conclusiones.**

Es un concepto aceptado que la calidad de un vino depende directamente de la calidad de la uva (Conde et al., 2007). El potencial enológico de la variedad está determinado genéticamente, pero la expresión de dicho potencial, que se refleja en las características físico-químicas de la baya madura, depende de múltiples interacciones entre el genotipo y las condiciones ambientales (clima, suelo, manejo del cultivo) (Dai et al., 2011). Dada la complejidad de estas interacciones, son esperables las variaciones en la composición de la uva y el vino entre vendimias, y más aún entre distintas zonas geográficas (Keller, 2010; Jones et al., 2012). Con respecto a la uva Isabella cultivada en Berisso, los datos de cuatro campañas consecutivas mostraron que la composición de la baya no fue constante, alternando uvas que presentaron una mayor maduración y contenido de antocianos % (como v16 y v18), con uvas que tuvieron un menor valor en estos parámetros (como v15 y v17). Otros parámetros, como peso de la baya, pH, nitrógeno asimilable y % de hollejo, mostraron diferencias significativas con valores característicos en cada campaña.

Los vinos elaborados por fermentación espontánea con las diferentes uvas lograron finalizar la fermentación en 6-8 días, con excepción de v15 que tuvo una parada de fermentación a los 7 días para luego recuperarse entre el descube (8 días) y el primer trasiego (15 días después del descube). Los vinos alcanzaron el grado alcohólico compatible con el contenido de azúcar inicial y todos los parámetros enológicos se encontraron dentro de los límites establecidos por el INV. El análisis químico mostró que los vinos obtenidos con bayas v16/v18 tuvieron mejor color, menor acidez total y volátil, mayor contenido de alcohol y glicerol. Por su parte, el análisis sensorial, aunque limitado, mostró que estos vinos tuvieron una mejor percepción respecto al aroma y una sensación en boca agradable, sin que ningún aspecto interfiera en el conjunto; lo contrario ocurrió con el vino v17, que mostró baja aceptabilidad, o el vino v15, que si bien su composición cumplió con todos los requisitos que establece la legislación, se consideró organolépticamente de baja calidad y no se presentó al concurso. Dado que los resultados mostraron una clara relación entre composición de uva y las propiedades del vino, se puede considerar a las uvas v16/v18 como una referencia de calidad enológica para la variedad Isabella cultivada en Berisso.

La interpretación de los resultados de composición de la uva es compleja, dado que los factores que pueden haber incidido en la maduración y otras características de la Isabella son múltiples y de diverso origen (Reynolds, 2010, Deloire et al., 2015). La

combinación de estos factores determinó que las uvas de las campañas v16/v18 y v15/v17 difieran significativamente en parámetros importantes para la elaboración del vino. El manejo del viñedo que afecta el microclima no fue regular todos los años. La excepción fue v17 y v18, que tuvieron un manejo similar, sin embargo la composición de las uvas fue bien diferente en ambas vendimias. Estos cambios de composición de la uva no solo ocurrieron en el viñedo en estudio, sino también en otros viñedos y con la misma tendencia año tras año, por lo tanto, más allá de las prácticas agrícolas realizadas en cada viñedo, algún factor global incidió en la maduración de Isabella. En este contexto, debemos considerar al clima como el factor global más crítico debido a su marcada influencia que tiene en la evolución del cultivo de vid y por ende en la composición final de la uva (Jones, 2010; Jackson, 2014).

La fisiología de la vid está regulada por el mesoclima y también por el clima de gran escala (Jackson, 2014). La variación térmica y pluviométrica durante el período vegetativo se encuentran dentro de los factores más influyentes en la fenología de la vid y en la calidad final del fruto (Chevet et al., 2011; Manheiro et al., 2013). Para la vid se han establecido índices bioclimáticos definidos en base a estas variables que permiten describir el mesoclima durante el período activo del cultivo. La evolución de estos índices permite definir tendencias del clima regional cuando se miden durante largos períodos de tiempo (Catania et al., 2007) como así también caracterizar y comparar diferentes regiones vitícolas (Tonniato & Carbonneau, 2004). En este trabajo los índices se calcularon para tener referencia del clima en cada temporada sin hacer especulaciones a largo plazo, ya que el período de observación no fue prolongado (4 a 5 años).

Los índices basados en los datos de temperatura que representan el calor recibido por el viñedo en todo el ciclo del cultivo (como GDD o IH), se mantuvieron dentro del mismo rango en las 4 (5 si se toma v19) campañas, y con valores que se consideran suficientes para que esta vid alcance su completa madurez. Por lo tanto, la cantidad de calor recibida por el viñedo no debe considerarse como un factor que limitó la maduración de las bayas en v15/v17. Lo mismo puede decirse para el ciclo térmico del mes previo a la cosecha, ya que el IFN ( $T_{\min}$  promedio) o la amplitud térmica no correlacionaron con el IM, °Bx o Ant%. En conclusión, la temperatura ambiental no sería el factor climático que controló la maduración de las bayas.

Dentro de las variables del clima se deben considerar la heliofanía y las lluvias. En este trabajo, la heliofanía se evaluó indirectamente mediante los datos de nubosidad. De acuerdo a los datos meteorológicos, los días nublados estuvieron

principalmente localizados alrededor de los días de lluvia; por lo tanto, se puede considerar que en Berisso hay una cierta correlación entre estas dos variables. Cuando se habla de exceso de lluvia en el cultivo de la vid hay que tener en cuenta el status del suelo de la región que se considere. Los suelos para el cultivo de *V. vinifera* tienen que ser más bien escasos de agua, tanto la originaria de las capas freáticas como la que provienen de las precipitaciones, de ahí la gran importancia que tiene un correcto manejo del estado hídrico del suelo en esta especie de vid (Van Leeuwen et al., 2018). Pero la situación de la Isabella es completamente diferente. La zona baja de Berisso donde se encuentra el viñedo constituye un humedal, por lo tanto difícilmente ocurra en estos suelos un stress hídrico por déficit de agua, mas bien el stress para la vid sería consecuencia de un exceso de agua, p.ej., por anegamiento. Esto ocurre con las crecidas del río y cuando hay precipitaciones intensas, lo cual afecta negativamente la fisiología de la vid (Stevens & Prior, 1994; Kang et al., 2008). Estudios realizados por Soar et al., (2008), mostraron que en regiones vitícolas de Australia cuando predomina la humedad, el tiempo lluvioso y una baja heliofanía, los vinos tienden a ser de baja calidad. Van Leeuwen & Destrac-Irvine (2017) sostienen que un stress por exceso de agua puede conducir a un deterioro de la calidad del vino y tanto la insolación como la lluvia cuando son óptimas incrementan el contenido de los polifenoles y el azúcar de la baya. Si se analizan globalmente los datos meteorológicos observamos que en orden decreciente de lluvia y nubosidad se ubicaron v17 > v15 > v16 > v18, coincidiendo que las bayas con los mejores parámetros enológicos se obtuvieron en los ciclos más secos y con mayor cantidad de horas sol. De hecho un análisis estadístico de los datos de composición de las uvas y del clima en las cuatro campañas mostró una fuerte correlación negativa entre la cantidad de lluvia caída y los Brix (r -0,896) y Ant% (r -0,92) y una correlación positiva con AT% (r 0,93). Si se tiene en cuenta el factor clima, una posible hipótesis para explicar la falta de madurez de la Isabella sería el aparente “exceso” de lluvia caída en v17 (y v15). Cabe resaltar que esta relación entre la pluviometría y la madurez de la baya se observó también en la campaña v19 (ver Capítulo 5).

Resultó de interés para este trabajo comparar datos de Isabella y sus vinos de diferentes regiones de América e incluso de Argentina. Los climas donde se cultiva Isabella son variados. En el valle del Cauca, en Colombia, el clima es de tipo Af, tropical de selva. En Argentina, Colonia Caroya tiene un clima Cwa, que es subtropical húmedo con estación seca (invierno). En Perú, en Ica, el clima es BWh. La mayor información proviene de Brasil, ya que los vinos de Isabella y otras uvas no viníferas

ocupan gran parte del mercado de vinos de mesa (Tabla 3.8). En Brasil se cultiva en regiones como Río Grande do Sul, las tierras altas de Espírito Santo, Minas Gerais y Pernambuco, entre otras, con predominio del clima subtropical húmedo (Cfa) y el clima oceánico templado (Cfb). La adaptación de Isabella a distintas regiones cálidas y húmedas de Brasil se evidencia por el amplio rango de ciclos de cultivo y de demanda de calor para alcanzar plena madurez. Varios autores han reportado ciclos de cultivo de Isabel en el rango de 116-177 días y valores de GDD entre 1238 y 1900 (Roberto et al., 2004; Sato, 2007; Nunes et al., 2016; Carvalho, 2016).

Con respecto a los parámetros de Isabella y sus vinos, los mismos se encuentran dentro de rangos que son comunes a todas las regiones de cultivo. El rango de pH es 2,7-3,5, el de °Bx 16-21 y el de IM entre 18 y 35. Respecto a los vinos, y en consistencia con el valor de °Bx de los mostos, el nivel de alcohol no sobrepasa el 12%. La limitación en el contenido de azúcar de Isabella (máximo 21 °Bx) proviene de su parentesco con *V. labrusca*, ya que las especies indígenas de América del Norte acumulan menos azúcares que las variedades de *V. vinifera* (Rice, 1973).

Según los resultados de este estudio, se puede concluir que la uva Isabella y los vinos obtenidos por fermentación espontánea en condiciones de laboratorio muestran variabilidad año tras año, alternando vendimias y vinos con buenos parámetros de calidad, con otros que no alcanzan la calidad deseada. Esta situación estaría determinada principalmente por factores climáticos, específicamente por la cantidad de lluvia caída durante el ciclo del cultivo. Los viñedos en Berisso están plantados en sistema de “pie franco” (no injertado) y la vid se multiplica asexualmente empleando reproducción agámica, principalmente acodos y estacas. Las plantas nuevas se han intercambiado entre los productores; por lo tanto, los viñedos de Berisso deberían tener plantas genéticamente similares. La propagación vegetativa es importante para mantener genotipos con características especiales. Sin embargo, en la vid se producen mutaciones espontáneas en las células somáticas que acaban fijándose y transmitiéndose a nuevos individuos por propagación vegetativa. Por lo tanto, tras muchos ciclos de propagación, los clones acumulan diferencias fenotípicas y aparece la diversidad clonal (Carrier et al., 2012). La selección clonal puede emplearse para obtener plantas con potenciales ventajas agronómicas o propiedades mejoradas para hacer vino y podría ser aplicada en Berisso para mejorar los viñedos de Isabella en un contexto de condiciones climáticas cambiantes como fue el caso de “Isabel Precoce” en Brasil (Camargo, 2004).

**Tabla 3.8.** Referencias a la uva Isabella y sus vinos.

Origen	Año muestra	Baya					Vino						Referencias	
		Peso baya (g)	Brix	pH	AT (% tartárico)	Índice Brix/AT	pH	AT (% tartárico)	Acidez volátil (g/l)	Alcohol % (v/v)	Metanol (mg/l)	Extracto seco (g/l)		
Santander, Valle del Cauca (Colombia)	2007	3,2-3,5	18-20	2,7-3,2	0,7 - 1,02	18-28								Hernández et al., 2011
Rio Grande do Sul (Brasil)			17,9 - 19,6	3,0 - 3,3	0,47 - 0,52	33,1 - 39,4	3,56 - 3,99	0,52 - 0,66	0,92 - 1,02	10,1 - 10,6		26,1 - 28,8		Arcanjo y col., 2016
	1988 - 1994	2,5 - 3,5	16,4 - 21,5	3,26 - 3,45	0,3 - 0,52	32 - 48 <sup>a</sup>	3,0 - 3,5	0,495 - 0,645	0,24 - 0,5	8,16 - 12	133-327	19,2 - 23,2		Rizzon y col, 2000
Pernambuco, Rio Grande do Sul, Espírito Santo y Minas Gerais (Brasil)	2014 - 2015						3,2 - 3,67	075 - 1,0	0,72 - 1,24	10 - 12,2		26,1 - 29,4		Czepack et al, 2016
Colonia Caroya, Córdoba (Argentina)	2015		18	3,42	0,69	26	3,43	0,694		8,9				Raymond Eder et al., 2018
Berisso (Argentina)	2006 - 2007 <sup>b</sup>	3,3	16 - 20	2,8 - 3,5	0,43 - 0,49	41 - 46	3,3 - 3,6	0,5	< 0,8	8,8 - 11				Voget et al, 2009
	2015 - 2018 <sup>c</sup>	3,3 - 3,7	17,3 - 20,7	2,99 - 3,46	0,62 - 0,8	21,6 - 33	3,0 - 3,54	0,7 - 0,87	0,4 - 1,0	9,3 - 11,9	< 400	26 - 29		este trabajo

<sup>a</sup> índice del año 1989 dio 64 debido a muy baja acidez (0,3 %), lo cual es atípico.

<sup>b</sup> En las microvinificaciones 2006-2007 se verificó la ocurrencia de la fermentación maloláctica (FML) con valores de ácido láctico entre 1,2 y 1,8 g/l.

<sup>c</sup> No hubo FML.

### 3.5 Referencias.

Abonna. E., Sarandón, S., & Marasas, M. (2007). Los viñateros de Berisso y el manejo ecológico de los nutrientes. LEISA. *Revista de Agroecología*, marzo, 13-15.

Amarilla, B.C. & Conti, A.L. (2008). Plan de manejo y gestión patrimonial sector urbano comprendido por la calle Nueva York y la avenida Montevideo entre calles Nueva York y 11, Berisso fase 1. Análisis y diagnóstico de la situación actual. Recuperado de [https://digital.cic.gba.gob.ar/bitstream/handle/11746/733/11746\\_733.pdf?sequence=3&isAllowed=y](https://digital.cic.gba.gob.ar/bitstream/handle/11746/733/11746_733.pdf?sequence=3&isAllowed=y).

Amerine, M.A., & Winkler, A.J. (1944). Composition and quality of musts and wines of California grapes. *Hilgard*, 15(6), 493–673.

Amoros, J. (2017). El suelo y su influencia en el cultivo de la vid. *Agricultura*, 1003, 114-119.

Aleixandre, J.L., Giner, J.F., & Aleixandre–Tudó, J.L. (2013). Evaluación del efecto terroir sobre la calidad de la uva y el vino (I). *Enovicultura* 20 (enero/febrero).

Alexandre, H., Costello, P.J., Remize, F., Guzzo, J., & Guilloux-Benatier, M. (2004). *Saccharomyces cerevisiae*–*Oenococcus oeni* interactions in wine: current knowledge and perspectives. *International Journal of Food Microbiology*, 93, 141-154.

Alexandre, H. (2020). Wine yeast terroir: separating the wheat from the chaff—for an open debate. *Microorganisms*, 8(5), 787.

Aliquó, G., Catania, A. & Aguado, G. (2010). La poda de la vid. INTA. Recuperado de [https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-1\\_\\_la\\_poda\\_de\\_la\\_vid.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-1__la_poda_de_la_vid.pdf).

Arcanjo, N. M. D. O.; Neri-Numa, I. A., Bezerra, T. K. A., Silva, F. L. H. D., Pastore, G. M. & Madruga, M. S. (2017). Quality evaluation of red wines produced from the Isabella and Ives cultivar (*Vitis labrusca*): physicochemical parameters, phenolic composition and antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 37, 184-192.

Barnes, A. (2019, April 17). The history of Malbec: French origins with new roots in Argentina. South American Wine Guide. Recuperado de <https://southamericawineguide.com/history-of-malbec-world-day-17-april/>.

Bavaresco L., Pezzutto S., Gatti M., & Fregoni M. (19–23 may 2008). Relationships between the Fregoni bioclimatic index (IF) and wine quality. VIIème Congrès International des Terroirs Viticoles, Nyon, Swiss. 134–141.

Bely, M., Sablayrolles, J. M., & Barre, P. (1990). Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 70(4), 246-252.

Blouin, J. & Guimberteau, G. (Eds.). (2012). Maduración y madurez de la uva. Mundi-Prensa.

Bokulich, N. A., Collins, T. S., Masarweh, C., Allen, G., Heymann, H., Ebeler, S. E. & 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.

Camargo, U. A. (2004). 'Isabel Precoce': alternativa para a vitivinicultura brasileira.

Cardona, J. H., Osorio, D. D., & Navarro, Y. T. (2010). Potencial fenólico de la variedad Isabella (*Vitis labrusca* L.) producida en Villa del Rosario Norte de Santander-Colombia. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 8(1).

Carrier, G., Le Cunff, L., Dereeper, A., Legrand, D., Sabot, F., Bouchez, O., & This, P. (2012). Transposable elements are a major cause of somatic polymorphism in *Vitis vinifera* L. *PloS one*, 7(3), e32973.

Catania, C. & Avagnina, S. (2007). Curso Superior de Degustación de Vinos. EEAMendoza.INTA. Recuperado de [https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-29\\_\\_el\\_analisis\\_sensorial.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-29__el_analisis_sensorial.pdf).

Catania, C.D., Avagnina del Monte, S., Uliarte, E.M., del Monte, R.F. & Tonietto, J. (2007). El clima vitícola de las regiones productoras de uvas para vinos de Argentina. En A. Tonietto., & A. Sotéz (Eds.) *CARACTERIZAÇÃO CLIMÁTICA DE REGIÕES VITIVÍNICOLAS IBERO-AMERICANAS*. Embrapa Uva e Vinho.

Cavagnaro, M., Canziani, P., Portela, J. y Robledo, W. (noviembre, 2014). Evolución de tres índices bioclimáticos para la vid en San Martín y Luján de Cuyo (Mendoza, Argentina), 37th World Congress of Vine and Wine and 12th General Assembly of the OIV.

Chevet, J. M., Lecocq, S. & Visser, M. (2011). Climate, grapevine phenology, wine production, and prices: Pauillac (1800–2009). *American Economic Review*, 101(3), 142-146.

Climate-data.org. Berisso Clima (Argentina). Recuperado de <https://es.climate-data.org/america-del-sur/argentina/buenos-aires/berisso-1941/>.

Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Dias, A.C.P., Tavares, R.M.; Sousa, M.J., et al. (2007). Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food 1*, 1-22.

Cordente, A. G., Curtin, C. D., Varela, C., & Pretorius, I. S. (2012). Flavour-active wine yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96, 601-618.

Cooperativa de Provisión y Comercialización de la Costa de Berisso. (2009). Pliego de condiciones de vino de la Costa de Berisso de calidad garantizada y vino espumoso de la costa de Berisso de calidad garantizada. Titular Cooperativa de Provisión y Comercialización de la Costa de Berisso, limitada. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales,-UNLP, Facultad de Ciencias Exactas-UNLP, CINDEFI (CONICET-UNLP), Municipalidad de Berisso. Enólogo-Fruticultor Héctor Becerra.

Cynkar, W.V., Cozzolino, D., Damberg, R.G., Janik, L. & Gishen, M. (2004). The effects of homogenisation method and freezing on the determination of quality parameters in red grape berries of *Vitis vinifera*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10(3), 236-242.

Czepak, M.P.; Costa, A., Pereira, G.L., de Souza, R.T., Goncalves, L.C. & Schmidt, E. M. (2016). Physicochemical characterization of wines obtained of cultivar Isabel (hybrid of *Vitis vinifera* × *Vitis labrusca*) from different Brazilian states. *BIO Web of Conferences* 7, 02020 39th World Congress of Vine and Wine.

Dai, Z. W., Ollat, N., Gomès, E., Decroocq, S., Tandonnet, J. P., Bordenave, L. & Delrot, S. (2011). Ecophysiological, genetic, and molecular causes of variation in grape berry weight and composition: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 62(4), 413-425.

Davis, C.R., Wibowo, D., Eschenbruch, R., Lee, T.H., & Fleet, G.H. (1985). Practical implications of malolactic fermentation: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36, 290-301.

Deloire, A., Vaudour, E., Carey, V. A., Bonnardot, V., & Van Leeuwen, C. (2005). Grapevine responses to terroir: a global approach. *Oeno One*, 39(4), 149-162.

Di Giacomo, D. (2015, marzo 23). La historia del Malbec argentino. De Vinos & Vides. Recuperado de <https://www.devinosyvides.com.ar/nota/396-la-historia-del-malbec-argentino>.

Fernandez-Cano, L.H. & Togores, J.H. (Eds.). (2011). Tratado de Viticultura. 4ta ed., vol I. Mundi-Prensa.

Ferrer, M., Pedocchi, R., Michelazzo, M., González Neves, G., & Carbonneau, A. (2007). Delimitación y descripción de regiones vitícolas del Uruguay en base al método



de clasificación climática multicriterio utilizando índices bioclimáticos adaptados a las condiciones del cultivo., *Agrociencia*, Vol XI (1), 47-56.

Flamini, R. & Tomasi, D. (2000). The anthocyanin content in berries of the hybrid grape cultivars Clinton and Isabella. *Vitis*, 39(2), 79-81

Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1-2), 11-22.

Flanzy, C. (2000). Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos. Mundi-Prensa.

Ford-Kapoor (2010). Grape analysis in wine making. In: C. E. Butzke, (Ed.). *Wine making problems solved* (pp. 1-14). Woodhead Publishing Limited.

Fregoni, M. (1973). Ecología e viticultura: adattamento degli obiettivi della produzione all'ambiente naturale. *Frutticoltura*, XXXV (12), 9-25.

Gaiotti, F., Pastore, C., Filippetti, I., Lovat, L., Belfiore, N., & Tomasi, D. (2018). Low night temperature at veraison enhances the accumulation of anthocyanins in Corvina grapes (*Vitis vinifera* L.). *Scientific reports*, 8(1), 8719.

García-Lomillo, J. & González-San José, M.L. (2017). Applications of wine pomace in the food industry: approaches and functions. *Comprehensive Review in Food Science and Safety*, 16, 3-22.

García, S., Santesteban, L.G., Miranda, C. & Royo, J.B. (2011). Variety and storage time affect the compositional changes that occur in grape samples after frozen storage. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 17(2), 162-168.

Gawel, R., Francis, L., & Waters, E.J. (2007). Statistical correlations between the in-mouth textural characteristics and the chemical composition of Shiraz wines. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55(7), 2683–2687.

Gez, M. I., Mercado, L., Poetta, S., Alberto, M., González, G., Nazralla, J. & López, M. (2009). Caracterización de uvas para vinificar en diferentes regiones de Mendoza (Argentina). *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 41(1), 165-175.

Gill Giese, W. (2008). Wine grape quality: when is it time to pick ?. In Wolf, T.K (ed.) *Wine Grape Production Guide for Eastern North America* (pp.282-294). Plant and Life Sciences Publishing.

Gil, G. F. & Pszczółkowski, P. (2015). Viticultura: Fundamentos para optimizar producción y calidad. Segunda edición ampliada y actualizada. Ediciones UC.

Gobert, A.; Tourdot-Maréchal, R.; Sparrow, C.; Morge, C. & Alexandre, H. (2019). Influence of nitrogen status in wine alcoholic fermentation. *Food Microbiology*, 83, 71-85. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.04.008>.

Gump, B.H., Zoecklein, B.W., Fugelsang, K.C., & Whiton, R.S. (2002). Comparison of analytical methods for prediction of prefermentation nutritional status of grape juice. *American Journal of Enology and Viticultura*, 53, 325-329.

Hernandez, J.D., Trujillo, Y.Y., & Durán, S.D. (2011). Contenido fenólico e identificación de levaduras de importancia vínica de la uva Isabella (*Vitis labrusca*) procedente de Villa del Rosario (norte de Santander) *Vitae*, 18(1), 17-25.

Hodson, G., Wilkes, E., Azevedo, S., & Battaglione, T. (2017). Methanol in wine. BIO Web of Conferences 9, 02028 (2017), 40th World Congress of Vine and Wine. DOI: 10.1051/bioconf/20170902028.

Huglin, P. (Ed.). (1986). *Biologie et écologie de la vigne*. Payot-Technique & Documentation.

Iland, P., Ewart, A., Sitters, J., Markides, A. and Bruer, N. (Eds.). (2000). *Techniques for chemical analysis and quality monitoring during winemaking*. Patrick Iland Wine Promotions.

INV. (2006). Determination by HPLC of nine main anthocyanins in red and rosé wines. Instituto Nacional de Vitivinicultura. Res. 23/2006.

INV. (2018). Límites y tolerancias analíticas. Recuperado de [https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/determinaciones\\_analiticas\\_metodos\\_limite\\_y\\_tolerancias\\_-\\_pag.\\_web.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/determinaciones_analiticas_metodos_limite_y_tolerancias_-_pag._web.pdf).

Jackson, R. S. (Ed.). (2014). *Wine Science. Principles and applications*. 4<sup>th</sup> ed. Academic Press.

Jackson, R. S. (2017). Nature and origin of wine quality. In: R.S., Jackson (Ed.), *Wine testing: A professional textbook*, (pp 337-370). Academic Press.

Jones, G.V., Reid, R., & Vilks; A. (2012). Climate, grapes, and wine: structure and suitability in a variable and changing climate. In: P, Dougherty (Ed.) *The Geography of Wine: Regions, Terrior, and Techniques* (pp 109-133). Springer Press.

Kang, S. B., Lee, I. B., Jang, H. I., Park, J. M., & Moon, D. K. (2008). Effect of long term waterlogging on the growth and nutrient contents of 'Campbell Early' and 'Kyoho' grapevine cultivars. *Korean Journal of Environmental Agriculture*, 27(2), 178-184.

Keller, M. (2010). Managing grapevines to optimise fruit development in a challenging environment: a climate change primer for viticulturists. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16, 56-69.

Koyama, R., de Assis, A. M., Yamamoto, L. Y., Borges, W. F., de Sá Borges, R., Prudêncio, S. H., & Roberto, S. R. (2014). Exogenous abscisic acid increases the

anthocyanin concentration of berry and juice from 'Isabel' grapes (*Vitis labrusca* L.). *HortScience*, 49(4), 460-464.

Kurt-Celebi, A., Colak, N., Hayirlioglu-Ayaz, S., Kostadinović Veličkowska, S., Ilijeva, F.; Esatbeyoglu, T. & Ayaz, F. A. (2020). Accumulation of phenolic compounds and antioxidant capacity during berry development in black "Isabel" grape (*Vitis vinifera* L. x *Vitis labrusca* L.). *Molecules*, 25(17), 3845.

Lee, C.Y., Robinson, W.B., Van Buren, J.P., Acree, T.E., & Stoewsand, G.S. (1975). Methanol in wines in relation to processing and variety. *American Journal of Enology and viticulture*, 26(4),184-187.

Lee, J., Reenaker, C., & Wrolstad, R.E. (2008). Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*, 110, 782-786.

Lobato, M. L & Nanini, J. (2015). Producción de uvas orientada a la elaboración de vinos de alta gama en Colonia Caroya-Córdoba. UNCórdoba.

Malheiro, A. C., Campos, R., Fraga, H., Eiras-Dias, J., Silvestre, J., & Santos, J. A. (2013). Winegrape phenology and temperature relationships in the Lisbon wine region, Portugal. *Oeno One*, 47(4), 287-299.

Mariani, J.A., Nava, J.A., & Paulus, D. (2019). Phenology and thermal requirements of grapevine cultivars in Dois Vizinhos, Paraná State, Brazil. *Ciência Rural*, 49(9), 1-8.

Meléndez, E., Ortiz, M.C., Sarabia, L. A., Íñiguez, M. & Puras, P. (2013). Modelling phenolic and technological maturities of grapes by means of the multivariate relation between organoleptic and physicochemical properties, *Analytica Chimica Acta*, 76(1), 53-61.

Miele, A. (may, 2016) Grapevine yield components and composition of Isabel grape produced according to the organic and conventional systems. 39th World Congress of Vine and Wine. doi:10.1051/bioconf/20160701011.

Narduzzi, L., Stanstrup, J., & Mattivi, F. (2015). Comparing wild american grapes with *Vitis vinifera*: A metabolomics study of grape composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(30), 6823–6834.

Nunes, N.A.S., Leite, A.V. & Castro, C.C. (2016). Phenology, reproductive biology and growing degree days of the grapevine 'Isabel' (*Vitis labrusca*, Vitaceae) cultivated in northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 76,(04), 975-982.

OIV. (n.d). Compendium of International Methods of Analysis of Wines and Musts.

OIV. (2012). Guidelines for vitiviniculture zoning methodologies on a soil and climate level. Res. OIV-VITI 423-2012 REV1.

Pandolfi, C. & Cuello, I. (2005). Reseña de la vitivinicultura argentina. *ACENOLOGÍA*. 53,1-7.

Peel, M.C., Finlayson, B.L., & McMahon, T.A. (2007). Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrology and earth system sciences discussions*, European Geosciences Union, 11, 1633-1644. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00305098/document>.

Peruzzo, S. N., Marchi, V. V., Santos, H.P., Fialho, F.B., & Souza, D.A. (2014). Necessidade de horas de frio para superação da endodormência em cultivares *Vitis labrusca* L. Recuperado de <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/112465/1/Santos-Fialho-Necessidades-de-horas-de-frio.pdf>.

Pierini, P.J., & Ganganelli, I. (2017). Evaluación de diferentes formas de conducción del viñedo en la zona costera del Río de La Plata (tesina de licenciatura). Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata. Recuperado de [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/60116/Documento\\_completo.pdf?sequence=3&isAllowed=y](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/60116/Documento_completo.pdf?sequence=3&isAllowed=y).

Raymond Eder, M. L.; Conti, F. & Rosa, A. L. (2018). Differences between indigenous yeast populations in spontaneously fermenting musts from *V. vinifera* L. and *V. labrusca* L. Grapes harvested in the same geographic location. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1320.

Revilla, E., Ryan, J.M., & Ortega, J.M. (1998). Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grapes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46(11), 4592–4597.

Reynolds, A.G. (2010). Viticultural and vineyard management practices and their effects on grape and wine quality. In A.G. Reynolds (ed.) *Managing wine quality*. Woodhead Publishing Limited.

Rice, A. C. (1974). Chemistry of winemaking from native American grape varieties.

Riou, C., Pieri, P., & Le Clech, B. (1994). Water use of grapevines well supplied with water. Simplified expression of transpiration. *Vitis*, 33,109–115.

Rizzon, L.A., Miele, A., & Meneguzzo, J. (2000). Avaliação da uva cv. Isabel para a elaboração de vinho tinto. *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas*, 20(1), 115-121

Roberto, S.R., Sato, A.J., Brenner, E.A., Santos, C.E., & Genta, W. (2004). Fenología e soma térmica (graus-días) para a videira 'Isabel' (*Vitis labrusca*) cultivada no Noroeste do Paraná. *Ciências Agrárias*, 25, 273-280.

Romero-Cascales, I., Ortega-Regules, A., López-Roca, J. M., Fernández-Fernández, J. I., & Gómez-Plaza, E. (2005). Differences in anthocyanin extractability from grapes to wines according to variety. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56(3), 212-219.

Sisterna, M., Ronco, L., Voget, C., Marasas, M., Abbona, E., Romero, M., Daniele, J., Artaza, S., Otero, J., Sepúlveda, C., Avila, G., Loviso, C., Orozco, E., Bonicatto, M., Condes, C., & Velarde, I. (2010). American Grapevine Culture and Research in Berisso, Argentina. *The Americas Journal of Plant Science and Biotechnology*, 3 (Special Issue 1), 38-53.

Soto, K. (2014, march 5). Learn the Difference: Argentinian Malbec vs. French Malbec. <https://winefolly.com/tips/mendoza-malbec-vs-cahors-malbec/>.

Sozzi, G.O., Gariglio, N.F., & Figueroa de Orell, M.I. (2007). Dormición en árboles frutales de hojas caducas. En: G. O, Sozzi (Ed.). *Árboles frutales: Ecofisiología, cultivo y aprovechamiento*, (pp 85-106). Buenos Aires: Facultad de Agronomía-Universidad de Buenos Aires.

Stevens, R. M. & Prior, L. D. (1994). The effect of transient waterlogging on the growth, leaf gas exchange, and mineral composition of potted sultana grapevines. *American journal of enology and viticulture*, 45(3), 285-290.

Tariba, B. (2011). Metals in wine—impact on wine quality and health outcomes. *Biological Trace Element Research*, 144, 143-156.

Tesniere, C. & Flanzky, C. (2011). Carbonic maceration wines: characteristics and winemaking process. *Advances in Food and Nutrition Research*, 63, 1-15.

Tonietto, J. & Carbonneau, A. (2004). A multicriteria climatic classification system for grape-growing regions worldwide. *Agricultural and Forest Meteorology*, 124(1-2), 81-97.

Tonietto, J.; Sotés Ruis, V. & Gómez-Miguel, V.D.(Eds.). (2012). *Clima, zonificación y tipicidad del vino en regiones vitivinícolas iberoamericanas*. Madrid: CYTED. Recuperado de [http://oa.upm.es/13203/1/Zonificacion\\_viticola\\_Iberoamerica\\_CYTED.pdf](http://oa.upm.es/13203/1/Zonificacion_viticola_Iberoamerica_CYTED.pdf).

Trelfall, R., Main, G. & Morris, J. (2008). Effect of freezing grape berries and heating must samples on extraction of components and composition parameters of red wine grape varieties. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12(2), 161-169.

Van Leeuwen, C. & Seguin, G. (2006). The concept of terroir in viticulture. *Journal of Wine Research*, 17(1), 1-10.

Van Leeuwen, C. & Darriet, P. (2016). The impact of climate change on viticulture and wine quality. *Journal of Wine Economics*, 11(1), 150-167.

Van Leeuwen, C., Roby, J. P., & De Resseguier, L. (2018). Soil-related terroir factors: A review. *Oeno one*, 52(2), 173-188.

Voget, C., Orosco, E., Loviso., C., Condes, C., Sepúlveda, C., Ávila, G. & Velarde, I. (octubre, 2009). Vinificación de *Vitis labrusca* (syn. *V. labruscana* Bailey, Fox grape) variedad Isabella: el vino de la costa de Berisso. XII Congreso CYTAL-AATA. Concordia. Argentina.

Yuste, J. (2013). Característica y operaciones en el viñedo: manejo orientado a la calidad de la uva. ACENOLOGÍA. Recuperado de [https://www.acenologia.com/operaciones\\_vinedo\\_calidad\\_cienc0813/](https://www.acenologia.com/operaciones_vinedo_calidad_cienc0813/).

Zamora, F. (2009). Biochemistry of alcoholic fermentation. *Wine chemistry and biochemistry*, 3-26.

**Capítulo 4.**  
**Las levaduras del Vino de la Costa de**  
**Berisso.**

## 4.1. Introducción.

### 4.1.1. Microorganismos en la vinificación.

La conversión del mosto de uva en vino es un proceso bioquímico complejo en el cual intervienen diversas especies de levaduras y bacterias (Bisson & Walker, 2015). Las levaduras fermentativas, por sus características fisiológicas y bioquímicas, son las principales responsables de la fermentación alcohólica. Su fuente natural es el hollejo de las bayas (Suarez-Lepe & Leal, 2004), lugar al que son llevadas junto a otros microorganismos principalmente por el viento, los insectos y los pájaros (Mortimer & Posinelli, 1999; Barata et al., 2012). La microbiota presente en los diferentes tejidos de la baya, en la planta de vid (hojas, corteza) y en el suelo del viñedo se ha denominado el “terroir” microbiano (Gilbert et al., 2014; Belda et al., 2017). Estudios recientes han mostrado que la comunidad microbiana de la baya comprende cerca de 40 géneros, 100 especies de levaduras y hongos del filo Basidiomycota y Ascomycota, y más de 10 géneros de bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluyendo enterobacterias (Bisson et al., 2017; Wang et al., 2017). Se considera a la baya un hábitat inestable cuya microbiota varía en función de numerosos factores extrínsecos e intrínsecos, como son la geografía, el cultivar de vid, las condiciones climáticas, la madurez de las bayas, el daño físico debido a las aves, el ataque de insectos y mohos, la aplicación de agroquímicos, etc. (Parisch & Carrol, 1985; Fleet et al., 2002; Barata et al., 2012; Setati et al., 2012; Bokulich et al., 2014; Mezzasalma et al., 2018). Cuando las uvas se estrujan y se encuban para preparar el mosto, el ambiente cambia radicalmente, la alta acidez, la alta concentración de azúcar, la ausencia de oxígeno y el agregado de barreras químicas como el SO<sub>2</sub> inhiben gran parte de la flora microbiana y la mayoría de las especies microbianas presentes en las uvas no pueden proliferar durante la fermentación alcohólica. A medida que avanza la fermentación, la presencia creciente de etanol genera un ambiente aún más selectivo para muchas especies de levaduras y bacterias.

Las levaduras de las uvas que pueden adaptarse al mosto y llevar a cabo la fermentación del vino en sus distintas etapas, son las denominadas levaduras vínicas (Suarez-Lepe & Iñigo-Leal, 2004). Estas levaduras, junto a las presentes en la bodega, son las responsables de la fermentación espontánea del vino (Ciani et al., 2004; Mercado et al., 2007). Los géneros más abundantes de levaduras vínicas encontradas en las uvas son las apiculadas *Kloeckera* y *Hanseniaspora* (su anamorfo sexual), *Candida*, *Starmerella*, *Metschnikowia* y *Pichia*. *Hanseniospora uvarum* / *Kloeckera apiculata* puede representar entre el 50 y 75% de la población total de levadura



presente en la baya (Pretorius et al.1999; Beltran et al, 2002; Clemente Jimenez et al., 2004; Barata et al., 2012). Hay casos específicos donde puede ser importante la presencia de una especie diferente, como *Saccharomyces ludwigii* (Combina et al., 2005). En cambio, *Saccharomyces cerevisiae*, la principal especie de la fermentación alcohólica, es aislada con extrema dificultad y en bajo porcentaje de hábitats naturales. Sin embargo, Mortimer & Polsinelli (1999), encontraron que una de cada cuatro bayas dañadas alberga *S. cerevisiae*, por lo tanto, la presencia de esta especie (u otra especie de *Saccharomyces*) va a depender de la integridad de la baya al momento de la vendimia. Se ha estimado que las levaduras vínicas en la baya se encuentran en el orden de  $10^3$ - $10^5$  UFC/ml (Romano et al., 2006).

Dada la predominancia de levaduras fermentativas no-*Saccharomyces* en las bayas, es esperable que las mismas aparezcan al principio de la fermentación espontánea. Sin embargo, la baja tolerancia al etanol de las levaduras no-*Saccharomyces*, y por ende su incapacidad para fermentar todos los azúcares presentes en los mostos (que habitualmente contienen una concentración inicial de azúcar fermentable entre 200 y 250 g/l), es la razón principal por la cual en la mayoría de los casos *S. cerevisiae* termina dominando el vino en el final de la fermentación (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Por este motivo, se ha considerado al proceso de vinificación como un cultivo de enriquecimiento de *Saccharomyces*. De todas maneras, algunos estudios han mostrado que algunas especies no-*Saccharomyces* pueden sobrevivir más tiempo de lo que se creía inicialmente, pudiendo alcanzar poblaciones máximas de  $10^6$ - $10^7$  ufc/ml (Ribereau-Gayon et al., 2006; Suarez-Lepe & Iñigo-Leal, 2004). Este crecimiento es cuantitativamente significativo y seguramente tiene influencia en la composición organoléptica del vino, en la cinética de la fermentación y en el comportamiento bioquímico de *S. cerevisiae* (Jolly et al., 2006; Zott et al., 2008; Manzanares et al., 2011; Wang et al., 2016).

Además de las levaduras, es importante considerar el impacto de otros microorganismos en la vinificación, como es el caso de las bacterias lácticas (BAL). La fermentación maloláctica llevada a cabo por *Oenococcus oeni* es de particular interés en la fermentación de las uvas tintas. Esta fermentación contribuye positivamente a la estabilización del vino tinto y a su complejidad sensorial (Swiegers et al., 2005; Bartowski et al., 2015). ). En general, el crecimiento de las BAL se inhibe a pH < 3,6 y con concentraciones de SO<sub>2</sub> de ~50-60 mg/l.

Si las condiciones del proceso de vinificación son adecuadas, la fermentación ocurrirá en un tiempo razonable y el resultado final será un vino que reúne las

propiedades sensoriales esperadas para la variedad de vid utilizada. No obstante, bajo ciertas circunstancias, los vinos pueden ser alterados por factores fisicoquímicos y/o microbiológicos. En el primer caso se denominan quiebras, y en el segundo caso, enfermedades. En ambos casos se producen cambios en el olor, el sabor, el aspecto y en la composición química del vino (Bartowsky & Pretorius, 2009). En situaciones graves, estas alteraciones pueden hacer que el vino no sea apto para el consumo. Algunas alteraciones producidas por bacterias lácticas o levaduras son: turbidez por refermentación, formación de velo, producción de fenoles volátiles, acetificación y amargor (Ribéreau-Gayon et al., 2006; Fugelsang & Edwards 2007; Bartowsky, 2009). Las causas que originan el desarrollo de estos MO indeseables, y por ende enfermedades, son diversas: el estado fitosanitario de los frutos, las condiciones higiénicas y sanitarias de la bodega, un incorrecto manejo de la vinificación, entre otras. Algunos defectos pueden detectarse a simple vista y otros requieren un análisis microscópico o bien una evaluación gustativa. Para que se manifieste uno u otro tipo de enfermedad es necesario que prevalezcan las condiciones apropiadas para el desarrollo de los microorganismos que la producen. Conociendo la causa del defecto se pueden arbitrar estrategias para corregirlo, pero lo más importante es la prevención (Mojsov et al., 2011; Böhme et al., 2019).

Un aspecto clave en la investigación de los microorganismos de las uvas y el vino es la metodología empleada para su identificación. Los métodos basados en el crecimiento de colonias en medios específicos consideran únicamente aquellos MO que son viables y que pueden crecer fuera de la matriz vino. Básicamente se emplean dos estrategias: una de ellas es tomar colonias al azar de medios donde las colonias no son fácilmente discernibles por morfología, y la otra consiste en utilizar medios como WL (Wallerstein Laboratory) donde las colonias se pueden seleccionar por su morfotipo, es decir color, forma, borde, textura (Cavazza et al., 1992; Pallman et al., 2001). Ambas estrategias han sido ampliamente utilizadas en la investigación. También se emplean medios selectivos como el agar lisina, que permite el crecimiento de las levaduras no *Saccharomyces*, pero no de las especies *Saccharomyces*, ya que estas últimas no pueden utilizar lisina como única fuente de nitrógeno (Fowell, 1965). Los métodos culturales tienen sus limitaciones, ya que las especies más probables de ser aisladas son aquellas que se encuentran en mayor proporción dentro de la población global (Bisson & Walker, 2015). La utilización de métodos moleculares que no requieren el cultivo de microorganismos, como la secuenciación masiva, han permitido obtener un conocimiento más detallado de los microorganismos presentes

en las bayas de uva y en el vino (Wang, et al, 2017; Morgan, et al., 2017). No obstante, el aislamiento e identificación de los microorganismos cultivables es la base para el aislamiento de cepas de interés para futuras aplicaciones.

El objetivo del presente capítulo fue aislar, identificar y caracterizar las levaduras cultivables involucradas en la fermentación espontánea de la uva Isabella durante las temporadas v15, v16 y v17. Tal como se mencionó en el capítulo 3, la fermentación se llevó a cabo con uvas traídas directamente desde el viñedo, sin contacto con elementos de la bodega, y minimizando la contaminación ambiental, por lo que se asumió que las levaduras fermentativas provinieron de la propia baya y son representativas del viñedo. Dado que la enfermedad del velo es un problema persistente en el vino de la Costa de Berisso, se tuvo especial interés en identificar levaduras formadoras de velo. Los resultados obtenidos son importantes para conocer los recursos nativos de levaduras y diseñar nuevas estrategias para mejorar el control de la vinificación y la calidad del vino de la Costa de Berisso.

## 4.2. Materiales y métodos.

### 4.2.1. Reactivos y soluciones.

D(+) Maltosa monohidrato, ácido poligalacturónico (APG; sal sódica, 90% de ácido poligalacturónico anhidro), glucosa (ACS) y cloranfenicol (> 98%) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (MO, United States). El agar y la bactopectona fueron obtenidos de Difco Laboratories Inc (Mi, United States). El extracto de levadura, extracto de malta, triptona y Agar Lisina de Oxoid (Hampshire, UK). Las enzimas *HaeIII*, *ScrFI* (Bme 13901) y *HpaII* fueron provistas por Thermofisher.

### 4.2.2. Medios de cultivo.

#### 4.2.2.1. Agar GPY. (Van der Walt & Yarrow, 1984)

Medio GPY	
Componente	g/l
Glucosa	40
Extracto de levadura	5
BactoPeptona	5
Agar	20
pH 5,5	

#### 4.2.2.2. Medio WL. (*Walerstein Laboratory*) (Pallman et al., 2001)

Medio WL	
Componente	(g/l)
Glucosa	50
Triptona	5
Extracto de levadura	4
KPO <sub>4</sub> H <sub>2</sub>	0,55
MgSO <sub>4</sub>	0,425
CaCl <sub>2</sub>	0,125
FeCl <sub>3</sub>	0,003
MnSO <sub>4</sub>	0,003
Verde de Bromocresol	0,022
Agar	20
Cloranfenicol	0,05
pH 5,5	

El medio se ajustó a pH 5.5, se adicionó cloranfenicol en concentración final 50 mg/l para inhibir bacterias y se autoclavó 15 min a 121 °C. El cloranfenicol se preparó concentrado (500 x) en etanol. El medio es de color verde y vira al amarillo a pH ácido (<3,8) o al azul intenso si alcaliniza (>5,4).

#### 4.2.2.3 Agar Lisina. (Fowell, 1965)

El medio se preparó según las indicaciones del producto comercial (Oxoid).

#### 4.2.3. Materia prima y fermentación.

Las características de las uvas v15, v16, v17 y v18 y el proceso de fermentación se describieron en el capítulo 3. Las uvas v18 se conservaron a -20 °C y se utilizaron para los ensayos de fermentación de cepas.

#### 4.2.4. Muestreo de la fermentación y aislamiento de levaduras.

La evolución de las fermentaciones se siguió midiendo los grados Brix (°Bx) y mediante observación microscópica. Los °Bx, en este caso, no se corrigieron por la

presencia de alcohol (Cojocarú & Antoce, 2012). El muestreo se realizó de las diferentes réplicas (R1, R2, R3) y a distintos tiempos de fermentación: final de la fase de latencia (~2 días), etapa de fermentación tumultuosa (4 - 5 días) y final de la fermentación (6 - 8 días, descube). En el caso de v15, la fermentación tuvo una parada transitoria a los 7 días, por lo cual se tomó una muestra adicional en el primer trasiego, efectuado 15 días después del descube. La toma de muestra se realizó luego del bazuqueo; para ello, se recolectaron 5 muestras independientes de 10 ml de vino y se colocaron en un tubo falcon estéril de 50 ml. Para el recuento viable de levaduras cultivables se tomaron 10 ml del tubo, se diluyeron en 90 ml de solución de triptona (0,1%) y se agitó en shaker a 200 rpm y 30°C durante 10 min. De dicha dilución se efectuaron diluciones seriadas 1/10 en el mismo diluyente, para sembrar 0,1 ml en la superficie de medio WL. Las diluciones a sembrar se calcularon en base al recuento previo en cámara de Neubauer. Las placas se incubaron a 30°C entre 48 y 72 hs para la observación de las colonias. El aislamiento y recuento viable de levaduras en las bayas se efectuó siguiendo el procedimiento de Renouf et al., (2005), empleando medio WL con 100 mg/l de cloranfenicol y 2 mg/l de dicloran. Por su parte, el resto de la muestra de vino (40 ml), se centrifugó a 5000 g x 20 min a 5°C, el sobrenadante se fraccionó y congeló a -20°C, para el posterior análisis de identificación y cuantificación de compuestos por HPLC.

#### **4.2.5. Selección de colonias, purificación y conservación de cepas.**

El estudio sobre las levaduras que fermentan la uva Isabella estuvo dirigido a identificar las levaduras cultivables, es decir, aquellas que pueden crecer y reproducirse en medios de cultivo, en este caso el medio WL. Para tal fin se emplearon un conjunto de criterios y técnicas recomendadas en microbiología enológica (OIV/OENO 206-2010). Así, en una primera instancia, se utilizó el medio WL para diferenciar y seleccionar colonias en base al morfotipo, es decir, considerando las características de su color, tamaño, forma y textura (Cavazza et al., 1992; Pallmann et al, 2001) El reconocimiento de los morfotipos se realizó entre las 48 y 72hs (OIV/OENO 206/2010) en placas que contenían entre 30 y 300 colonias, y en los casos de morfotipos raros se analizó hasta una dilución 1/100 menor. Los aislamientos se purificaron mediante dos o tres pasajes en el medio WL. Luego, a partir de colonias aisladas y puras se realizó un último estriado en medio GPY para eliminar de las células el verde de bromocresol del medio WL. Las cepas obtenidas se analizaron mediante el test de lisina y se conservaron en glicerol al 20% a -80 °C.

#### **4.2.6. Identificación de las cepas.**

La identificación de las levaduras cultivables se basó en la siguiente secuencia: selección de colonias en agar WL, discriminación de levaduras no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces* según crecimiento en agar lisina, observación microscópica de la cepa purificada, tamaño del fragmento obtenido mediante PCR de la región ITS1-5.8S-ITS2 y finalmente identificación a nivel de especie mediante secuenciación del dominio D1/D2 del gen ADNr 26S. De las levaduras no-*Saccharomyces* se analizaron entre uno y dos morfotipos por réplica en cada una de las muestras tomadas del mosto/vino; por ejemplo, en v15 se tomaron muestras a los 2, 5 y 8 días, lo cual implica entre 9 y 18 colonias seleccionadas de cada morfotipo, si es que estaba presente. Para el caso particular de *Saccharomyces* se seleccionaron entre 10 y 20 colonias de cada réplica en la etapa del descube o primer trasiego (únicamente v15). La purificación, conservación, test de lisina y la amplificación del ITS-5.8S de los aislamientos en WL se realizó cada año, mientras que la identificación final por secuenciación y los estudios de fermentación se llevaron a cabo en 2018 y 2019.

#### **4.2.7. Pruebas bioquímicas, test de velo y ensayos de fermentación.**

##### **4.2.7.1. Reactivación de las cepas y preparación de inóculo.**

Las cepas conservadas a -80°C en glicerol 20% se repicaron en medio GPY sólido. Luego de una incubación de 48-72 hs a 30°C se tomó un loop y se sembró el medio inóculo que consistió en mosto v18 diluido al 40%. El mosto se preparó a partir de uvas congeladas v18, tal como se describió en el capítulo 3 pero en este caso el mosto se clarificó centrifugando el filtrado a 5000 g x 15 minutos (rendimiento aproximado 625 ml sobrenadante/kg uva). El mosto clarificado se diluyó al 40% con agua deionizada y se distribuyó (10 ml) en frascos de antibióticos de 50 ml con tapón de algodón, luego de lo cual se esterilizaron 15 min a 121 °C. Los frascos, una vez inoculados con un loop del cultivo en GPY se incubaron en agitación (200 rpm) a 30°C x 24 hs, luego de lo cual se observaron al microscopio para verificar ausencia de contaminaciones, morfología de las levaduras y determinar crecimiento mediante recuento en cámara de Neubauer. En general, los recuentos totales variaron entre  $5 \times 10^7$  y  $5 \times 10^8$  levaduras/ml, según la especie de levadura. Del cultivo en mosto diluido se tomó entre 1,0 y 1,5 ml de medio, se centrifugó, se lavaron las células una vez con agua destilada estéril y el pellet se mantuvo refrigerado hasta la realización de los ensayos (máximo una semana), momento en el cual el pellet se resuspendió con agua destilada estéril para obtener la suspensión de inóculo (SI)

#### **4.2.7.2. Test de agar lisina.**

Para sembrar agar lisina se colocó una colonia del medio GPY correspondiente al último pasaje de la purificación y se dispersó en 1 ml de agua destilada estéril. Las células se lavaron una vez con agua deionizada estéril y se realizó un recuento al microscopio en cámara de Neubauer. Las suspensiones de levaduras se diluyeron hasta un recuento aproximado de  $2 \times 10^4$  levaduras/ml. De dicha dilución se tomaron 5  $\mu$ l (~ 100 células) y se estriaron en medio lisina. El fundamento de este procedimiento es que en el test de lisina no debe sembrarse con demasiado inóculo, ya que las levaduras del género *Saccharomyces* no pueden crecer con lisina como una única fuente de nitrógeno (fundamento del test), pero algunas de ellas pueden crecer a expensas de la fuente de nitrógeno que proviene de la autólisis celular y dar falsos positivos.

#### **4.2.7.3. Test de velo.**

Los ensayos de formación de velo se llevaron a cabo en tubos de ensayo con tapón plástico que contenían 10 ml de mosto pasteurizado. El inóculo se obtuvo siguiendo el mismo procedimiento descrito para los ensayos de fermentación. El ensayo incluyó las especies aisladas de las microvinificaciones y de muestras de botellas almacenadas en la Cooperativa de la Costa. Dado que el vino envasado en la Cooperativa había sido elaborado con uvas cosechadas por diferentes productores, no fue posible asignarle a la muestra un viñedo de origen (lo único certero fue el año de elaboración). Se tomaron muestras de al menos tres botellas elegidas al azar. La botella se descorchó y con un ansa se tomaron muestras del velo para hacer estriados en medio WL y observación microscópica; luego se procedió a purificar y conservar los aislamientos. Los vinos de los cuales se tomaron las muestras de velo fueron analizados fisicoquímicamente en el CINDEFI siguiendo los protocolos establecidos por el INV.

#### **4.2.7.4. Fermentación de mosto pasteurizado con cepas no-*Saccharomyces*.**

Los ensayos para caracterizar la fermentación de cepas no-*Saccharomyces* se llevaron a cabo con mosto pasteurizado de Isabella v18. El empleo de mosto v18 permitió evaluar las propiedades fermentativas de las cepas en un mosto de composición que se puede considerar óptimo para la variedad, ya que en esa temporada las uvas alcanzaron su máxima madurez natural y el contenido de

nitrógeno resultó adecuado para que ocurra una fermentación “normal”. Para la fermentación se utilizaron erlenmeyers de 125 ml conteniendo 100 ml de mosto pasteurizado a 63°C x 30 min. Cada erlenmeyer se proveyó con un agitador magnético. Finalmente, los erlenmeyers se cerraron con tapones de goma con salida para gases y se llevaron a una cámara de incubación termostatazada a 28°C, donde se incubaron en forma estática. Como inóculo se empleó 1,0 ml de SI ( $10^7$  células/ml), de manera que la concentración inicial de levaduras fue de  $10^5$  células/ml. La fermentación se siguió por medida de °Brix y recuento en cámara de Neubauer. Para tomar la muestra, se homogenizó suavemente el vino con el agitador magnético sin sacar el tapón, para así evitar la aireación excesiva, y luego se tomaron 200 µl de muestra. Con 100 µl se realizó una dilución 1/10 para hacer el recuento en cámara y con los 100 µl restantes se midieron los °Bx. La fermentación se dio por finalizada tras dos medidas consecutivas de °Bx constantes. Al inicio y final de la fermentación el erlenmeyer se pesó sin tapón en una balanza analítica para calcular la pérdida de peso, a partir de la cual se estimó la producción de CO<sub>2</sub>. Al finalizar la fermentación, los vinos se mantuvieron por 24-48 hs en frío y luego se centrifugaron a 5°C (5000g x 15 min). El sobrenadante se procesó con diferentes protocolos según el análisis a realizar. Para HPLC se procesaron 2 ml de vino centrifugado según se describe en el Anexo I. En la muestra procesada se determinaron glucosa, fructosa, succínico, láctico, acético, glicerol y etanol.

#### **4.2.7.5. Balance de carbono y consistencia de datos.**

A partir de los datos obtenidos de la fermentación se calcularon los rendimientos y se realizó un balance de carbono (C) para determinar la consistencia de los datos. El balance se basó en el concepto de C-mol, que representa la cantidad de un compuesto que contiene 12 g (un mol) de carbono (Roels, 1983). Para transformar g en C-mol se utilizaron las siguientes relaciones: C-mol azúcar: 30 g; C-mol etanol 23 g; C-mol glicerol 30,66 g; C-mol succínico 29,5 g, C-mol acético 30 g; C-mol CO<sub>2</sub> 44 g. Para la biomasa se consideró la composición estándar con 5% cenizas, por lo tanto, se tomó el C-mol biomasa en 25,8 g. Los rendimientos ( $y_i$ ) se expresaron en relación a un C-mol de azúcar fermentado, y por lo tanto, representaron la fracción de C conservado en la biomasa y los diferentes productos de fermentación. No se tomó en cuenta el aporte de C del N asimilable, que en su mayor parte son aminoácidos, debido a que es despreciable respecto del C proveniente del azúcar fermentado. El balance teórico de C debe dar 1,0, pero debido a la variabilidad propia de la



fermentación se tomó como aceptable el rango  $1,0 \pm 0,05$  (Roels, 1983). Valores mayores del rango implican error experimental y valores menores sugieren error experimental o la posible presencia de un compuesto con C no determinado.

#### **4.2.8. Métodos moleculares.**

##### **4.2.8.1. Extracción de ADN.**

###### ***Acondicionamiento de las bolillas de vidrio.***

Para la extracción de ADN se emplearon bolillas de  $\varnothing$  0,5 mm. Las mismas se trataron 1 hora con HNO<sub>3</sub> concentrado y luego se lavaron sucesivamente con agua destilada hasta pH neutro. Posteriormente se dejaron secar en estufa a 60°C, se autoclavaron 15 minutos a 120°C y finalmente se secaron nuevamente en la estufa a 60°C.

###### ***Obtención de biomasa para la extracción de ADN.***

Se procedió tal como se describió en reactivación de las cepas, pero en este caso se tomó una colonia aislada del agar GPY, se suspendió en 1 ml de GPY líquido contenido en un tubo eppendorf de 2 ml, y se incubó con agitación de 180 rpm a 30°C overnight. Los cultivos fueron lavados con agua miliQ estéril para eliminar componentes que pudieran interferir con los pasos subsiguientes. Los pellets obtenidos se emplearon para la posterior extracción de ADN.

###### ***Extracción de ADN.***

El ADN genómico fue extraído según el método de Schena et al., 1999, con algunas modificaciones. Los pellets de levaduras fueron resuspendidos en 300  $\mu$ l de buffer de lisis (Triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM, pH 8,0), y las suspensiones resultantes se trasvasaron a eppendorfs que contenían 0,1 g de bolillas de vidrio. Luego se adicionaron 150  $\mu$ l de fenol y 150  $\mu$ l de una mezcla cloroformo/alcohol isoamílico 24:1 y los tubos se agitaron en vórtex a máxima velocidad durante 5 minutos, dejándolos reposar en baño de hielo cada 1 minuto. Los tubos se centrifugaron 10 minutos a 10000 rpm y se transfirieron 150  $\mu$ l de la fase superior acuosa a un nuevo tubo de 1,5 ml. Se agregó el mismo volumen de isopropanol frío y se agitó por inversión suave 3 veces. Los tubos se incubaron 30 minutos a -20°C, se centrifugaron 10 minutos a máxima velocidad y se descartaron los sobrenadantes. Los ADNs obtenidos se secaron en estufa a 45°C y finalmente se resuspendieron en 30  $\mu$ l de agua miliQ estéril.

La concentración y el grado de pureza de los ADNs se estimó en el equipo Nano Drop (NANO DROP 2000 Spectrophotometer-Thermo Scientific). Si la relación

A260/A280 fue mayor o igual a 2, la muestra se consideró “pura” o con bajo contenido proteico. Finalmente, los stocks de ADN así obtenidos y verificados se congelaron a -20 °C para su conservación y posterior uso.

#### 4.3.8.2 Amplificación por PCR de la región 5.8S-ITS.

Se emplearon los primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') para amplificar la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADNr. En la mayoría de los casos, los productos de PCR de cepas de la misma especie tienen el mismo tamaño, y las especies del mismo género tienen tamaños similares. La técnica utilizada fue adaptada de la descrita por Esteve-Zarzoso et al (1999). La amplificación se realizó en un volumen total de 25 µl y las concentraciones de los reactivos fueron las siguientes:

Mezcla de reacción para PCR con los primers ITS1 e ITS4			
Reactivo	Marca	Concentración stocks	Concentración final
Buffer	Qiagen	10X	1X
dNTPs	Trans	2,5 mM	0,05 mM c/u
Primer ITS1	Sigma	25 pmol/µl	0,5 pmol/µl
Primer ITS4	Sigma	25 pmol/µl	0,5 pmol/µl
Polimerasa	TopTaq Qiagen	5 U/µl	1U
DNA			4 a 12 ng/µl
volumen de reacción 25 µl (agua miliQ)			

Las condiciones de la reacción fueron:

- (1) 94 °C por 5 minutos (desnaturalización inicial) → 1 ciclo
  - (2) 94°C por 45 segundos (desnaturalización)
  - 55 °C por 45 segundos (hibridación)
  - 72 °C por 1 minuto (extensión)
  - (3) 72 °C por 7 minutos (extensión final) → 1 ciclo
- } → 35 ciclos

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Gene Mate – mrc Scientific Instruments. Como control positivo de la reacción se empleó el ADN extraído de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* GL15 (Gonzalez et al., 2014) y como control negativo de contaminación de los reactivos se utilizó agua miliQ estéril en lugar de

ADN. Se verificó la obtención de los productos de PCR mediante una electroforesis horizontal en gel de agarosa (D1 MAX Biología Molecular- Biodynamics) al 1% con bromuro de etidio (4 µl de stock 10 mg/ml de bromuro cada 100 ml de agarosa) para visualizar el ADN. La electroforesis se llevó a cabo a 100 V (voltaje constante) y 150 mA durante 40 minutos y empleando como buffer de corrida TAE 1% (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1mM, pH 8). Se sembraron 5 µl de producto con 1 µl de buffer de siembra 6% (0,025 % azul de bromofenol, 70% glicerol, 12 mM EDTA, agua). Como marcador de peso molecular se sembraron 5 µl del ladder 1000 pb de PB-L (Productos Bio-Lógicos). El gel fue fotografiado bajo iluminación ultravioleta utilizando una cámara Kodak EasyShare Z712 1S. Finalmente, con el programa ImageJ se midieron las distancias relativas de corrida de los marcadores de peso molecular y de las muestras, y a partir de dichas medidas se calcularon los Rfs y los tamaños en pb de los productos de PCR. De esta forma, se realizó una preclasificación de las cepas según al tamaño del fragmento generado con los primers ITS1 e ITS4. Datos del tamaño de los fragmentos para numerosas especies de levaduras pueden encontrarse en la base de datos del yeast-id.org.

#### 4.2.8.3. Amplificación por PCR y secuenciación de la región D1/D2 del gen 26S.

Para la identificación de las cepas por secuenciación se siguió el protocolo de Kurtzman & Robnett (1998). Se emplearon los primers NL1 (Forward, 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') y NL4 (Reverse, 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') para amplificar la zona denominada D1/D2 divergente del ADNr 26S de levaduras. La mix para la PCR se preparó en un volumen final de 50 µL para cada tubo de reacción. La mezcla de reacción se indica en la siguiente tabla.

<b>Mezcla de reacción para PCR con los primers NL1 y NL4</b>			
<b>Reactivo</b>	<b>Marca</b>	<b>Concentración Stocks</b>	<b>Concentración final</b>
Buffer	Qiagen	10X	1X
dNTPs	Trans	2,5 mM	0,05mM c/u
Primer NL1	Sigma	25 pmol/µl	0,5 pmol/µl
Primer NL4	Sigma	25 pmol/µl	0,5 pmol/µl
Polimerasa	TopTaq Qiagen	5 U/µl	1,5U
DNA			4 a 12 ng/µl
volumen de reacción 50 µl (agua mili Q)			

Las condiciones de la reacción fueron las siguientes:

- (1) 94 °C por 1 minuto (desnaturalización inicial) → 1 ciclo
- (2) 94°C por 30 segundos (desnaturalización)  
58,6 °C por 40 segundos (hibridación)  
72 °C por 1 minuto (extensión) } → 35 ciclos
- (3) 72 °C por 7 minutos (extensión final) → 1 ciclo

Las reacciones de PCR y las electroforesis se llevaron a cabo de la forma descrita anteriormente. Los productos de amplificación seleccionados fueron enviados para su purificación y secuenciación mediante el método de Sanger a Macrogen, Inc (Corea del Sur). Con la información obtenida se creó una secuencia consenso para cada levadura empleando el programa Gap4 del paquete Staden Package. Para el análisis de identificación taxonómica de las levaduras, se utilizó el algoritmo de alineamientos locales BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) sobre bases de datos nucleotídicas no redundantes para seleccionar las secuencias homólogas más cercanas a la secuencia consenso creada con el Gap4. Se escogió la secuencia con mayor score, cobertura y porcentaje de identidad, y con E-value 0,0 para asignar el género y la especie a cada levadura.

#### 4.2.8.4. Diferenciación de especies *Saccharomyces*.

Para diferenciar especies de *Saccharomyces* dentro del grupo *sensu stricto*, en particular las especies hermanas *S. cerevisiae* y *S. paradoxus*, se realizó una PCR-RFLP de la región ITS-5.8S con las enzimas *HaeIII*, *HpaII* y *ScrF1* (Teresa Fernández-Espinar et al., 2000).

### 4.3. Resultados.

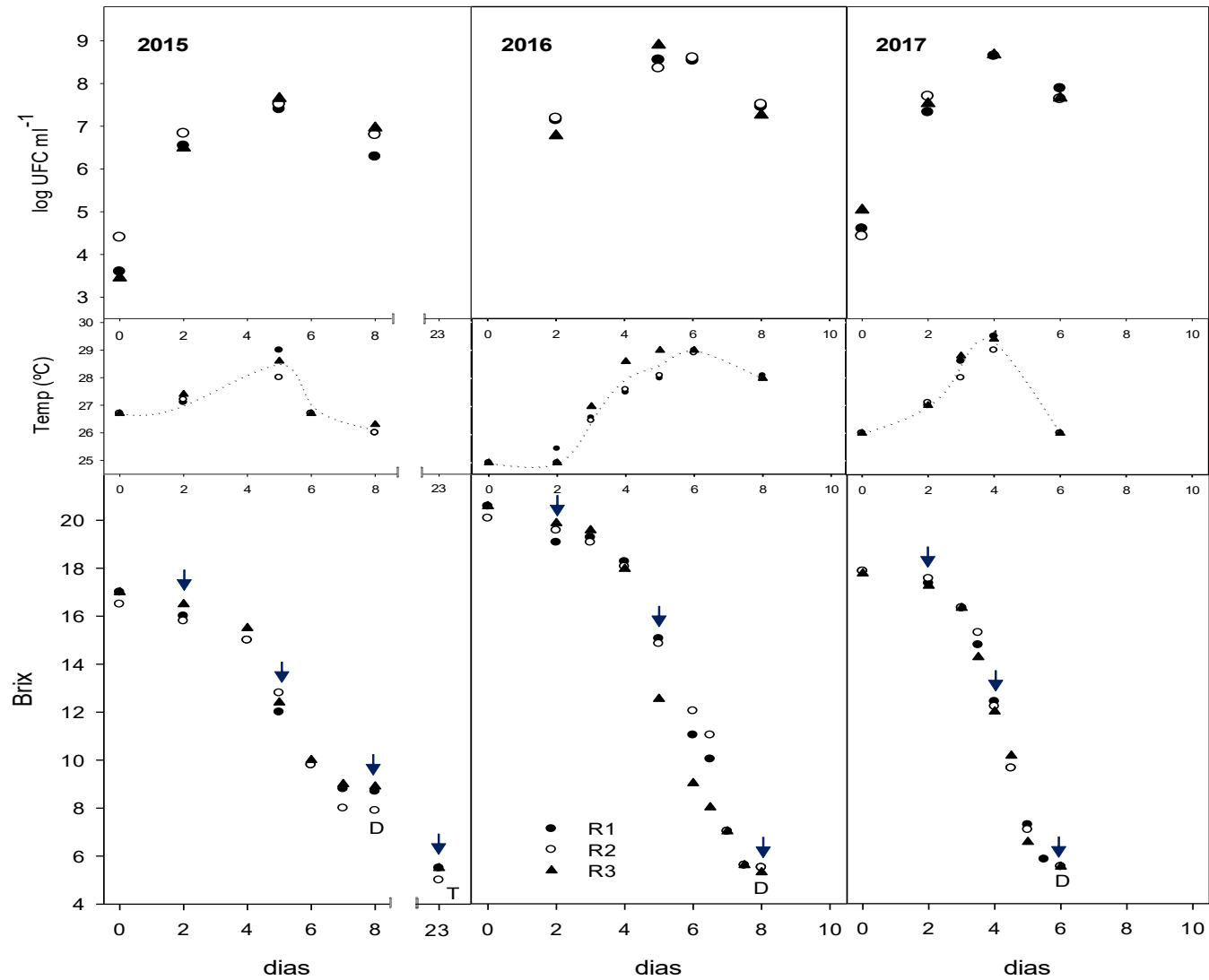
#### 4.3.1 Microvinificaciones v15, v16, v17.

En la Figura 4.1 se muestra la evolución de las fermentaciones espontáneas (Brix vs tiempo de fermentación) de las campañas v15, v16 y v17 discriminadas por réplica como así también la variación de temperatura del medio y los recuentos viables totales. Las fermentaciones v16 y v17 se consideran normales para un mosto estándar

de Isabella, es decir fermentaciones espontáneas que transcurrieron en un lapso de tiempo de tiempo de 6-8 días según los °Bx iniciales del mosto. Por el contrario v15 fue una fermentación espontánea irregular, con una parada de fermentación a los 7 días que se completó luego del descube.

Con excepción de la réplica R3 en v16, que mostró un pronunciado cambio en la velocidad de fermentación a partir de los 4 días, las diferencias en la evolución de las tres fermentaciones dentro de cada año podrían considerarse dentro de la variación normal de toda fermentación vínica (Considine & Frankish., 2013). La variación de la temperatura durante la vinificación fue indicativa de las etapas de la fermentación; en la fase de latencia (2-3 días) hubo poca variación de la temperatura inicial (26-27 °C) y luego aumentó progresivamente en la etapa tumultuosa, hasta llegar a un máximo de 29°C en v15 y v16, y cerca de 30°C en v17. Se observó también que el incremento de temperatura acompañó la mayor tasa de fermentación en R3 de v16. La fase final de la fermentación mostró una declinación rápida de la temperatura del medio. Los recuentos viables de levaduras totales alcanzaron valores máximos del orden de  $3,0 \times 10^7$  UFC/ml en v15 y un orden mayor ( $3-5 \times 10^8$  UFC/ml) en v16 y v17, lo que representó un incremento de dos a tres órdenes respecto del recuento inicial en las bayas (v15:  $6,3(\pm 5) \times 10^5$ , v16:  $9(\pm 7) \times 10^5$  y v17:  $1,9(\pm 2) \times 10^5$ ).

En la Tabla 4.1 se indica el contenido de alcohol, glicerol y azúcar fermentable (glucosa + fructosa), la relación fructosa/glucosa (F/G), el porcentaje de no-*Saccharomyces/Saccharomyces* de acuerdo a la observación de los morfotipos y el test de agar lisina (ver detalles de la evolución de las réplicas individuales en tablas III, IV y V del anexo).



**Figura 4.1.** Microvinificaciones con Isabella durante v15, v16 y v17. Las flechas indican el muestreo para los aislamientos de levaduras. D: descube, T: trasiego. pH inicial v15: 3,0; v16: 3,3, v17: 3,35. El pH no varió sustancialmente durante la fermentación. Réplicas: (■) R1; (○) R2; (▲) R3. Las líneas de temperatura representan el valor promedio para las 3 réplicas. Recuento de levaduras viables en medio WL.

**Tabla 4.1.** Fermentación de Isabella v15, v16 y v17.

Días de fermentación	Alcohol (% v/v)	°Brix	Azúcar residual (g/l)	F/G	Glicerol (g/l)	Recuento viable (UFC/ml)	% <i>Saccharomyces</i>
<b>v15</b>							
<b>2 días</b>	<0,4	16,8±0,3				4,47(±2,03)x10 <sup>6</sup>	nd
<b>5 días (tumultuosa)</b>	4,5±0,3	12,4±0,4	76,8±5,3	0,66±0,07	5,8±0,1	2,78(±1,06)x10 <sup>7</sup>	nd
<b>8 días (descube)</b>	5,4±0,7	8,3±0,6	37,9±1,9	0,62±0,07	6,5±0,4	6,0(±3,42)x10 <sup>6</sup>	1,8±0,4 (nd en R3)
<b>15 días (1° trasiego)</b>	8,9±0,06	5,5±0	< LQ		7,3±0,7	1,77(±2,16)x10 <sup>5</sup>	91,7±14,4
<b>v16</b>							
<b>2 días</b>	<0,5					1,25(±0,58)x10 <sup>7</sup>	nd
<b>5 días (tumultuosa)</b>	4,0±0,2 (R3: 6,5)	15±0 (R3: 11,5)	116±2 (R3: 90)	0,91±0,01 (R3: 0,88)	4,5±0,3 (R3: 5,5)	4,94(±3,76)x10 <sup>8</sup> (R3: 7,7x10 <sup>8</sup> )	22,8±5,4 (R3: 76,5)
<b>6 días</b>		10,7±0,7 (R3: 9)				3,85(±0,5)x10 <sup>8</sup>	100±0
<b>8 días (descube)</b>	11,0±0,1	5,7±0,3	< LQ		7,2±0,3	1,14(±1,53)x10 <sup>8</sup>	100±0
<b>v17</b>							
<b>2 días</b>	0,6±0,1	14,4±0,06	150±2	1,04±0,01	0,9±0,2	3,14(±0,86)x10 <sup>7</sup>	nd
<b>4 días (tumultuosa)</b>	6,85±0,07	11±0,06	62,5±7,8	1,02±0,02	5,25±0,07	4,45(±0,07)x10 <sup>8</sup>	77±9,9
<b>6 días (descube)</b>	9,4±0,3	5,7±0,3	< LQ		5,9±0,2	5,5(±1,65)x10 <sup>7</sup>	100±0

Datos iniciales mosto (promedio tres réplicas): v15: Brix:17,3 (azúcar 159 g/l), pH 2,99, AT 0,8 %, YAN 204 mg/l. v16: Brix: 20,3 (azúcar 195 g/l), pH: 3,12, AT: 0,66 % ; YAN 149 mg/l. v17: Brix: 17,4 (azúcar 163 g/l), pH: 3,32, AT 0,74 %, YAN: 207 mg/l.  
Azúcar: suma de fructosa y glucosa; F/G relación fructosa/glucosa, LQ límite de cuantificación. Azúcar y alcohol determinados por HPLC. Nd: no detectado en la dilución menor. Entre paréntesis valores correspondientes a réplicas no promediadas.

Un primer análisis global de las colonias en WL mostró que la distribución de levaduras no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces* fue variando con la evolución de la fermentación, y a su vez fue diferente cada año. En las tres fermentaciones, el crecimiento microbiano durante la fase de latencia se debió a la multiplicación de levaduras no-*Saccharomyces*, que alcanzaron recuentos viables del orden de  $10^6$  UFC/ml para v15 y  $10^7$  UFC/ml para v16 y v17. En v16 y v17 la fermentación continuó con una progresiva colonización del mosto por *Saccharomyces*, y en 3 a 5 días el mosto/vino podría describirse como un cultivo mixto de no-*Saccharomyces*/*Saccharomyces*. Los datos indican que la velocidad y el tiempo total de fermentación dependieron del crecimiento de *Saccharomyces*, situación que puede visualizarse muy claramente en v16, en la réplica 3 de los 5 días, en la cual un 76% de la población viable correspondió a *Saccharomyces* frente a un 20-26 % de las otras 2 réplicas, lo que conllevó a una mayor disminución de °Bx y un mayor nivel de alcohol en R3 (anexo Tabla IV). Sin embargo, un día después (6 días de fermentación), las tres fermentaciones mostraron valores de °Bx comparables y con el predominio de *Saccharomyces*. Al final, en el descube v16 (8 días) y v17 (6 días), cuando los °Bx del vino alcanzaron su valor característico de 5,5-6,0, la mayor parte de la población de levaduras viables fueron *Saccharomyces* y el recuento de no-*Saccharomyces* se redujo a valores de  $10^5$  UFC/ml. En el primer trasiego (15 días después del descube) no se encontraron colonias típicas de no-*Saccharomyces* (dilución -1).

La evolución posterior a la fase de latencia en v15 fue completamente diferente, pero mostró cierta consistencia con lo ocurrido en v16/v17. La fermentación lenta e incompleta se debió al crecimiento tardío de *Saccharomyces*, reflejado en el bajo porcentaje de las mismas en el momento del descube. Esto también se manifestó en el bajo nivel de alcohol (5-6%) del mosto fermentado al momento de la parada. Al comparar las tres fermentaciones, es evidente que en v15 el crecimiento de *Saccharomyces* estuvo limitado por algún factor, lo que evitó una rápida acumulación de alcohol permitiendo que las levaduras no-*Saccharomyces* predominaran en el vino luego de una semana de fermentación. Teniendo en cuenta el criterio de descubrir cuando los °Bx se mantuvieran constantes, se procedió al descube y el vino se mantuvo 15 días a temperatura ambiente hasta el primer trasiego, tal como indican los protocolos de elaboración del vino de la Costa. El análisis de la muestra del trasiego dio un valor de 5,5 °Bx, 9,5% de alcohol y azúcares < 2,0 g/l. El recuento viable fue del orden de  $10^5$  UFC/ml, observándose en el medio WL únicamente colonias del género *Saccharomyces*. En conclusión, la parada de la fermentación fue solo transitoria y se



debió a una tardía colonización del mosto por *Saccharomyces* y a la limitación de las levaduras no-*Saccharomyces* para producir altas concentraciones de alcohol (> 6 - 7 %). En el período entre el descube y el trasiego, la actividad fermentativa de *Saccharomyces* se reflejó en el consumo del resto del azúcar y en el aumento del nivel de alcohol al valor esperable según los Brix iniciales del mosto.

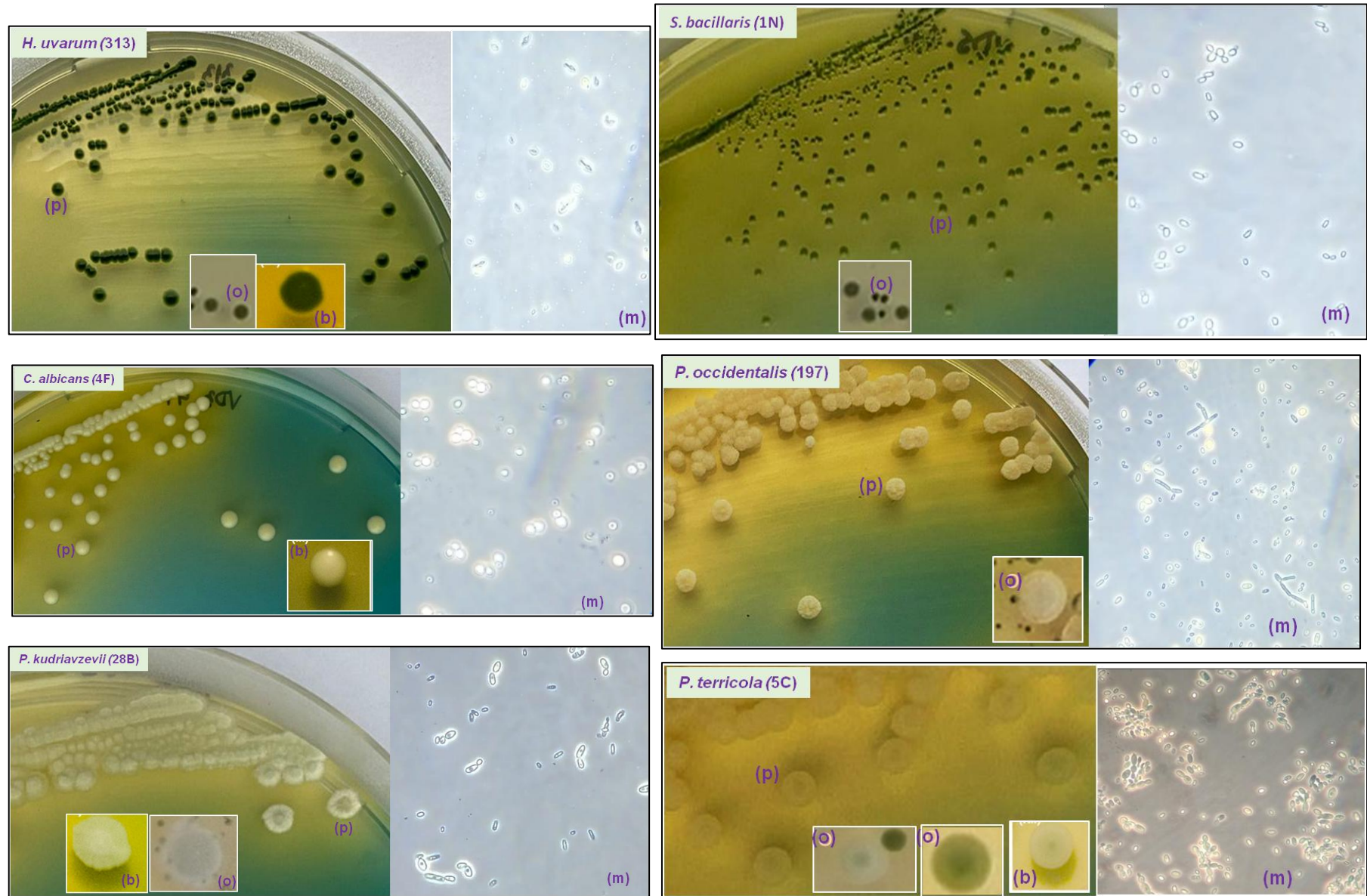
#### **4.3.2. Diversidad de levaduras en la vinificación.**

La identificación de las levaduras asociadas a la fermentación de Isabella se inició con la selección de colonias basadas en los morfotipos observables en el medio WL. En el trabajo original de Cavazza et al. (1992), y posteriormente en el de Pallmann et al. (2001), se describieron morfotipos de 11 especies o géneros de levaduras crecidas en este medio. En trabajos más recientes, se describieron las características de las colonias en WL de otras levaduras como *Starmerella bacillaris*, *Candida albicans* y diferentes especies de *Pichia* (Polizzoto et al., 2016; Zhang et al., 2020; Raymond Eder & Rosa, 2021). Las características de las colonias pueden variar con el tiempo de incubación de las placas o luego de ser purificadas (Polizzoto et al., 2016), ya que en la placa original hay una población diversa cuyo crecimiento afecta el entorno de las colonias, y por lo tanto, puede modificar su aspecto. Incluso la misma especie puede dar lugar a colonias ligeramente diferentes debido a variaciones entre cepas (Zhang et al., 2020). Por estos motivos, para comparar los morfotipos se tuvo en cuenta no solo el aspecto de las colonias en la placa inicial, sino también su aspecto en el último pasaje en medio WL durante la purificación. Todas las cepas seleccionadas fueron analizadas mediante una PCR para determinar el tamaño de la región ITS-5.8S del rDNA. La PCR de esta región se combina con un análisis de restricción para realizar una primera aproximación en la identificación de las especies de levaduras (Esteve-Zarzoso et al., 1999), pero en este caso solo se consideró el tamaño del fragmento ITS como parámetro para establecer similitud entre los aislamientos. De las cepas que mostraron similitud en el morfotipo y tamaño del amplicón, se tomaron al azar entre una y tres de cada réplica para su identificación mediante secuenciación de la región D1/D2 del rDNA. Esta secuencia difiere entre distintas especies en más del 1%, y menos del 1% entre cepas pertenecientes a la misma especie (Kurtzman & Robnett, 1998). A partir de estos resultados se determinó cómo se distribuyeron las especies de levaduras durante la fermentación espontánea. En el caso de *Saccharomyces* se discriminó entre las especies hermanas *S. cerevisiae* y *S. paradoxus* mediante PCR-RFLP con tres enzimas de restricción. A continuación

se resumen los resultados del análisis microbiológico. A los fines prácticos, se analizaron por separado las especies no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces*.

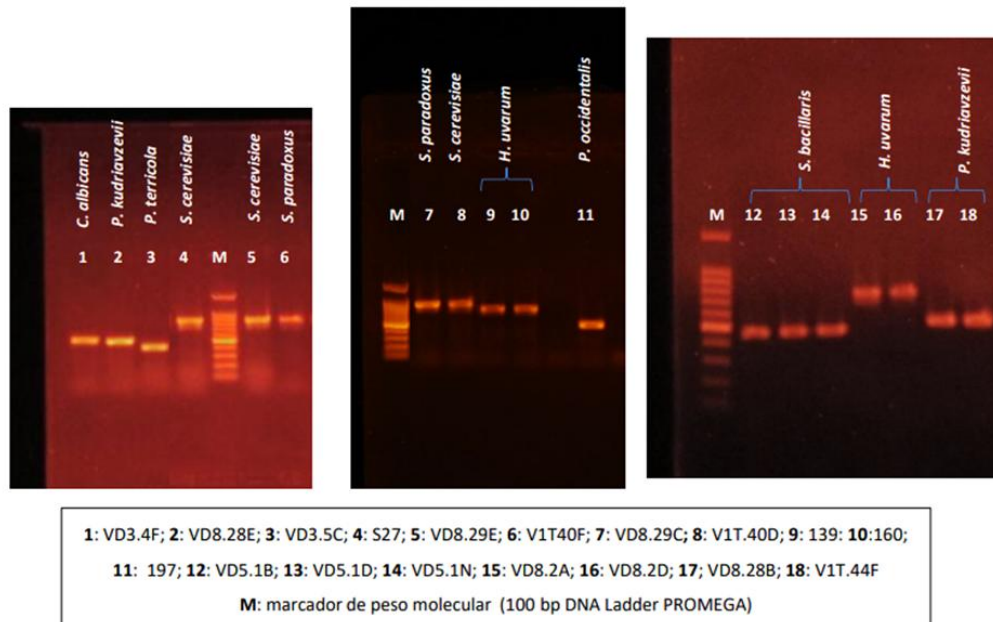
### **Especies no-*Saccharomyces*.**

En la Figura 4.2 se muestran imágenes de las principales especies de levaduras no-*Saccharomyces* que se aislaron de la fermentación espontánea de Isabella. En general, los morfotipos de *Hanseniospora uvarum* y *Starmerella bacillaris* (syn. *Candida zemplinina*), coincidieron con lo reportado en bibliografía, encontrándose las mayores diferencias con las levaduras del género *Pichia*. Las características microscópicas de todas las especies fueron similares a las descritas en diferentes fuentes (Kurtzman, 2011; Ciani & Comitini, 2019; Raymond Eder & Rosa, 2021).



**Figura 4.2.** Colonias en medio WL de 6 especies de levaduras aisladas de la fermentación espontánea de Isabella. **p:** colonia purificada; **o:** colonia original en WL; **b:** colonias purificadas según Polizzoto et al., 2016; **m:** microscopía en contraste de fase 1200x. En *P. terricola* se muestra una colonia joven (48-72 hs) y la misma colonia una semana después a 30°C.

En la Figura 4.3 se muestran los geles de agarosa con los fragmentos obtenidos por PCR de la región ITS-5.8S.



**Figura 4.3.** Geles del producto PCR de la región ITS-5.8S con los cebadores ITS1-ITS4 para distintas especies de levaduras aisladas de la fermentación espontánea de Isabella.

En la Tabla 4.2 se resume la información de las especies identificadas. Para corroborar la consistencia de los datos de ITS-5.8S con la identidad de la especie, se consultó la base de datos yeast-id.org como así también datos reportados en diversas publicaciones sobre levaduras vínicas. Los tamaños de los fragmentos del ITS-5.8S varían según la fuente consultada, con un coeficiente de variación entre 2 y 6 % (Segura et al., 2010). Los valores determinados en el trabajo se encuentran cercanos o dentro del rango reportado por diferentes autores.

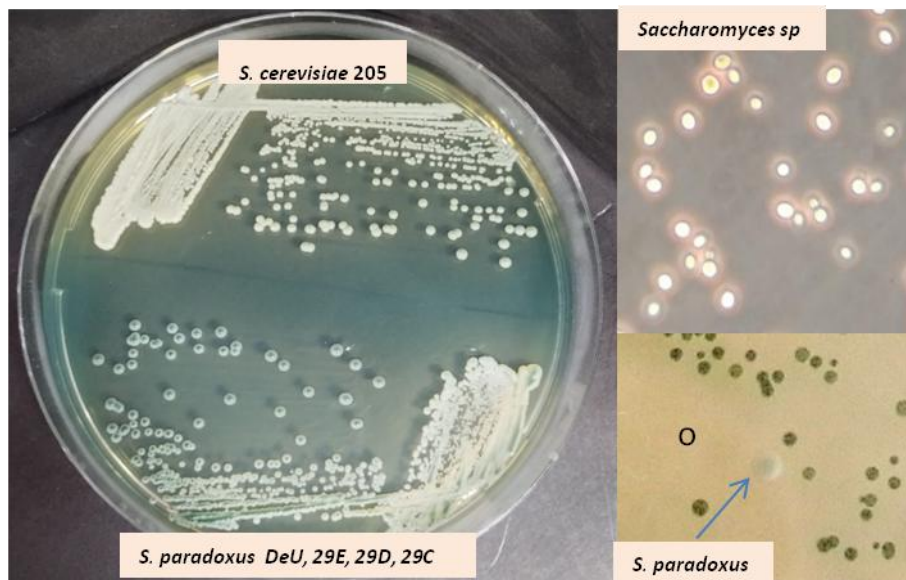
**Tabla 4.2.** Levaduras no-*Saccharomyces* aisladas de la fermentación espontánea de Isabella.

Morfotipo	Morfología en WL	Test lisina	Rango ITS (pb)	ITS ref	Levadura identificada (D1/D2)
I	Pequeña a mediana, verde, circular, plana	+	439-454	460 (1)	<i>Starmerella bacillaris</i> (syn. <i>Candida zemplinina</i> )
II	mediana, verde a verde oscuro, circular, plana	+	751-777	775 (1) 745-775 (4)	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
III	Blanco-grisáceo, rugosa, bordes irregulares	+	462	500 (2) 510 (3) 450 (5)	<i>Pichia occidentalis</i> (syn. <i>Issatchenkia occidentalis</i> )
IV	Blanca, cóncava, butírica	+	527	550 (1)	<i>Candida albicans</i>
V	mediana, blanca a ligeramente verdosa, bordes irregulares,	+	413	410 (3) 425-460 (4) 450 (5)	<i>Pichia terricola</i> (syn. <i>Issatchenkia terricola</i> )
VI	Mediana, grisácea con centro verde claro, irregular	+	502-533	509 (1) 510 (3) 450-525 (4)	<i>Pichia kudriavzevii</i> (syn. <i>Issatchenkia orientalis</i> ) (anamorph <i>Candida krusei</i> )

(1) yeast-id.org; (2) del Mónaco et al., 2014; (3) Polizzoto et al., 2016; (4) Segura y col., 2010; (5) Hierro et al., 2006.

### Especies del género *Saccharomyces*.

Las colonias de *Saccharomyces* son fáciles de distinguir en agar WL, ya que son circulares, de color blancas o crema a verde claro, de consistencia butírica y muchas veces con elevación umbonada (OIV, 2010) (morfotipo S). Estas características fueron las que se tomaron en cuenta para seleccionar colonias de las etapas intermedias y final de la fermentación en v16 y v17, y en el trasiego en v15. Por otra parte, al momento del descube, en v15 se observaron colonias semejantes a *Saccharomyces*, pero que presentaban un centro verdoso (colonias Scv) (Figura 4.4). Estas colonias no se observaron en v16 y ocasionalmente en v17. La observación microscópica de las colonias Scv mostró células con morfología de *Saccharomyces*.

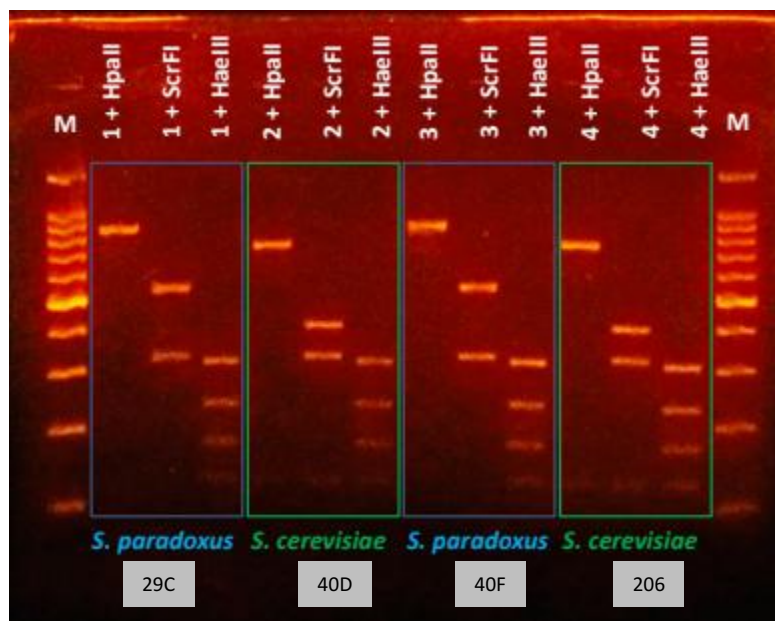


**Figura 4.4.** Colonias (purificadas) de *Saccharomyces* en agar WL. Cepas Scv 20E, 29C, 29D (descube v15); cepa Scv DeU (descube v17); **o** colonia original Scv (descube v15); cepa morfotipo S 205 (descube v16). Microfotografía: células típicas de *Saccharomyces* sp (contraste de fase 1250X).

Para confirmar la identidad de estos aislamientos, se seleccionaron al azar entre 10 y 15 colonias típicas del final de la fermentación de cada réplica y de cada año, a las cuales se sumaron 6 colonias Scv (3 del descube v15, 1 del trasiego v15 y 1 del descube v17). La pertenencia al género *Saccharomyces* de todos los aislamientos fue confirmada por el test de agar lisina (ausencia de crecimiento) y por el tamaño del amplicón ITS-5.8S (~850-880 pb, Figura 4.5). Esto último es debido a que las levaduras pertenecientes al grupo *Saccharomyces* sensu stricto tienen tamaños de



ITS promedios de 850 pb, un rasgo que las distingue de las especies no-*Saccharomyces* y de algunas otras especies del género *Saccharomyces* (McCullough et al., 1998; Fernadez-Espinar et al, 2000). Para identificar las *Saccharomyces* a nivel de especie por secuenciación de la región D1/D2 se seleccionaron 2 a 4 cepas de cada réplica y año, a las que se sumaron las cepas Scv. Todas las cepas se identificaron como *S. cerevisiae*, excepto las colonias Scv que se identificaron como *S. paradoxus*. La presencia de *S. paradoxus* fue confirmada además por un método independiente, en este caso mediante PCR-RFLP de la región ITS1-5.8S-ITS2 con las enzimas HaeIII, HpaII y ScrFI, que permite diferenciar *S. paradoxus* de su especie hermana *S. cerevisiae* (Fernadez-Espinar et al, 2000). Los resultados se muestran en la Figura 4.5 y en la Tabla 4.3. Las 4 bandas de restricción obtenidas con HaeIII confirmaron la pertenencia de todas las cepas seleccionadas al subgrupo de *S. cerevisiae/S.paradoxus*, ya que el subgrupo *S. bayanus/S. pastorianus* presenta un patrón con HaeIII de 3 bandas. A su vez, los patrones de restricción con las enzimas HpaII y ScrFI confirmaron la identidad de las cepas Scv. Las bandas de ~ 120-125 pb obtenidas en las cepas de *S. cerevisiae* con las enzimas HaeIII, HpaII y ScrFI, si bien son tenues, se pueden apreciar claramente en la foto del gel (Figura 4.5).



**Figura 4.5.** PCR-RFLP de cepas *Saccharomyces*. Cepas Scv 1: 29C (descube v15); cepa 2: 40D y cepa 3: 40F (trasiego v15); cepa 4: 206 (descube v16); M: marcador de peso molecular 100 pb Promega.

**Tabla 4.3.** Tamaño de los fragmentos de restricción obtenidos con las enzimas HaeIII, HpaII y ScrFI.

Especie	Cepa	Fragm. con HpaII (pb)	Fragm. con ScrFI (pb)	Fragm. con Hae III (pb)
<i>S. cerevisiae</i>	Ref*	725+125	400+320+120	325+230+170+125
	V1T.40D	773+126	405+327+123	322+230+169+123
	206	754+122	405+320+121	303+219+163+122
<i>S. paradoxus</i>	Ref*	850	520+320	325+230+170+125
	VD8.29C	867	539+324	314+230+163+128
	V1T.40F	867	549+322	316+230+167+125

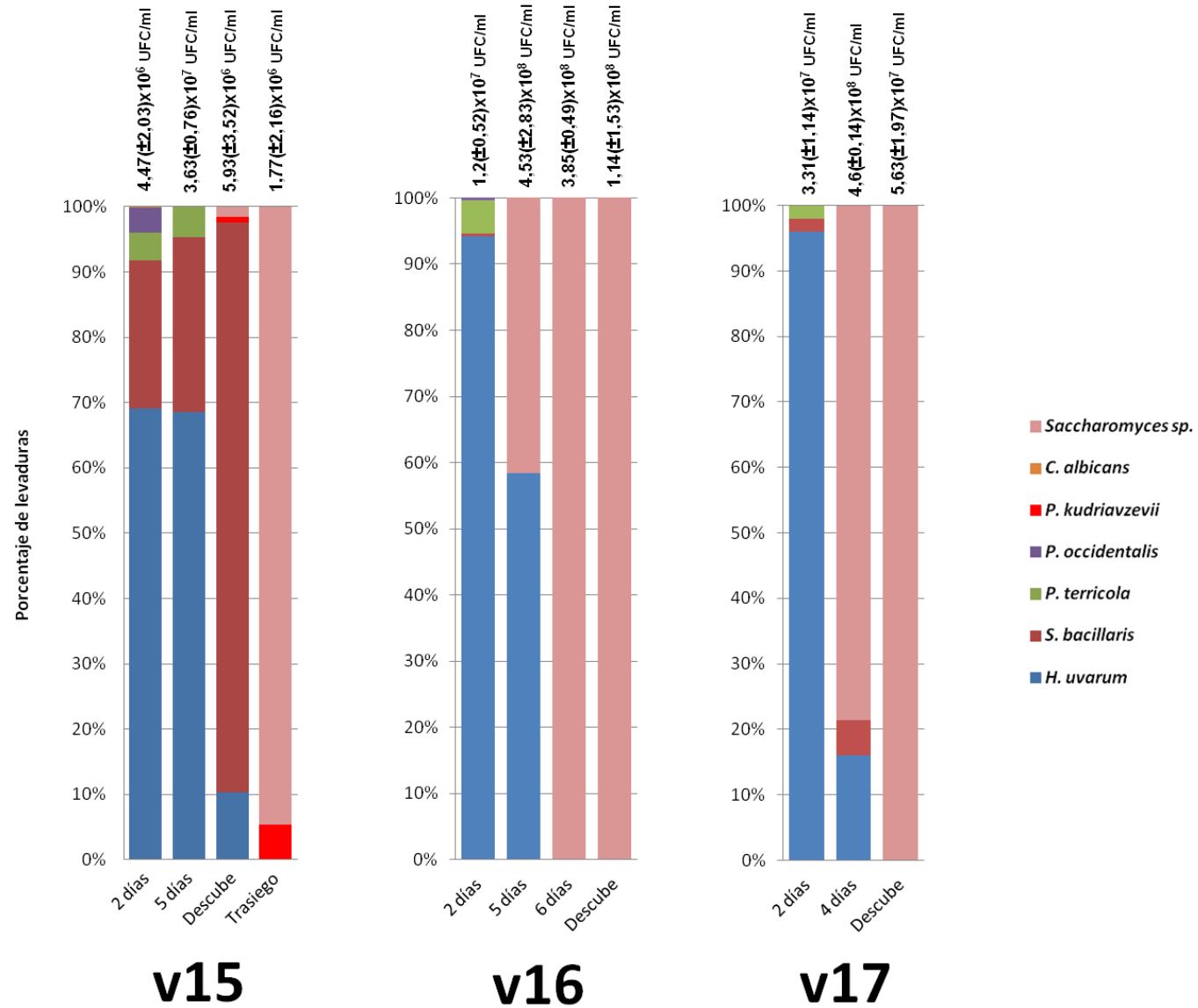
\*Ref: Fernández-Espinar et al., (2000)

#### 4.3.3 Distribución de las especies de levaduras durante la fermentación espontánea

En la Figura 4.6 se muestra la distribución de las diferentes especies de levaduras durante las fermentaciones espontáneas v15, v16 y v17 (en el apartado Anexos se pueden apreciar los resultados por réplica). En la etapa inicial de la fermentación espontánea de la Isabella, predominaron especies de levaduras no *Saccharomyces*, pero al final de la fermentación el mosto fue colonizado por levaduras *Saccharomyces*.

La especie de levadura no-*Saccharomyces* que predominó durante la fase de latencia y en la etapa tumultuosa (hasta los 4 - 5 días de la fermentación espontánea) fue *H. uvarum*. En los primeros 2 días, los recuentos viables de esta levadura fueron los siguientes (promedio  $\pm$  DE de las 3 réplicas): 3,24 ( $\pm$ 1,91)  $\times 10^6$  UFC/ml en v15, 1,14 ( $\pm$ 0,52)  $\times 10^7$  UFC/ml en v16, y 3,16 ( $\pm$ 1,04)  $\times 10^7$  UFC/ml en v17, lo que representó el 70( $\pm$ 8,7)%, 94,2( $\pm$ 3,7)% y 96( $\pm$ 1,7)% de la población total de levaduras respectivamente. Durante la primera mitad de la etapa tumultuosa, los recuentos viables de *H. uvarum* se incrementaron en un orden (v15 y v16) o casi el doble (v17), período durante el cual la concentración de alcohol en el medio aumentó al 4-6%. La segunda especie no-*Saccharomyces* de importancia en la fermentación espontánea de Isabella fue *S. bacillaris*, en particular en v15.





**Figura 4.6.** Evolución de las distintas especies de levaduras en los mostos de fermentación espontánea de los años 2015, 2016 y 2017. Los recuentos de levaduras totales de cada etapa se indican encima de la barra correspondiente, y representan el promedio de tres réplicas.

En las fermentaciones normales de v16 y v17, *S. bacillaris* tuvo una presencia minoritaria, mientras que en v15 fue colonizando el mosto/vino desde la fase de latencia hasta dominar por completo la fermentación al momento de la parada (7-8 días). Los recuentos viables de *S. bacillaris* (promedio  $\pm$  DE de las 3 réplicas, %) en la fase de latencia, etapa tumultuosa y descube (parada) en v15 fueron los siguientes:  $1,0 (\pm 0,11) \times 10^6$  UFC/ml, 23( $\pm$ 10,4)%;  $1,0 (\pm 0,36) \times 10^7$  UFC/ml, 28( $\pm$ 9)% y  $5,27 (\pm 3,25) \times 10^6$  UFC/ml, 86( $\pm$ 10)%. Por otra parte, los recuentos viables de *H. uvarum* al momento de la parada de fermentación disminuyeron en dos órdenes ( $10^5$ ) respecto de la muestra de 5 días, indicando una pérdida importante de viabilidad. Claramente, *S. bacillaris* fue una especie mejor adaptada que *H. uvarum* para sobrevivir en el vino con 5-6 % de alcohol.

Otras levaduras no-*Saccharomyces* minoritarias (respecto a *H. uvarum* y *S. bacillaris*) fueron *P. terricola*, que estuvo presente en la fase de latencia de las 3 fermentaciones, en general con recuentos entre  $2,1$  y  $7,0 \times 10^5$  UFC/ml, y un % del total de levaduras del 4( $\pm$ 1,5)% (v15), 5%( $\pm$ 3) (v16) y 2 %( $\pm$ 0,2) (v17); y *P. occidentalis* en v15  $1,8 \times 10^5$  ( $\pm$ 0,2) UFC/ml, 3,75( $\pm$ 1,2)% y en v16 ( $3,7 \times 10^4$  ( $\pm$ 3) UFC/ml, 0,35( $\pm$ 0,25)%). Estas dos especies no se detectaron en la fase tumultuosa. Un caso especial fue el de *P. kudriavzevii*, que fue identificada en la parada de fermentación v15 con recuentos del orden de  $10^4$  UFC/ml, y posteriormente en el trasiego, donde se observaron algunas colonias aisladas. Otra levadura aislada en v15 fue *C. albicans*, que no es considerada una levadura vínica y por lo tanto su presencia ocasional en la fermentación puede atribuirse a una contaminación.

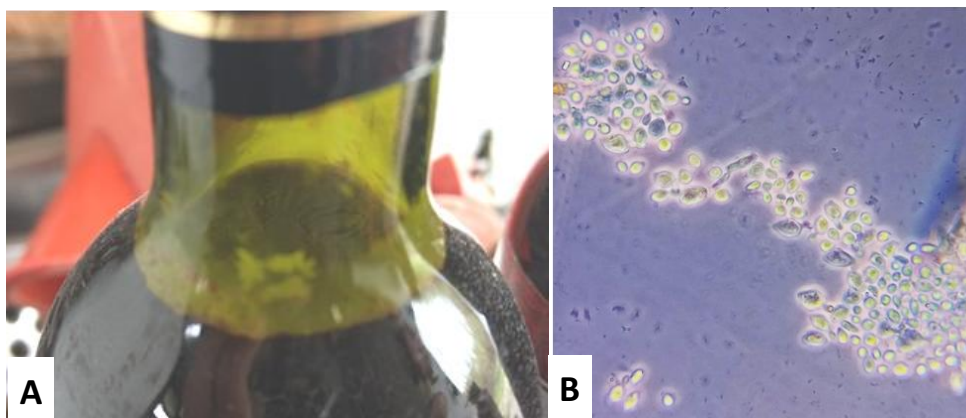
*Saccharomyces cerevisiae* no fue detectada en la fase de latencia, pero su crecimiento se hizo notorio en la fase tumultuosa y dominó completamente la fase final de la fermentación, como ocurre normalmente en la fermentación espontánea del vino. La presencia de *S. paradoxus* en la parada de fermentación v15 no se tradujo en una colonización completa del mosto por esta especie al momento del trasiego; en v16 no se observaron colonias Svc y solo algunas se detectaron en v17.

#### **4.3.4 Levaduras de velo.**

La formación de velo es un fenómeno característico del vino de la Costa que suele aparecer en las botellas de vino que elaboran los productores en sus propias quintas y en la Cooperativa de la Costa. La Cooperativa de la Costa de Berisso cuenta con un predio donde se ubican dos construcciones separadas e independientes: la

bodega o sector de fermentación, en donde se encuentran los tanques, equipos para envasar, filtros, bombas, encorchadoras, etc., y por otra parte la agroindustria, donde se elaboran conservas y dulces.

El fenómeno de formación de velo es complejo, no siempre ocurre y se manifiesta a partir de septiembre-octubre, cuando sube la temperatura media ambiental. Es típico de vinos secos, tanto blanco como tinto, y depende del momento del envasado (Verón, comunicación personal). El velo al inicio es ligero (desaparece fácilmente al agitar y tarda días o semanas en reaparecer), y a medida que transcurre el tiempo se vuelve denso y granuloso (Figura 4.7 A). La observación al microscopio muestra la presencia de levaduras, a veces de diferente morfología (Figura 4.7 B).

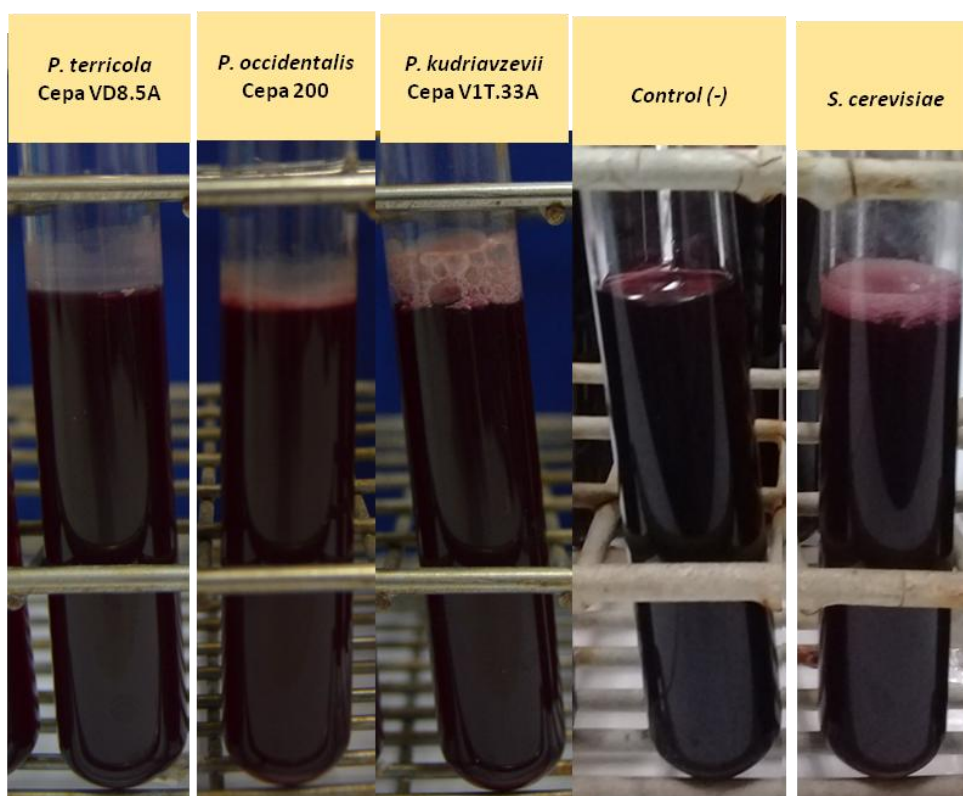


**Figura 4.7. A.** Velo muy desarrollado en botella de la Cooperativa. **B.** Observación microscópica directa de una muestra de velo (contraste de fase 500 x). Se observan los cúmulos de levaduras y la presencia de al menos dos especies diferentes.

Para determinar la conexión que podría haber entre las levaduras de la fermentación espontánea y el desarrollo de velo, se realizó un test que consistió en inocular cepas de las especies aisladas en las microvinificaciones (*H. uvarum*, *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *P. terricola*, *P. kudriavzevii*, *P. occidentalis*) en tubos que contenían mosto pasteurizado de Isabella, incubar en forma estática y observar luego de una semana la formación de velo. Las especies que formaron velo fueron: *P. terricola*, *P. occidentalis* y *P. kudriavzevii* (Figura 4.8), que son especies descritas como formadora de películas (Kurtzman, 2011).

Los velos aparecieron rápidamente luego de dos o tres días de haber inoculado el mosto, y presentaron diferentes características (Figura 4.8). *P. terricola* formó un velo suave y un biofilm sobre las paredes del tubo. El velo de *P. occidentalis* fue similar al de *P. terricola*. En *P. kudriavzevii* el velo resultó ser más denso, algo

granuloso y el biofilm menos pronunciado (en la foto se observa que el velo está disperso entre la espuma que genera la actividad fermentativa de la cepa). *C. albicans* no produjo velo, al igual que *S. cerevisiae* empleada como control negativo (en la foto se observa la típica actividad fermentativa de esta especie). Si bien no se realizó el test de velo con *S. paradoxus*, en los ensayos de fermentación con mosto pasteurizado (capítulo 5) no se evidenció la formación de velo luego de 8 días de fermentación.



**Figura 4.8.** Resultados del test de velo positivos para diferentes especies de levaduras aisladas de la fermentación espontánea de Isabella (*P. terricola*, *P. occidentalis* y *P. kudriavzevii*).

Con respecto a los velos desarrollados en los vinos de la Cooperativa, se tomaron muestras en la bodega de diferentes campañas, y de un ensayo de vinificación realizado en la agroindustria. Para caracterizar el ambiente donde se había desarrollado el velo, los vinos se analizaron en relación al pH, concentración de alcohol y anhídrido sulfuroso libre y total. Mediante la herramienta disponible en la página web AZ3 Oeno, que considera el equilibrio entre las diferentes formas químicas en función del pH, el grado alcohólico y la temperatura del vino, se estimó la

concentración de SO<sub>2</sub> activo (<https://www.az3oeno.com/calculo-so2-molecular-activo>). Las cepas aisladas de los velos, luego de ser identificadas, fueron testeadas para confirmar la propiedad de formar velo. En la Tabla 4.4 se muestra la composición de los vinos, las especies de levaduras aisladas e identificadas, y los resultados del test de velo.

En todos los casos se trataron de vinos secos (azúcar residual < 2,0 g/l), con niveles de alcohol entre 9,2% y 11,5% y pH en el rango de 3,1-3,5. Las concentraciones de SO<sub>2</sub> activo estuvieron en el rango de 0,4-0,67 mg/l, que son valores típicos recomendados en función del riesgo de deterioro del vino, aunque este criterio ha sido cuestionado a partir de la incertidumbre asociada a la determinación de SO<sub>2</sub> en vinos tintos (Howe et al., 2018).

Para identificar las levaduras cultivables del velo de las botellas de la Cooperativa y agroindustria se realizó un estriado en WL de una muestra tomada de la botella. En algunas muestras no se observó crecimiento en agar, aunque al microscopio se visualizaron las levaduras. De aquellas muestras donde hubo crecimiento se identificaron básicamente dos tipos de colonias, aunque no siempre se aislaron juntas en todos los velos. La única levadura que dio positivo el test de velo fue identificada como *P. manshurica* (Figura 4.9). La colonia de esta especie en medio WL se caracteriza por ser rugosa, de borde filamentosos y de color blanco-grisáceo. Al microscopio se presentó en forma de células redondeadas u ovoides semejantes a las levaduras presentes en la observación directa del velo y coincidente con lo descripto para la especie (Kurtzman, 2011). Por otro lado, las colonias crema a verde claro, lisas, butirosas y convexas se identificaron como *Saccharomyces*. Es evidente que las células de *Saccharomyces* se encuentran atrapadas dentro de la estructura del velo debido a su presencia natural en las botellas del vino. Ensayos de fermentación con mosto Isabella v18 pasteurizado empleando las cepas de *Saccharomyces* aisladas del velo (BVS1, S2, S9) dieron niveles de alcohol del 11-11,5 % y 6,5 g/l de glicerol en promedio.

La levadura aislada de las damajuanas con velo del ensayo v17 de la agroindustria se identificó como *P. kudriazevii* (cepa FBV3). En el test dio un velo similar al de la misma especie aislada de las microvinificaciones.

**Tabla 4.4.** Características fisicoquímicas de los vinos con velo y especies de levaduras aisladas de los mismos.

Año de elaboración	Origen	Muestra	Cepa	Identificación	Test velo	Características de los vinos con velo				
						pH	Alcohol (%)	SO <sub>2</sub> (mg/l)		
								libre	total	activo*
2015	Vino bodega <sup>a</sup>	M1	VDLC	<i>Pichia manshurica</i>	+	3,1	10,5			
2016	Vino bodega	M2	nc		+	3,2	11,5	11,50	76,80	0,67
2017	Vino bodega	M1	BVS1	<i>Saccharomyces</i>	-	3,5	12	14,70	60,80	0,41
		M3	BVS3	<i>Saccharomyces</i>	-	3,5	11,5	14,70	74,88	0,41
		M4	nc	NI	+	3,4	11,6	12,80	57,00	0,44
	Vino agroindustria <sup>b</sup>	M1	FBV3	<i>Pichia kudriavzevii</i>	+	3,1	9,25	11,50		0,36
2018	Vinos bodega	M1	8B	<i>Pichia manshurica</i>	+	3,5	10,7	17,00	-	0,48
		M2	S2	<i>Saccharomyces</i>		3,4	11	12,50	69,76	0,46
		M3	3B	<i>Pichia manshurica</i>	+	3,5	11	16,60	72,96	0,49
			S9	<i>Saccharomyces</i>	-					

\*SO<sub>2</sub> activo se refiere a la concentración real de SO<sub>2</sub> molecular; al pH de los vinos la especie química predominante es el ión SO<sub>3</sub>H. El SO<sub>2</sub> activo se calculó mediante un algoritmo que toma en cuenta el SO<sub>2</sub> libre, la temperatura, el pH y el nivel de alcohol. Los datos corresponden a una temperatura de 20°C. El rango de protección de SO<sub>2</sub> molecular es de 0.4-0.6 mg/l (OV)

<sup>a</sup>Barrera, 2017

<sup>b</sup>Ensayo de microvinificación (20 lts) en la sala de agroindustria con mezclas de uvas de los viñedos de Verón y Galean procesadas en la moledora/despalladora de la bodega.

nc: no crecimiento



**Figura 4.9.** *Pichia manshurica* (cepa 3B). **A.** Colonias en medio WL. **B.** Microfotografía en contraste de fase. **C.** Formación de velo en mosto de Isabella pasteurizado.

#### 4.3.5. Caracterización fisiológica de cepas de levaduras no-*Saccharomyces* aisladas de la fermentación espontánea de Isabella.

Las cepas de levaduras no-*Saccharomyces* aisladas durante las microvinificaciones fueron evaluadas en relación a la fermentación del mosto de Isabella pasteurizado. Un problema que ocurrió al momento de seleccionar las cepas fue la pérdida de viabilidad de numerosos aislamientos de no-*Saccharomyces*, principalmente las identificadas como *S. bacillaris*. La pérdida de viabilidad durante la crioconservación de cepas no-*Saccharomyces* aisladas de la fermentación vínica es poco mencionada en la literatura, pero es conocido que la supervivencia de las levaduras a diferentes métodos de conservación varían entre especies y cepas (Câmara & Sant'Ana, 2021). Diferente fue la situación con las cepas *Saccharomyces*, que mantuvieron viabilidad en el mismo período de tiempo durante la crioconservación. En general, esta especie tolera la criopreservación en glicerol a

-80°C sin cambios genéticos o fenotípicos (Gujjari, et al., 2010). La población existente de una determinada especie en cierto momento de la fermentación no es genéticamente homogénea, sino que en realidad cada especie es una mezcla de diferentes clones que pueden expresar diferencias genéticas y fenotípicas (Esteve-Zaroso et al., 2000; Clemente-Jimenez et al., 2004; Mercado et al., 2010; Masneuf-Pomarede et al., 2015). En este trabajo no se realizó una tipificación molecular para seleccionar cepas específicas; las cepas de las diferentes especies se seleccionaron al azar considerando el año de fermentación, las diferentes réplicas y su presencia en las distintas etapas de la fermentación (Tabla 4.5).

**Tabla 4.5.** Cepas de levaduras empleadas en los ensayos de fermentación con mosto pasteurizado.

Especie	N	v15	v16	v17
<i>H. uvarum</i>	15	R1: VD8.2A	R1: 160, 166, 269, 270 R2: 263, 139, 289, 294, 295 R3: 306, 312, 313	R1: 2J R2: 2H
<i>S. bacillaris</i>	6	R1: VD8.35B R2: VD5.1N, VD5.1D	R3: 194	R1: 4dJ R3: 2dF
<i>P. kudriavzevii</i>	7	R1: VD8.28B, V1T.42D R2: VD8.31B, V1T.44F, VD8.33C R3: VD8.33A		Agroindustria: FVB3
<i>P. terricola</i>	9	R1: VD5.5A, VD5.5C, VD5.35B R2: VD2.32D R3: VD2.5D, VD2.5C		R1: 5G, K R3: 5P
<i>P. occidentalis</i>	5	R1: VD8.5A R2: VD2.5C, VD2.5A	R1: 197, 200	
<i>P. manshurica</i>	2	Bodega: VDLC		Bodega: B3
<i>C. albicans</i>	1	R1: VD2.4F		

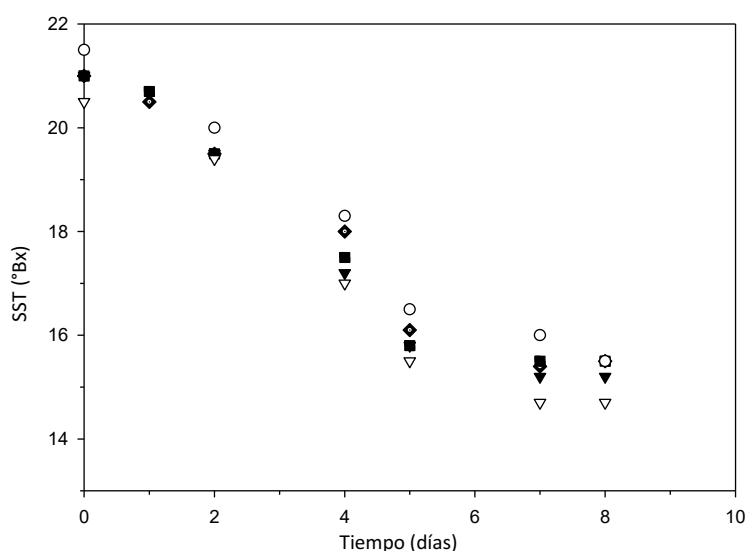
N: número de cepas testeadas; R: réplica; VD2: 2 días de fermentación; VD5: 5 días de fermentación; VD8: 8 días de fermentación (descube); V1T: trasiego

Para el test de fermentación todas las cepas fueron previamente cultivadas aeróbicamente en el medio inóculo (erlenmeyer agitado con mosto v18 diluido al 40%) donde se obtuvieron recuentos superiores a  $10^8$  levaduras/ml. El crecimiento aeróbico garantiza la síntesis adecuada de esteroides y ácidos grasos insaturados y asegura un buen inicio de la fermentación cuando las cepas entran en anaerobiosis (Rosenfeld et al., 2003; Ishtar Snoek & de Steensma, 2007).



#### 4.3.6. Reproducibilidad de los ensayos de fermentación.

Uno de los factores a considerar en los ensayos con diferentes cepas fue la variabilidad de los tests de fermentación. Para estimar la varianza de los tests se llevaron a cabo tres ensayos independientes con la cepa 160 de *H. uvarum*; esto implicó que cada ensayo representó un nuevo lote de uvas, procesamiento y pasteurización del mosto, preparación del inóculo e incubación. Uno de estos tres ensayos se realizó con tres réplicas, es decir, tres frascos con el mismo mosto pasteurizado, el mismo inóculo, e incubados en forma simultánea. La fermentación se monitoreó durante 8 días midiendo los °Bx. En la Figura 4.10 se muestra la cinética de fermentación de la cepa 160 en los tres 3 ensayos independientes.

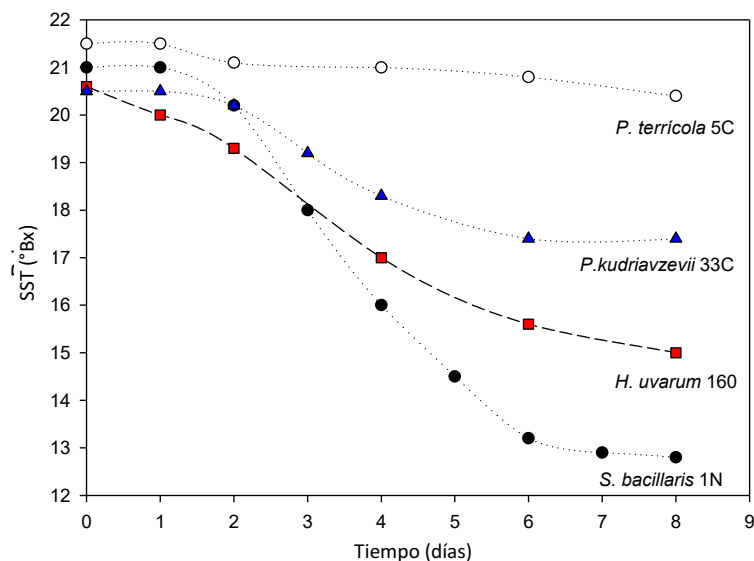


**Figura 4.10.** Fermentación del mosto de Isabella pasteurizado por la cepa de *H. uvarum* 160. Los tres símbolos negros representan la fermentación de Isabella por triplicado a partir del mismo mosto e inóculo; los círculos y triángulos blancos son fermentaciones independientes con una sola repetición. Inóculo  $10^5$  levaduras/ml. Temperatura  $28 \pm 1$  °C.

La variabilidad de los °Bx de todas las fermentaciones fue baja, con un coeficiente de variación (CV) máximo de 2,3% en la muestra de 4 días. Al considerar solo las réplicas, este valor se incrementó al 3,1%. Una situación similar se observó con otras variables de la fermentación, ya que la variación total en los °Bx finales, el consumo de azúcar y la concentración de los productos fueron del mismo orden (CV 3,6%), excepto la concentración de acético (Tabla 4.6).

A partir de los datos de desviación estándar de las variables de fermentación obtenidos en el ensayo de reproducibilidad anteriormente descrito, se pudo estimar la cantidad de réplicas de fermentación necesarias para establecer si existen diferencias significativas o no entre dos cepas. Así por ejemplo, si la producción de alcohol de dos

cepas *H. uvarum* fue 5,1% y 5,5%, y teniendo en cuenta que la desviación estándar de los datos de alcohol fue 0,17, entonces se necesitarían al menos cuatro réplicas por cada cepa para establecer si existen diferencias significativas entre los datos de alcohol de ambas cepas para un p de 0,05. Por lo tanto, aumentar la cantidad de cepas implicaría realizar una gran cantidad de fermentaciones. Sin embargo, debido a las limitaciones impuestas por la disponibilidad de mosto v18, se optó por llevar a cabo una única fermentación con cada cepa y establecer un rango (mínimo-máximo) para cada variable de la fermentación como parámetro de dispersión entre las cepas de una misma especie, y el valor de la mediana como el valor central de dichos datos, es decir, un 50 % de las cepas se encuentran entre el mínimo y la mediana y el otro 50 % entre la mediana y el máximo. De esta manera, los ensayos de fermentación permitieron realizar una caracterización global del comportamiento de cada especie, sin tener en cuenta la variabilidad intraespecífica. A continuación se describen los resultados obtenidos para las cepas de las diferentes especies no-*Saccharomyces* (los resultados de las cepas *Saccharomyces* se presentan en el capítulo 5). En la Figura 4.11 se presenta las cinéticas de disminución de los °Bx en mosto pasteurizado de Isabella de las cepas representativas de las principales especies de levaduras no-*Saccharomyces* aisladas de la fermentación espontánea. La mayor disminución de los °Bx se observó en *S. bacillaris*, lo que indicó que posee una mayor capacidad fermentativa que *H. uvarum*. Por su parte, la única especie de *Pichia* que mostró una actividad fermentativa manifiesta fue *P. kudriavzevii*. Tanto *P. terricola* como *P. occidentalis* pueden considerarse especies no fermentativas.



**Figura 4.11.** Fermentación del mosto de Isabella pasteurizado por cepas de diferentes especies de no-*Saccharomyces* aisladas de la fermentación espontánea. Inóculo  $10^5$  levaduras/ml. Temperatura  $28 \pm 1$  °C.

**Tabla 4.6.** Azúcar residual y productos de fermentación de la cepa *H. uvarum* 160 en diferentes ensayos de fermentación.

Ensayo	Repetición	Brix iniciales	Brix finales	Azúcar residual ( G+F) (g/l)	Azúcar consumido	Alcohol (%)	Glicerol (g/l)	Acético (g/l)	Succínico (g/l)
F1	1	21	15,4	109	94	5,1	3,9	0,58	-
	2	(203)*	15,5	117	86	5,3	4	0,71	1,23
	3		15,2	111	92	5,5	4	0,63	0,72
F2	1	21,5 (209)*	15,5	121	88	5,4	3,8	0,61	0,68
F3	1	20,5 (198)*	14,9	104	94	4,0**	3,8	-	0,74
	<b>media</b>		15,3	112	91	5,2	3,9	0,63	0,71
	<b>DE</b>		0,25	6,7	3,6	0,17	0,1	0,06	0,03
	<b>CV</b>		1,70%	6%	4%	3,20%	2,60%	9,50%	4,20%

\* Azúcar inicial estimado de los Brix (INV, Res c.38/2002); \*\*probable error analítico; G glucosa; F fructosa; CV Coeficiente de variación (DE / media) x 100)

### ***Hanseniaspora uvarum.***

El análisis por HPLC del azúcar residual y los principales productos de fermentación de *H.uvarum* se detallan en la Tabla 4.7. El azúcar total fermentado varió entre 80 y 106 g/l (46,5% en promedio), siendo la glucosa y fructosa consumidas en cantidades equivalentes (test t,  $p < 0,05$ ). Los valores de los productos de fermentación se encontraron en el siguiente rango: etanol 4,0-5,3%, CO<sub>2</sub> (estimado indirectamente por pérdida de peso) ~ 4%, glicerol 3,3-4,2 g/l, succínico 0,19-1,0 g/l y acético 0,19-0,63 g/l. La relación etanol/glicerol (p/p) promedio fue de 10,0. La estequiometría de la fermentación alcohólica indica un rendimiento máximo de 0,49 g de CO<sub>2</sub> y 0,51 g de etanol por cada g de azúcar fermentado; en otras palabras, si no se produce biomasa u otro producto de fermentación, la relación en peso CO<sub>2</sub>/etanol teórico es 0,96. Sin embargo, en la práctica, esta relación es mayor, ya que durante la síntesis de biomasa y ciertos productos metabólicos ocurren reacciones de descarboxilación (Van Dijken & Scheffers, 1986). La relación en peso CO<sub>2</sub>/etanol obtenida fue 1,05, lo que coincidió con el valor global reportado por Schulze et al., (1996) para cepas de *Saccharomyces*. El recuento total final fue de  $5 \times 10^7$  levaduras/ml. La estimación del peso seco de biomasa en función de dicho recuento y en base a datos bibliográficos fue de 1,5 g/l (González-Robles et al., 2015).

Para una mejor visualización y análisis de la estequiometría de la fermentación alcohólica resultó conveniente expresar la cantidad de producto formado como rendimiento, expresando el mismo como una fracción del C contenido en el azúcar metabolizado. Estos rendimientos se basan en el concepto de C-mol (Roels, 1982). Para el cálculo de rendimiento no se consideró el C que aportó el YAN, que proviene principalmente de los aminoácidos. Como era de esperar, cerca del 90% del C proveniente del azúcar quedó retenido en el etanol y el CO<sub>2</sub>, 4% en el glicerol, 2% en la biomasa y cerca del 1,5% en la suma de los ácidos acético y succínico. El rendimiento de alcohol fue un 84% del máximo teórico, que es 66%. El balance de C debería ser teóricamente 1,0, aunque en la práctica se acepta un error de  $\pm 0,5$  % (Roels, 1982). En este caso fue 0,94, lo que sugiere la presencia de algún producto de fermentación que no se determinó, o bien una subestimación en la concentración de algún producto o la biomasa. Una característica de *H. uvarum* fue la presencia en los mostos fermentados de un aroma semejante al esmalte de uñas, cuya intensidad dependió de la cepa, variando entre suave a intenso. El compuesto responsable de este flavor solventogénico sería el acetato de etilo, que puede tener un impacto positivo en vinos en concentraciones de hasta 60-80 mg/l, pero que genera el defecto

(esmalte de uñas) a concentraciones mayores a 150 mg/l (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Diversos trabajos han mostrado que *H. uvarum* tiende a producir altas concentraciones de acetato de etilo, en el rango de 130-2000 mg/l (Ciani & Maccarelli, 1998).

### ***Starmerella bacillaris*.**

En la tabla 4.8 se muestran los datos de consumo de azúcar y de los productos de fermentación con el correspondiente balance de C para *S. bacillaris*. Se observaron diferencias importantes respecto a *H. uvarum*. En consistencia con su mayor capacidad fermentativa, la especie *S. bacillaris* produjo mayor cantidad de alcohol (~7,3-9,0%), con un rendimiento incluso superior (62% vs 55%). Se caracterizó además por ser fructofílica, ya que consumió preferentemente la fructosa, dejando sin fermentar un 70% de la glucosa inicial. Otra característica distintiva fue la alta producción de glicerol, del orden de 10 g/l, con un rendimiento que duplicó al de *H. uvarum*. Por otra parte, la producción de ácido acético se consideró intermedia.

El crecimiento de *S. bacillaris* estimado por recuento en cámara fue del orden de  $1,1 \times 10^8$  levaduras/ml. El peso seco de biomasa en función de dicho recuento y en base a datos bibliográficos se estimó en 1,1 g/l (Englezos et al., 2018), un valor inferior al estimado para *H. uvarum*, lo que es consistente con una mayor producción de alcohol y glicerol. Cabe mencionar que los recuentos de levaduras totales finales fueron mayores en *S. bacillaris* que en *H. uvarum*, pero las células de *S. bacillaris* son de menor tamaño, lo que explicaría su menor peso final de biomasa.

En la figura 4.12 se muestran los cromatogramas HPLC del mosto fermentado por ambas especies de levaduras. Los picos muy pequeños que no se aprecian claramente y en los cuales está marcado el tiempo de retención, se cuantificaron aumentando la resolución de la escala cuando se programó la integración para el cálculo de las áreas. Algunos compuestos detectados por HPLC no se identificaron, pero según las áreas de sus picos, su concentración fue menor a 0,2 g/l. En el cromatograma del mosto fermentado por *S. bacillaris* no se detectó fructosa; además, el pequeño pico con un tiempo de retención ( $t_r$ ) de 10,2 minutos corresponde al ácido málico, que solo es visible cuando la concentración de fructosa es menor a 5 g/l. Si bien la escala del cromatograma se ajusta automáticamente, se aprecia claramente la diferencia en la producción de glicerol ( $t_r$  13,9 min) entre ambas especies de levaduras. En el cromatograma de la cepa 166 de *H. uvarum* no se detectó succínico ( $t_r$  12,5 min.).

**Tabla 4.7.** Características fermentativas de cepas *H. uvarum* en mosto de Isabella.

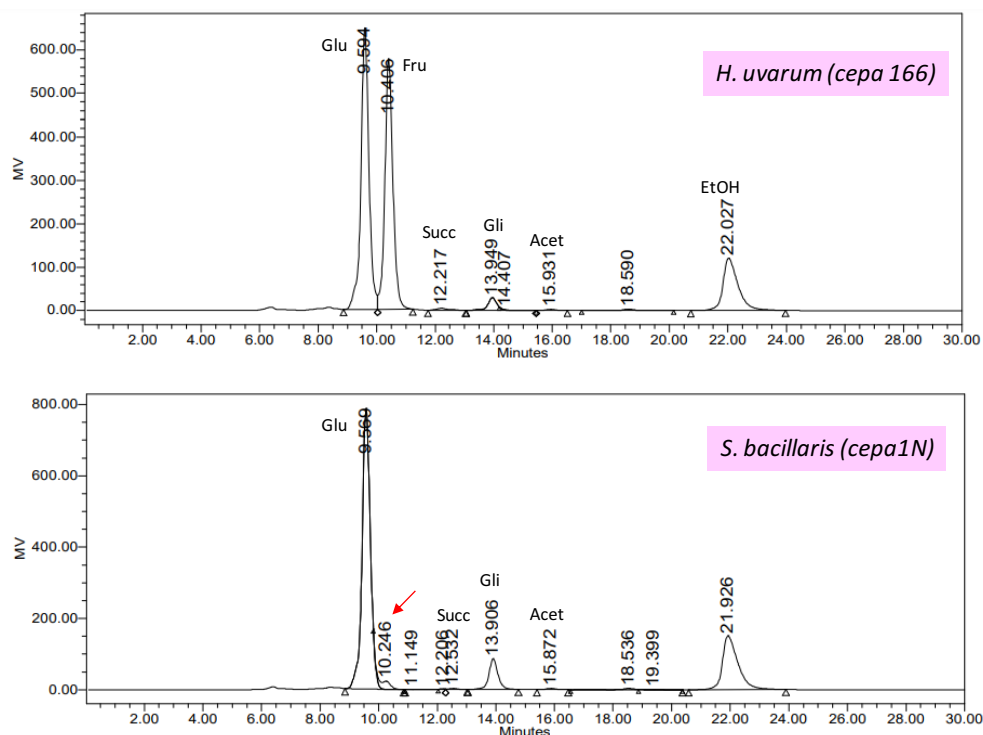
Especie	Brix final*	Azúcar residual			Consumo azúcar $\Delta S$ (g/l)**	Rto total final (10 <sup>7</sup> cél./ml)	Biomasa (g/l)	Etanol (% v/v)	Glicerol (g/l)	Ác. succínico (g/l)	Ác. acético (g/l)	CO <sub>2</sub> (g/l)	Relación CO <sub>2</sub> /alcohol (g/g)	
		Glucosa (g/l)	Fructosa (g/l)	$\Sigma$ glucosa + fructosa										
<i>H. uvarum</i> n = 15	Mediana	15,1	57	54	112	89	5,6	1,5****	4,8	3,7	0,6	0,58	40	1,05
	[mín-máx]	14,2-16,2	50-63	44-67	94-119	80-106	3,0-7,8		4,0-5,3	3,3-4,2	0,19-1,0	0,07-0,63***		
							Rendimientos (C-mol/C-mol)					Balance de C		
							$\Delta S$ (C-mol/l)	$Y_{biomasa}$	$Y_{alcohol}$	$Y_{gli}$	$Y_{succ}$	$Y_{acet}$	$Y_{CO_2}$	$\Sigma y_i$
							2,95	0,019	0,56	0,041	0,0069	0,0065	0,31	0,94

\*Sin corrección por alcohol. \*\*Brix inicial 20,5-21,0 (~ 200 g azúcar/l). \*\*\*Límite cuantificación (LC) 0,17 g/l; las cepas 270 y 295 dieron valores inferiores al LC, pero mayores al índice de detección (ID) 0,07 g/l. \*\*\*\*Peso seco de biomasa estimado de González Robles et al., 2015. La base para el cálculo de rendimientos ( $y_i$ ) es el C- mol (Roels, 1983). C-mol azúcar: 30 g; C-mol biomasa 25,9; C-mol etanol 23 g; C-mol glicerol 30,66 g; C-mol succínico 29,5 g, C-mol acético 30 g; C-mol CO<sub>2</sub> 44 g.  $y_i$  (rendimientos C-mol/C-mol): fracción del C contenido en el azúcar contenido en los productos de fermentación. El balance de C debe ser cercano a 1,0. n: número de cepas evaluadas.

**Tabla 4.8.** Características fermentativas de cepas *Starmarella bacillaris* en mosto de Isabella

Especie	Brix final*	Azúcar residual			Consumo azúcar ΔS (g/l)**	Rto total final (10 <sup>7</sup> cél./ml)	Biomasa (g/l)	Etanol (% v/v)	Glicerol (g/l)	Ác. succínico (g/l)	Ác. acético (g/l)	CO <sub>2</sub> (g/l)	Relación CO <sub>2</sub> /alcohol (g/g)
		Glucosa (g/l)	Fructosa (g/l)	Σ glucosa + fructosa									
Mediana	12,3	66	<LD	66	131-149	1,15	1,1***	8,1	10,05	0,485	0,65	64,5	1
[mín-máx]		64-70			4,2-6,25	4,2-6,5	7,3-9,0	10-11	0,43-0,58	0,54-0,77	63,3-64,5		
<b>S. bacillaris</b> n = 6													
							<b>Rendimientos (C-mol/C-mol)</b>					<b>Balance de C</b>	
					<b>ΔS (C-mol/l)</b>		<b>Y<sub>biomasa</sub></b>	<b>Y<sub>alcohol</sub></b>	<b>Y<sub>gli</sub></b>	<b>Y<sub>succ</sub></b>	<b>Y<sub>acet</sub></b>	<b>Y<sub>co2</sub></b>	<b>Σ yi</b>
					4,5		0,0094	0,62	0,076	0,0036	0,0046	0,32	1,03

\*Sin corrección por alcohol. \*\*Brix inicial 20,5-21,0 (~ 200 g azúcar/l). LD: Límite de detección\*\*\*Peso seco de biomasa estimado de Englezos et al., 2018. La base para el cálculo de rendimientos ( yi ) es el C- mol (Roels, 1983). C-mol azúcar: 30 g; C-mol biomasa 25,9; C-mol etanol 23 g; C-mol glicerol 30,66 g; C-mol succínico 29,5 g; C-mol acético 30 g; C-mol CO<sub>2</sub> 44 g. yi (rendimientos C-mol/C-mol): fracción del C contenido en el azúcar contenido en los productos de fermentación. El balance de C debe ser cercano a 1,0. n: número de cepas evaluadas.



**Figura 4.12.** Análisis por HPLC de muestras de mosto de Isabella fermentado con cepas de *H.uvarum* o *S. bacillaris*. El cromatograma corresponde a una muestra sin diluir. La flecha indica el pico de málico. La escala de señal (MV) es autoajustable. Detector RID Waters 2414.

#### **Levaduras que forman velo (especies del género *Pichia*).**

En las Tablas 4.9 y 4.10 se indican los productos de fermentación en mosto de Isabella pasteurizado de las especies de *Pichia*. *P. kudriavzevii* consumió preferentemente la glucosa, y produjo una cantidad moderada de etanol (3,0-4,8%), glicerol (2,7-3,6 g/l) y casi 1,0 g/l de la suma ácido succínico + ácido acético. La estimación del crecimiento mediante recuento presentó cierta complicación debido a la dificultad para dispersar las células que forman parte del velo. Por este motivo, la biomasa producida (~ 2,0 g/l) se estimó del trabajo de Wang et al (2014), a partir de un cultivo de *P. kudriavzevii* en el cual se consumió la misma cantidad de azúcar y se produjo una cantidad equivalente de etanol.

Por su parte, *P. terricola*, *P. occidentalis* y *P. manshurica* consumieron únicamente glucosa y produjeron mínimas cantidades de etanol (< 0,6 %). En la misma tabla se muestran los datos de fermentación de *C. albicans*, que no es una levadura vínica si no más bien un contaminante. Esta especie fermentó tanto glucosa



como fructosa, y la cantidad de alcohol producida fue intermedia entre *P. kudriavzevii* y el resto de las especies de *Pichia*.

Realizar un balance de C con las cepas poco fermentativas tiene poco valor debido al error que introduce el cálculo del consumo de azúcar y las determinaciones del HPLC, ya que las concentraciones de etanol, por ejemplo, se encuentran cercanas al límite de detección (0,44%). El comportamiento fermentativo de estas especies se aprecia mejor en los cromatogramas (Figura 4.13). Sólo *P. kudriavzevii* y *C. albicans* evidenciaron consumo de glucosa y producción de etanol, mientras que en los cromatogramas de *P. terricola*, *P. occidentalis* y *P. manshurica* la glucosa y fructosa presentaron los mismos picos, siendo el pico del glicerol el único pico de producto de fermentación discernible en el cromatograma.

**Tabla 4.9.** Características fermentativas de cepas *P. kudriavzevii* en mosto de Isabella.

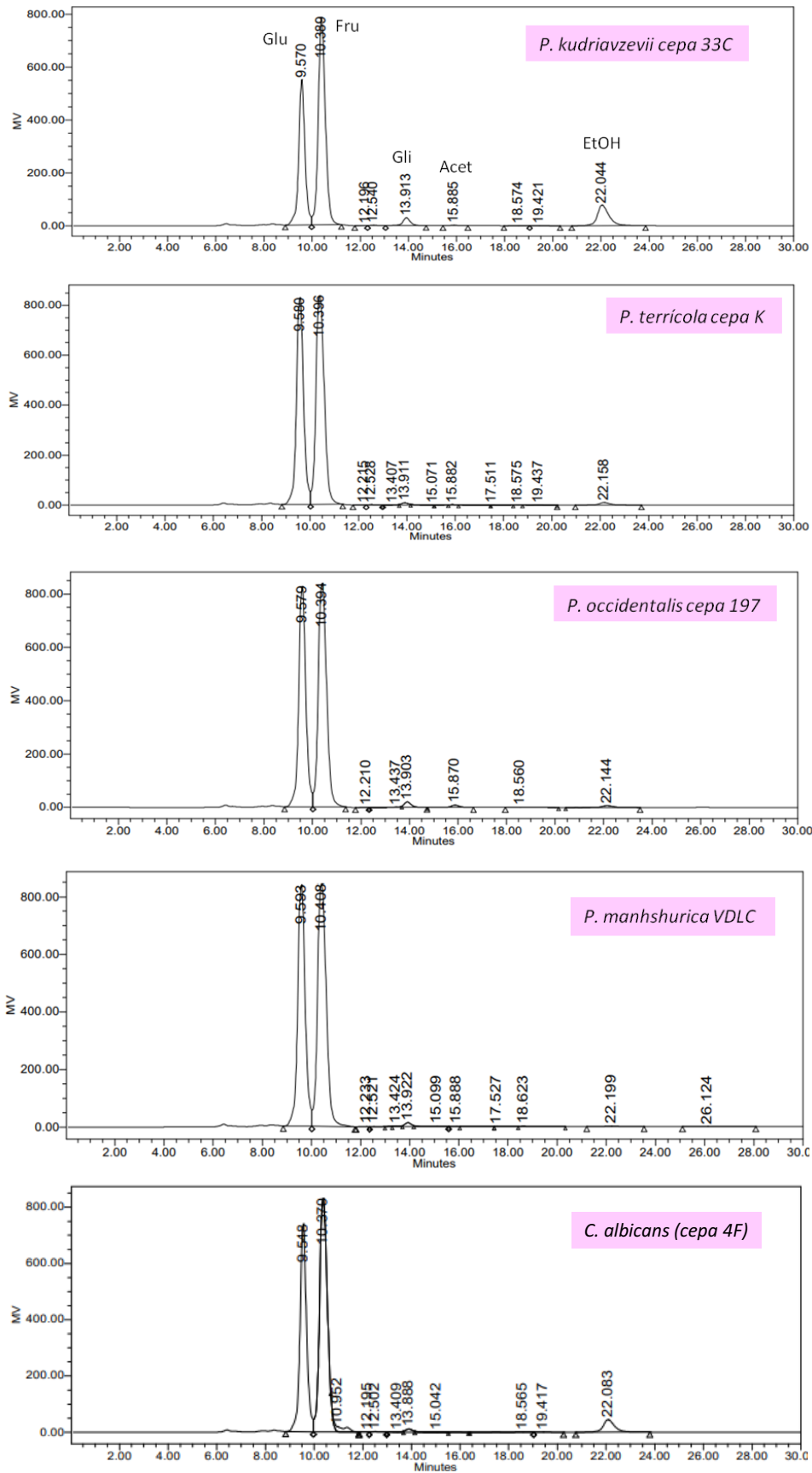
Especie	Brix final*	Azúcar residual			Consumo azúcar $\Delta S$ (g/l)**	Rto total final (10 <sup>7</sup> cél./ml)	Biomasa (g/l)	Etanol (% v/v)	Glicerol (g/l)	Ác. succínico (g/l)	Ác. acético (g/l)	CO <sub>2</sub> (g/l)	Relación CO <sub>2</sub> /alcohol (g/g)	
		Glucosa (g/l)	Fructosa (g/l)	$\Sigma$ glucosa + fructosa										
<i>P. kudriavzevii</i> n = 7	Mediana	15,3	54	92	61	0,8	~ 2,0 ***	3,4	3,5	0,3	0,52	30	1,1	
	[mín-máx]	14,2-16,2	50-65,5	85-97	40,5-65			3,0-4,8	2,85-3,7	0,27-0,37	0,42-0,54			
							Rendimientos (C-mol/C-mol)					Balance de C		
							$\Delta S$ (C-mol/l)	$y_{biomasa}$	$y_{alcohol}$	$y_{gli}$	$y_{succ}$	$y_{acet}$	$y_{CO_2}$	$\Sigma y_i$
							2	0,039	0,58	0,057	0,005	0,009	0,3	1

\*Sin corrección por alcohol. \*\*Brix inicial 20,5-21,0 (~ 200 g azúcar/l). \*\*\*Peso seco de biomasa estimado de Wang et al., 2014. La base para el cálculo de rendimientos ( $y_i$ ) es el C- mol (Roels, 1983). C- mol azúcar: 30 g; C-mol biomasa 25,9; C-mol etanol 23 g; C-mol glicerol 30,66 g; C-mol succínico 29,5 g, C-mol acético 30 g; C-mol CO<sub>2</sub> 44 g.  $y_i$  (rendimientos C-mol/C-mol): fracción del C contenido en el azúcar contenido en los productos de fermentación. El balance de C debe ser cercano a 1,0. n: número de cepas evaluadas.

**Tabla 4.10.** Características fermentativas de cepas de especies pertenecientes al género *Pichia* y de *C. albicans* en mosto de Isabella.

Especie	Brix final*	Azúcar residual		Etanol (% v/v)	Glicerol (g/l)	Ác. succínico (g/l)	Ác. acético (g/l)	
		Glucosa (g/l)	Fructosa (g/l)					
<i>P. terricola</i> n = 9	Mediana	20,4	87	105	0,62	1,24	0,33	0,48
	[mín-máx]		82-89	100-111	0,52-0,71	1,11-1,45	0,29-0,38	0,41-0,52
<i>P. occidentalis</i> n = 5		19,3	80-85	99-100	0,31-0,38	2,5-2,9		1,95
<i>P. manshurica</i> n = 2		19,5-20	81-84	104	0,16-0,26	1,7-2,7		
<i>C. albicans</i> n = 1		17,5	63,7	85	2,17	1,42		

\*Sin corrección por alcohol. Brix inicial 20,5-21,0 (~ 200 g azúcar/l). n: número de cepas evaluadas. Para las cepas diferentes a *P. terricola*, cuando se indica un solo valor es porque coinciden en ambas fermentaciones (cuando n=2) o porque solo se ensayó una cepa (n=1).



**Figura 4.13.** Cromatograma de HPLC de mostos de Isabella fermentados por especies de *Pichia* sp. y *C. albicans*. Tiempo de fermentación 8 días. Detector RID Waters 2414.

#### 4.4. Discusión y conclusiones.

Para conocer la microbiología de la fermentación espontánea de Isabella en v15, v16 y v17, se aislaron e identificaron diferentes especies de levaduras en base a características morfológicas y moleculares. La selección de morfotipos en el medio WL implica cierto sesgo, ya que se “seleccionan” las especies más frecuentes y de crecimiento más rápido. Esto se traduce en una dificultad para detectar colonias que representan menos del 1% de la población, o que crecen lentamente en el medio (Barata et al., 2012). Por lo tanto, los resultados de la identificación de las levaduras solo mostraron una aproximación a lo que realmente fue la diversidad microbiológica durante la fermentación espontánea del vino.

Los ensayos con mosto pasteurizado de Isabella se realizaron con el fin de conocer las principales propiedades fermentativas de las diferentes especies de levaduras. Esta información es importante para analizar su posible rol en la fermentación espontánea; sin embargo, debe considerarse que los ensayos consistieron en cultivos puros y que el comportamiento fisiológico y bioquímico de las cepas puede variar en las condiciones reales de la fermentación, ya que las interacciones entre las especies microbianas juega un rol fundamental en la evolución de la fermentación (Comitini et al., 2021).

Los resultados del análisis microbiológico mostraron que la fermentación espontánea de Isabella fue llevada a cabo por levaduras vínicas comunes en la fermentación de las uvas viníferas (Bisson & Walker, 2015), y también en variedades no-viníferas como *V. labrusca* (Drumonde-Neves et al., 2016), y la propia Isabella cultivada en Colonia Caroya (Eder et al., 2017). En términos globales, *H. uvarum* fue la especie no-*Saccharomyces* dominante en las fases temprana y media de la fermentación espontánea, seguida por *S. bacillaris*, especie que bajo ciertas condiciones predominó sobre *H. uvarum*, como ocurrió en la parada de la fermentación v15. En bibliografía se ha reportado con frecuencia que *H. uvarum* y *S. bacillaris* representaron más del 90% de la población de levaduras no-*Saccharomyces* en la fermentación espontánea de diferentes variedades de *V. vinifera*. Los resultados de la fermentación en mosto pasteurizado de Isabella mostraron diferencias metabólicas importantes entre *S. bacillaris* y *H. uvarum*. La propiedad *S. bacillaris* de ser una levadura fructofílica y de producir una alta concentración de glicerol (Englezos et al., 2015), fue confirmada con las diferentes cepas ensayadas. En términos de rendimiento, la producción de glicerol por *S. bacillaris* duplicó a *H. uvarum* (0,076 a

0,04), y fue incluso mayor que la producida por cepas de *Saccharomyces* en el mismo mosto (ver capítulo 5). La capacidad fermentativa de esta especie fue alta (tomando como referencia *Saccharomyces*) ya que produjo entre 8-9% de alcohol, mientras que *H. uvarum* exhibió una capacidad fermentativa media (4-5% de alcohol). En términos globales, los niveles de alcohol y ácidos orgánicos producidos por las cepas de ambas especies se encontraron dentro de los rangos reportados en bibliografía para mostos con 20 °Bx; no obstante, hay que tener precaución al hacer las comparaciones, ya que puede haber ciertas diferencias según las condiciones de fermentación (Ciani & Macarrelli, 1997; De Benedictis et al., 2011; Englezos et al., 2015). Los resultados de los ensayos de fermentación con estas levaduras podrían explicar lo que ocurrió en v15. *H. uvarum* fue la levadura predominante al principio y en la fase media de la fermentación, compartiendo el mosto/vino con una población significativa de *S. bacillaris* (26–30%). Debido al escaso crecimiento de *Saccharomyces*, la fermentación se ralentizó, ya que *H. uvarum* fue incapaz de seguir fermentando el azúcar debido a la concentración inhibitoria de alcohol. Esta situación permitió que *S. bacillaris*, con mayor capacidad fermentativa y mayor tolerancia al alcohol, colonizara el mosto; sin embargo, al final, no logró competir con *Saccharomyces* y su prevalencia en el vino fue solo transitoria. Esta sucesión de especies no-*Saccharomyces* dada por sus diferentes tolerancias al creciente stress que va imponiendo la fermentación alcohólica, es una característica distintiva de la fermentación espontánea del vino (Combina et al., 2005).

En *Saccharomyces*, y seguramente otras especies, la producción de glicerol durante la fermentación alcohólica se explica por la imposibilidad de la levadura de intercambiar equivalentes de reducción entre NADH y NADP<sup>+</sup>, o viceversa, debido a la ausencia de actividad transhidrogenasa y a la compartimentación de las reacciones redox (citosol/mitocondria) (van Dijken & Scheffers, 1986 ; Rodriguez et al., 2006). La levadura emplea intermediarios de C para el anabolismo, en particular para la biosíntesis de aminoácidos (AA) y nucleótidos (Albers et al., 1998), y además excreta ácidos orgánicos (pirúvico) al medio (Schulze et al., 1986); por lo tanto, el NADH citosólico generado durante la formación de estos intermediarios y que no puede ser reoxidado mediante la formación de etanol, se deriva a la producción de glicerol, cuya ruta consume NADH a partir de la reducción del intermediario glicolítico dihidroxiacetona fosfato a glicerol-3-P. La posterior hidrólisis del glicerol-3-P genera glicerol, el cual se exporta al medio. En otras palabras, el flujo de C vía glicerol es la principal ruta metabólica, luego del etanol, para cerrar el balance redox en el

metabolismo global de la levadura. Es interesante señalar que *S. bacillaris* presenta restricciones para consumir aminoácidos (AA) del medio, más aún, produce y excreta al medio ciertos aminoácidos, en particular los ramificados (Englezos et al., 2018). Una posible hipótesis para explicar la alta producción de glicerol por esta levadura es que la producción de AA “extras” a los que requiere para sintetizar biomasa implica una mayor necesidad de reoxidar NADH, lo que genera un aumento del flujo de C por la ruta del glicerol. La producción de glicerol en la fermentación alcohólica tiene un costo energético de un mol de ATP por mol de glicerol producido. Las levaduras pueden emplear otras rutas menores para cerrar el balance redox, como la formación de acetoína y 2,3-butanodiol, que consumen NADH y no implican un gasto energético (ATP), ya que se forman a partir de piruvato (Romano & Suzzi, 1996). La producción de acetoína puede ser vista también como un mecanismo de desintoxicación, ya que compite con la formación de etanol (Romano & Suzzi, 1996). La concentración de estos metabolitos en los mostos fermentados de Isabella no se determinó.

Algunos estudios han demostrado que tanto *H. uvarum* como *S. bacillaris* pueden permanecer en bodega y estar presentes en el mosto al momento de la vinificación (Grangenteau et al., 2016). Esta observación debe ser tomada en cuenta en futuros estudios sobre la fermentación de Isabella en las instalaciones de la Cooperativa.

Las levaduras del género *Pichia* han sido habitualmente aisladas de la fermentación vínica (Hierro et al., 2006). *P. terricola* fue la principal especie que estuvo presente en la fermentación espontánea de Isabella, aunque su permanencia en el mosto/vino estuvo limitada a la fase de latencia, seguramente por su mínima resistencia al alcohol. Algo similar ocurrió con *P. occidentalis*, aunque con un crecimiento menor que *P. terricola*. Estas levaduras son más bien aeróbicas que fermentativas, como se demostró en los ensayos de fermentación, y su rol en la fermentación vínica es relativo, ya que simplemente están en la baya y pueden crecer en forma limitada al principio de la vinificación.

Existen pocos datos sobre *P. kudriavzevii* y la fermentación del vino. Es una levadura frecuentemente encontrada en diversos alimentos fermentados y frutas, incluyendo la uva y vinos de naranja (Choi et al., 2017, Chan et al., 2012; Liu et al., 2015; Nyanga, et al., 2013), y es la principal levadura responsable del deterioro del kimchi sobrefermentado (Moon et al., 2014). Algunos estudios han mostrado cierta asociación de la especie con un territorio vitícola específico, por ejemplo, Patagonia Norte (del Mónaco et al., 2016). Metaboliza el ácido málico, y de ahí su potencial uso

enológico para desacidificar vinos (del Mónaco et al., 2014). Por otra parte, la capacidad de formación de biofilms estaría asociada a su capacidad para inhibir a diversos patógenos poscosecha de frutos (Chi et al, 2015). Su presencia en la parada de fermentación v15 debe ser considerada en el contexto de una fermentación incompleta, con concentración de alcohol baja, que dio lugar a la proliferación de especies de levaduras que no hubiesen estado presentes en una fermentación normal. A diferencia de *P. terricola* y *P. occidentalis*, *P. kudriavzevii* es una levadura con cierta capacidad fermentativa, pero su producción de alcohol es algo inferior a *H. uvarum*. *P. kudriavzevii* podría considerarse una levadura natural de los viñedos de Isabella siendo capaz de formar velo bajo ciertas condiciones, como ocurrió en los vinos elaborados en la agroindustria. Su ausencia o no detección en las fermentaciones v16 y v17 probablemente se deba a la rápida colonización del mosto por *Saccharomyces*.

Las levaduras de la fermentación espontánea de Isabella han sido estudiadas en otras regiones vitícolas. En Colonia Caroya (vendimia 2015), Raymond Eder et al., (2017) aisló numerosas especies de levaduras no-*Saccharomyces* de la fermentación de un mosto de Isabella con 16 °Bx. Los recuentos de no-*Saccharomyces* variaron poco desde el inicio hasta las 48 hs ( $10^6$  UFC/ml), período durante el cual fueron aisladas las especies de no-*Saccharomyces*. La principal levadura de este grupo encontrada en esta etapa (0-24 hs) fue *S. bacillaris*, (72%), y en segundo lugar *H. uvarum* (~20%). Otras levaduras identificadas fueron especies pertenecientes a los géneros *Candida*, *Lachancea*, *Torulospora*, *Pichia* y *Hanseniospora* (vineae), lo que indicó una mayor diversidad de especies que la encontrada en este trabajo. Todas estas especies fueron sustituidas por *S. cerevisiae* a partir de las 48 hs de fermentación, y el tiempo total de vinificación fue de 5 días. Entre las no-*Saccharomyces* minoritarias aisladas en Colonia Caroya como *Candida azymoides* y *Pichia cecembesis* tienen como nicho ecológico las uvas de *V. labrusca*, ya que no han sido aisladas de uvas viníferas. En un trabajo posterior con uvas cosechadas en la vendimia 2017 (Raymond Eder et al., 2018), la situación fue diferente, ya que la levadura predominante en las primeras 24 hs de la fermentación espontánea fue *H. uvarum* (90%) la cual se mantuvo viable hasta las 48 hs, cuando fue evidente el predominio de *Saccharomyces*. Entre las especies minoritarias que se identificaron en la misma fermentación estuvieron *P. terricola*, *P.occidentalis* y *P. kudriavzevii*, pero fueron detectadas principalmente al momento de preparar el mosto.

Por su parte, Bezerra-Bussoli et al., (2013) analizaron las levaduras presentes en las bayas de Isabel cultivada en San Pablo, Brasil, en 2009-2010, y encontraron a *H.*

*uvarum* como la principal levadura de la baya (70%), seguida de especies de *Pichia* (30%). Sin embargo, debido a que la fermentación se llevó a cabo con una mezcla de uvas de Isabel y la variedad Bordeaux, no fue posible discernir de que uvas provinieron las levaduras identificadas; no obstante *H. uvarum* fue la especie predominante junto a *P. kluyveri* al inicio de la fermentación. Drumonde-Neves et al., 2016 estudiaron en 2009-2010 la biodiversidad de levaduras en uvas de *V. labrusca* provenientes de viñedos abandonados y en actividad regular, ubicados en las islas Azores. Las especies predominantes fueron *H. uvarum*, *P. terricola*, *S. bacillaris* e *Issatchenkia hanoiensis*, observándose la mayor biodiversidad en los viñedos activos. Globalmente, estos resultados y los obtenidos en este estudio sugieren que si bien pueden existir levaduras comunes en los viñedos de *V. labrusca* y sus híbridos, la evolución de las diferentes especies durante la fermentación espontánea es más bien una cuestión local, que varía en diferentes años, y por lo tanto, difícil de predecir.

Como se mencionó previamente, la formación de velo en botellas del Vino de La Costa es una situación que ocurre con frecuencia. *Pichia manshurica* fue la única especie de levadura aislada de las botellas con velo de la bodega, pero esta levadura no se identificó en la fermentación espontánea llevada a cabo en el laboratorio con uvas traídas directamente del viñedo. Por su parte, en un ensayo de vinificación realizado en la agroindustria (construcción perteneciente a la Cooperativa pero separada de la bodega), se observó que los vinos envasados en damajuanas formaron velo, pero a diferencia de las botellas de la bodega la levadura formadora de velo fue *P. kudriavzevii*, tal como ocurrió en el laboratorio. Este resultado es interesante ya que se podría plantear como hipótesis para futuros estudios que *P. manshurica* coloniza algún nicho particular de la bodega, por ejemplo, la superficie de los filtros, tal como fue observado por Saez et al., (2010).

*P. manshurica* es una especie hermana de *Pichia membranifaciens* (Naumov & Naumova, 2009). Ambas especies pueden producir un deterioro de los vinos debido a la producción de fenoles volátiles en concentraciones que superan el umbral olfatorio, como se ha observado en vinos nordpatagónicos (Saez et al., 2011). *P. manshurica* suele estar presente en bodegas de vinos orgánicos, en los cuales las dosis de SO<sub>2</sub> a lo largo del proceso y en los vinos se mantienen en niveles bajos. Se ha reportado para *P. manshurica* valores de MIC para metabisulfito de potasio de 150 mg/l (70 mg SO<sub>2</sub>/l) en medio sintético con 12% de etanol a pH 3,54, esto implica un SO<sub>2</sub> activo de 2,5 mg/l (<https://www.az3oen.com/calculo-so2-molecular-activo>), valor 5 veces superior al estimado en los vinos con el defecto velo. Si bien la concentración



inhibitoria no fue determinada en una matriz vino, el resultado sugiere que esta especie de levadura es resistente a la concentración de SO<sub>2</sub> empleada.

El origen de *P. manshurica* en la bodega de Berisso se desconoce, pero las prácticas enológicas que actualmente se emplean para vinificar Isabella son insuficientes para evitar la contaminación de las botellas con esta levadura; por lo tanto es necesario planificar una investigación para determinar la fuente de contaminación y caracterizar las cepas aisladas en relación a su tolerancia al SO<sub>2</sub> y otras propiedades bioquímicas.

El grupo *Saccharomyces* sensu stricto comprende un grupo de levaduras *Saccharomyces* que incluye especies de gran importancia en la industria de la fermentación (Boynton & Greig, D, 2014). Dos de estas especies, *S. cerevisiae* y *S. paradoxus*, son muy cercanas genéticamente y comparten muchas características fisiológicas (Martini, 1989). A diferencia de *S. cerevisiae*, que ha sido intensamente domesticada y se encuentra íntimamente asociada a la fermentación del vino, la cerveza y el pan, *S. paradoxus* fue la primera levadura *Saccharomyces* en ser reconocida como especie no domesticada, habiendo sido aislada por primera vez en 1914 del exudado de ciertos árboles en Rusia (Boynton & Greig, 2014). El hábitat natural donde se ha encontrado esta especie con mayor frecuencia es el exudado y la corteza del roble, y el suelo circundante a estos árboles (Naumov et al., 1998; Sniegowski et al, 2002; Borneman & Pretorius, 2015). Debido a esta situación, *S. paradoxus* es considerada una especie más apropiada que *S. cerevisiae* para estudios ecológicos y evolutivos (Boynton & Greig, D, 2014). Si bien los viñedos no son el nicho natural de *S. paradoxus*, ha habido algunos reportes de su presencia en las uvas y la fermentación del vino (Redžepović et al., 2002; Vaudano et al., 2019). De hecho, en los últimos años ha aumentado el interés por emplear inóculos de cepas de *S. paradoxus* en la producción de vinos, debido a ciertas propiedades enológicas específicas que tendrían un impacto positivo en los desafíos a los que se enfrenta la industria vitivinícola actual: el cambio climático y la creciente demanda de productos con perfiles sensoriales novedosos (Álvarez et al., 2023). *S. paradoxus* se caracteriza por su capacidad de secretar endo poligalacturonasas activas (Borovkova et al., 2022) y degradar ácido málico, y en general las cepas tienden a producir mayor cantidad de glicerol y menos alcohol y acidez volátil que *S. cerevisiae* (Costantini et al., 2021). Además, la evaluación sensorial de vinos inoculados con *S. paradoxus* comprobó la influencia positiva de la misma sobre la calidad final del vino (Orlić et al., 2007), resultando en vinos que pueden diferenciarse sensorialmente de los producidos por *S.*

*cerevisiae* (Majdak et al., 2002). Por otra parte, *S. paradoxus* es capaz de completar la fermentación en condiciones de bajo contenido de nitrógeno y alta concentración de fructosa, lo que es de especial interés en la actualidad debido al aumento de la fructosa de la uva respecto a la glucosa como consecuencia del cambio climático (Orlić et al., 2009). Teniendo en cuenta estas consideraciones, el aislamiento de *S. paradoxus* de los mostos fermentados de Isabella es un hallazgo que merece resaltarse, y su potencial uso como cultivo iniciador del Vino de la Costa debe estudiarse con más detalle. Por otra parte, un resultado inesperado fue que la morfología de las colonias en WL de las cepas purificadas de *S. paradoxus* mostraron diferencias discernibles a simple vista con respecto a *S. cerevisiae*, lo que no ha sido reportado en bibliografía e incluso en algunos trabajos no se menciona que haya diferencias morfológicas en las colonias de ambas especies cuando crecen en medio WL (Manzano et al., 2006). Cabe mencionar finalmente que algunos trabajos han considerado otras aplicaciones biotecnológicas de *S. paradoxus* distintas a la producción de vino tinto, como en la fermentación del vino blanco (Orlic et al., 2007), y más recientemente en la fermentación de la cerveza (Nikulín et al., 2020). Estas aplicaciones pueden ser de interés para explorar la fermentación de la cerveza con cepas locales, ya que la producción de cerveza artesanal en la Plata y alrededores es una actividad en continua expansión. Sin embargo, se han reportado una serie de inconvenientes a considerar en el empleo de cepas salvajes de *S. paradoxus*, como la baja viabilidad y capacidad de floculación respecto a cepas comerciales (Nikulín et al., 2020), y la imposibilidad de dominar la fermentación cuando se inocula junto a *S. cerevisiae* (Costantini et al., 2021). Por estos motivos, es necesario realizar más estudios dirigidos a aumentar el conocimiento acerca del comportamiento de *S. paradoxus* en la fermentación, en particular cuando se emplea en cultivos mixtos con *S. cerevisiae* u otra especie de levadura, o cuando se realiza una inoculación secuencial (Costantini et al., 2021).

Barata et al., (2012) clasificó a las especies del consorcio microbiano del vino (levaduras y bacterias lácticas y acéticas) en 3 grupos de acuerdo a su rol en la fermentación, incluyendo a ciertas levaduras fermentativas no-*Saccharomyces*, como *H. uvarum*, *Candida* sp. y las *Pichia* que forman films (film-forming yeasts), como contaminantes o como potencial agentes de deterioro debido a la formación de sabores desagradables o defectos visuales. Sin embargo, las especies de levaduras aisladas de Isabella han sido consideradas en diversas aplicaciones enológicas, como la utilización de inóculos mixtos de *S. cerevisiae* con *S. bacillaris* (Nisiotou et al., 2018;

Englezos et al., 2017; Raymond Eder & Rosa, 2021), *H. uvarum* (Tristezza et al., 2016) o *P.kudriavzevii/Pichia terricola* (Shi et al., 2019) para aumentar la complejidad sensorial del vino. Adicionalmente, *P. terricola* podría ser una fuente de  $\beta$ -glucosidasa activa a pH ácido y resistente a etanol y SO<sub>2</sub>, con potencial aplicación para liberar aromas (Gonzalez-Pombo et al., 2011). Dado que las propiedades enológicas son cepa dependiente, el cepario disponible con las distintas especies de levaduras nativas aisladas de los viñedos de Isabella en Berisso constituye un reservorio de diversidad genética y fenotípica que debe ser tenido en cuenta para futuras aplicaciones en la biotecnología de alimentos.

Se mencionó en el capítulo 3 que los vinos de Isabella obtenidos en la fermentación espontánea v16 fueron de mejor calidad que los obtenidos en v15 y v17, y que esta diferencia se correspondía con diferencias significativas en ciertos parámetros físicoquímicos de las bayas que son relevantes desde el punto de vista enológico. Por otro lado, determinar cuán importante fue el aporte de las levaduras involucradas en la fermentación en la calidad del vino con la información disponible es arriesgado. No obstante, si se considera que la evolución de las diferentes especies microbianas fueron comparables en v16 y v17, entonces la composición (calidad enológica) de la uva fue probablemente el factor más importante que incidió en las cualidades del vino obtenido en estas dos campañas. El caso de v15 es aún más complejo, ya que la fermentación mostró un desarrollo muy diferente a v16 y v17 debido a una lenta colonización del mosto por *Saccharomyces*. La causa de este comportamiento no se investigó, pero justificó en parte la importancia de estudiar la práctica de inoculación para asegurar una fermentación reproducible. Dicho estudio se describe en el capítulo 5.

#### 4.5. Referencias.

Albers, E., Lidén, G., Larsson, C., & Gustafsson, L. (1998). Anaerobic redox balance and nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Recent Res. Dev. Microbiol*, 2, 253-279.

Álvarez, R., Garces, F., Louis, E. J., Dequin, S., & Camarasa, C. (2023). Beyond *S. cerevisiae* for winemaking: fermentation-related trait diversity in the genus *Saccharomyces*. *Food Microbiology*, 113, 104270.

Ansanay-Galeote, V., Blondin, B., Dequin, S., & Sablayrolles, J. M. (2001). Stress effect of ethanol on fermentation kinetics by stationary-phase cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 23(9), 677-681.

Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries, *International Journal of Food Microbiology*, 153(3), 243-259.

Bartowsky, E. J. (2009). Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. *Letters in applied microbiology*, 48(2), 149-156.

Bartowsky, E. J., & Pretorius, I.S. (2009). Microbial formation and modification of flavor and off-flavor compounds in wine. In H König, G Uden., J Fröhlich (eds.) *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine* (pp.209-231), Springer.

Bartowsky, E. J., Costello, P. J., & Chambers, P. J. (2015). Emerging trends in the application of malolactic fermentation. *Australian Journal of Grape and Wine research*, 21, 663-669.

Bezerra-Bussoli, C., Baffi, M. A., Gomes, E., & Da-Silva, R. (2013). Yeast diversity isolated from grape musts during spontaneous fermentation from a Brazilian winery. *Current microbiology*, 67, 356-361.

Belda, I., Ruiz, J., Esteban-Fernández, A., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., & Moreno-Arribas, M. (2017). Microbial contribution to wine aroma and its intended use for wine quality improvement. *Molecules*, 22(2), 189.

Beltran, G., Torija, M., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamon, J., Rozès, N., & Mas, A. (2002). Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: A six year follow-up study. *Systematic and Applied Microbiology*, 25, 287-93. 10.1078/0723-2020-00097

Bisson, L. F., & Walker, G. A. (2015). The microbial dynamics of wine fermentation. In *Advances in Fermented Foods and Beverages* (pp. 435-476). Woodhead Publishing.

Bisson, L.F., Joseph, C.M.L., Domizio, P (2017). Yeasts. In: H, König., G, Uden., & J, Fröhlich (eds.). *Biology of Microorganisms on Grapes, Must and Wines* (pp.65-101), Springer, Cham.

Böhme, K., Barros-Velázquez, J., & Calo-Mata, P. (2019). Molecular tools to analyze microbial populations in red wines. In A, Morata (ed.), *Red Wine Technology* (pp. 115–123). Elsevier.

Bokulich, N.A., Thorngate, J.H., Richardson, P.M., & Mills, D. A. (2014). Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111,139–148.

Borneman, A. R., & Pretorius, I. S. (2015). Genomic insights into the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Genetics*, 199(2), 281-291.

Borovkova, A. N., Shalamitskiy, M. Y., & Hayмова, E. C. (2023). Pectinolytic yeast *Saccharomyces paradoxus* as a new gene pool for winemaking. *Microbiology*, 92(2), 256-268.

Boynton, P. J., & Greig, D. (2014). The ecology and evolution of non-domesticated *Saccharomyces* species. *Yeast*, 31(12), 449-462.

Butzke C. Winemaking problems solved. 1st edition. Sawston:Woodhead Publishing, 2010, pp 432.

Câmara Jr, A. A., & Sant'Ana, A. S. (2021). Advances in yeast preservation: physiological aspects for cell perpetuation. *Current opinion in Food Science*, 38, 62-70.

Cavazza, A., Grando, M.S., & Zini, C. (1992). Rilevazione della flora microbica di mosti e vini. *Vignevini*, 9, 17-20.

Chi, M., Li, G., Liu, Y., Liu, G., Li, M., Zhang, X., ... & Liu, J. (2015). Increase in antioxidant enzyme activity, stress tolerance and biocontrol efficacy of *Pichia kudriavzevii* with the transition from a yeast-like to biofilm morphology. *Biological Control*, 90, 113-119.

Choi, D. H., Park, E. H., & Kim, M. D. (2017). Isolation of thermotolerant yeast *Pichia kudriavzevii* from nuruk. *Food Science and Biotechnology*, 26, 1357-1362.

Ciani, M., & Picciotti, G. (1995). The growth kinetics and fermentation behaviour of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *Biotechnology Letters*, 17, 1247-1250.

Ciani, M., & Maccarelli, F. (1997). Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(2), 199-203.

Ciani, M., Mannazzu, I., Marinangeli, P., Clementi, F., & Martini, A. (2004). Contribution of winery-resident *Saccharomyces cerevisiae* strains to spontaneous grape must fermentation. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 85(2), 159-164.

Ciani, M., & Comitini, F. (2019). Use of Non-Saccharomyces Yeasts in Red Winemaking. In: A. Morata (ed.) *Red Wine Technology* (pp.51-68). Academic Press

Clemente-Jimenez, J. M., Mingorance-Cazorla, L., Martinez-Rodriguez, S., Las Heras-Vazquez, F.J., & Rodriguez-Vico, F. (2004). Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must., *Food Microbiology* 21, 149-155

Cojocar, G.A., & Antocea, A.O. (2012). A new refractometric methodology used to monitor fermentation. *Scientific Papers, Series B, Horticulture, LVI*, 452-456

Combina, M., Elfa, A., Mercado, L., Catania, C., Ganga, A., & Martinez, C. (2005). Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 99(3), 237-243.

Comitini, F., Agarbati, A., Canonico, L., & Ciani, M. (2021). Yeast interactions and molecular mechanisms in wine fermentation: a comprehensive review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 7754.

Considine, J. A., & Frankish, E. (2013). *A complete guide to quality in small-scale wine making*. Academic Press.

Costantini, A., Cravero, M. C., Panero, L., Bonello, F., Vaudano, E., Pulcini, L., & García-Moruno, E. (2021). Wine fermentation performance of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* strains isolated in a Piedmont vineyard. *Beverages*, 7(2), 30.

De Benedictis, M., Bleve, G., Grieco, F., Tristezza, M., Tufariello, M., & Grieco, F. (2011). An optimized procedure for the enological selection of non-*Saccharomyces* starter cultures. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 99(2), 189-200.

del Mónaco, S.M., Rodriguez, M.E., & Lopes, C.A. (2016). *Pichia kudriavzevii* as a representative yeast of North Patagonian winemaking terroir. *International Journal of Food Microbiology*, 230, 31-39.

del Mónaco, S.M., Barda, N.B., Rubio, N.C., & Caballero, A.C. (2014). Selection and characterization of a Patagonian *Pichia kudriavzevii* for wine deacidification. *Journal of Applied Microbiology*, 117, 451-464.

Drumonde-Neves, J., Franco-Duarte, R., Lima, T., Schuller, D., & Pais, C. (2016). Yeast biodiversity in vineyard environments is increased by human intervention. *PLoS One*, 11(8), e0160579.

Duarte, F. L., Pimentel, N. H., Teixeira, A., & Fonseca, A. (2012). *Saccharomyces bacillaris* is not a synonym of *Candida stellata*: reinstatement as *Starmerella bacillaris* comb. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 102(4), 653-658.

Englezos, V., Rantsiou, K., Torchio, F., Rolle, L., Gerbi, V., & Cocolin L. (2015). Exploitation of the non-*Saccharomyces* yeast *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) in wine fermentation: physiological and molecular characterizations. *International Journal of Food Microbiology*, 199:33-40.

Englezos, V., Rantsiou, K., Cravero, F., Torchio, F., Ortiz-Julien, A., Gerbi, V., ... & Cocolin, L. (2016). *Starmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed fermentations to reduce ethanol content in wine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 5515-5526.

Englezos, V., Giacosa, S., Rantsiou, K., Rolle, L., & Cocolin, L. (2017). *Starmerella bacillaris* in winemaking: opportunities and risks, *Current Opinion in Food Science*, 17.

Escott, C., Loira, I., Morata, A., Bañuelos, M. A., & Suárez-Lepe, J. A. (2017). Wine spoilage yeasts: Control strategy. In A, Morata., & Loira, L (eds.) *Yeast-industrial applications*, 89-116. IntechOpen

Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., & Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers." *International Journal of Systematics Bacteriology*, 49:329-337.

Fernández-Espinar, M.T., Esteve-Zarzoso, B., Querol, A., Barrio, E. (2000). RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts". *Antonie van Leeuwenhoek*, 78:87–97.

Fleet, G. H., Prakitchaiwattana, C., Beh, A. L., & Heard, G. (2002). The yeast ecology of wine grapes. In M, Ciani (ed.). *Biodiversity and Biotechnology of wine yeasts* (pp.1-17). Research Signpost.

Fowell, R.R. (1965). The identification of wild yeast colonies on lysine agar. *Journal of Applied Bacteriology*, 28:373-383.

Fugelsang, K.C., & Edwards C.G. (2007). *Wine Microbiology. Practical Applications and Procedures*. Second edition. Springer.

Gonzalez, M., Voget, C., et al. (2014). Molecular identification and characterization of the indigenous *Saccharomyces cerevisiae* GL15 strain responsible of traditional plum juice fermentations. *NAFI. International Food Congress Kusadasi. Turquía*.

González-Pombo, P., Fariña, L., Carrau, F., Batista-Viera, F., & Brena, B. M. (2011). A novel extracellular  $\beta$ -glucosidase from *Issatchenkia terricola*: Isolation, immobilization and application for aroma enhancement of white Muscat wine. *Process Biochemistry*, 46(1), 385-389.

González-Robles, I. W., Estarrón-Espinosa, M., & Díaz-Montaño, D. M. (2015). Fermentative capabilities and volatile compounds produced by *Kloeckera/Hanseniaspora* and *Saccharomyces* yeast strains in pure and mixed cultures during Agave tequilana juice fermentation. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 108(3), 525-536.

Gujjari, P., Muldrow, T., & Zhou, J. J. (2010). Effect of cryopreservation protocols on the phenotypic stability of yeast. *Cryoletters*, 31(3), 261-267.

Grangeteau, C., Gerhards, D., von Wallbrunn, C., Alexandre, H., Rousseaux, S., & Guilloux-Benatier, M. (2016). Persistence of two non-*Saccharomyces* yeasts (*Hanseniaspora* and *Starmerella*) in the cellar. *Frontiers in Microbiology*, 7, 268.

Hierro, N., González, Á., Mas, A., & Guillamón, J. M. (2006). Diversity and evolution of non-*Saccharomyces* yeast populations during wine fermentation: effect of grape ripeness and cold maceration. *FEMS yeast research*, 6(1), 102-111.

Howe, P. A., Worobo, R., & Sacks, G. L. (2018). Conventional measurements of sulfur dioxide (SO<sub>2</sub>) in red wine overestimate SO<sub>2</sub> antimicrobial activity. *American Journal of Enology and Viticulture*, 69(3), 210-220.

Ishtar Snoek, I. S., & de Steensma, H. (2007). Factors involved in anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 24(1), 1-10.

Jackson, S.R. (2014). Fermentation. In: S.R. Jackson (ed.) *Wine Science. Principles and Applications*. Fourth edition. Academic Press.

Jolly, N.P., Augustyn, O.P.H., & Pretorius, I.S. (2006). The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 27(1), 15-39.



Kántor, A., Mareček, J., Ivanišová, E., Terentjeva, M., & Kačániová, M. (2017). Microorganisms of grape berries. *Proceedings of the Latvian academy of sciences*, 71(6), 502-508. DOI:10.1515/prolas-2017-0087

Kurtzman, C.P., & Robnett, C.J. (1997). Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 59 end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(5), 1216–1223.

Kurtzman, C.P., & Robnett, C.J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences, *Antonie van Leeuwenhoek*, 73:331-371.

Kurtzman, C.P. (2011). *Pichia* E.C Jansen (1904). In: C.P. Kurtzman, J.W.Fell, & T. Boekhout (Eds.) *The Yeasts: A Taxonomic Study*. 5th ed. Vol 2, Chap 57 (pp. 685-707). Elsevier.

Liu, R., Zhang, Q., Chen, F., & Zhang, X. (2015). Analysis of culturable yeast diversity in spontaneously fermented orange wine, orange peel and orangery soil of a Ponkan plantation in China. *Annals of microbiology*, 65, 2387-2391.

Liu, Y., Rousseaux, S., Tourdot-Maréchal, R., Sadoudi, M., Gougeon, R., Schmitt-Kopplin, P., & Alexandre, H. (2017). Wine microbiome: a dynamic world of microbial interactions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(4), 856-873.

Majdak, A., Herjavec, S., Orlic, S., Redzepovic, S., & Mirosevic, N. (2002). Comparison of wine aroma compounds produced by *Saccharomyces paradoxus* and *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Food Technology and Biotechnology*, 40(2), 103-110.

Manzanares, P., Vallés, S., Viana, F. (2011). Non-*Saccharomyces* yeasts in the winemaking process. En: A, Carrascosa Santiago., R, Munoz., & R, Gonzalez García (eds.) *Molecular Wine Microbiology* (pp 85-104). 1st edition, Academic Press.

Martini, A. V. (1989). *Saccharomyces paradoxus* comb. nov., a newly separated species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex based upon nDNA/nDNA homologies. *Systematic and Applied Microbiology*, 12(2), 179-182.

Masneuf-Pomarede, I., Juquin, E., Miot-Sertier, C., Renault, P., Laizet, Y., Salin, F., Alexandre, H., Capozzi, V., Cocolin, L., Colonna-Ceccaldi, B., Englezos, V., Girard, P., Gonzalez, B., Lucas, P., Mas, A., Nisiotou, A., Sipiczki, M., Spano, G., Tassou, C., Bely, M., & Albertin, W. (2015). The yeast *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida*

*zemplanina*) shows high genetic diversity in winemaking environments. *FEMS Yeast Research*. 15 (5):fov045

Mercado, L., Dalcerro, A., Masuelli, R., & Combina, M. (2007). Diversity of *Saccharomyces* strains on grapes and winery surfaces: analysis of their contribution to fermentative flora of Malbec wine from Mendoza (Argentina) during two consecutive years. *Food microbiology*, 24(4), 403-412.

Mezzasalma, V., Sandionigi, A., Guzzetti, L., Galimberti, A., Grando, M. S., Tardaguila, J., & Labra, M. (2018). Geographical and cultivar features differentiate grape microbiota in Northern Italy and Spain vineyards. *Frontiers in microbiology*, 9, 946.

Mercado, L., Jubany, S., Gaggero, C., Masuelli, R. W., & Combina, M. (2010). Molecular relationships between *Saccharomyces cerevisiae* strains involved in winemaking from Mendoza, Argentina. *Current microbiology*, 61, 506-514.

Mojsov, K., Petreska, M., & Ziberovski, J. (2011, 22 September). *Risks of microbial spoilage of wine: a review*. EHEDG World Congress on Hygienic Engineering & Design, Macedonia.

Moon, S. H., Chang, M., Kim, H. Y., & Chang, H. C. (2014). *Pichia kudriavzevii* is the major yeast involved in film-formation, off-odor production, and texture-softening in over-ripened Kimchi. *Food Science and Biotechnology*, 23, 489-497.

Morgan, H. H., Du Toit, M., & Setati, M. E. (2017). The grapevine and wine microbiome: insights from high-throughput amplicon sequencing. *Frontiers in microbiology*, 8, 820.

Mortimer, R., & M, Polsinelli. (1999). On the origin of wine yeasts. *Research in Microbiology*, 150(3):199-204.

Moon, S. H., Chang, M., Kim, H. Y., & Chang, H. C. (2014). *Pichia kudriavzevii* is the major yeast involved in film-formation, off-odor production, and texture-softening in over-ripened Kimchi. *Food Science and Biotechnology*, 23, 489-497.

Naumov, G. I., Naumova, E. S., & Sniegowski, P. D. (1998). *Saccharomyces paradoxus* and *Saccharomyces cerevisiae* are associated with exudates of North American oaks. *Canadian Journal of Microbiology*, 44(11), 1045-1050.

Nyanga, L. K., Nout, M. J., Smid, E. J., Boekhout, T., & Zwietering, M. H. (2013). Fermentation characteristics of yeasts isolated from traditionally fermented masau

(*Ziziphus mauritiana*) fruits. *International Journal of Food Microbiology*, 166(3), 426-432.

Nisiotou, A., Sgouros, G., Mallouchos, A., Nisiotis, C.S., Michaelidis, C., Tassou, C., & Banilas, G. (2018). The use of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* and *Starmerella bacillaris* strains as a tool to create chemical complexity in local wines. *Food Research International*. 111:498-508. doi: 10.1016/j.foodres.2018.05.035.

OIV/OENO 206-2010 ES-Análisis Microbiológico Del Vino y Del Mosto

Orlić, S., Redžepović, S., Jeromel, A., Herjavec, S., & Iacumin, L. (2007). Influence of Indigenous *Saccharomyces paradoxus* strains on chardonnay wine fermentation aroma. *International Journal of Food Science and Technology*, 42(1), 95-101.

Orlić, S., Arroyo-López, F. N., Huić-Babić, K., Lucilla, I., Querol, A., & Barrio, E. (2010). A comparative study of the wine fermentation performance of *Saccharomyces paradoxus* under different nitrogen concentrations and glucose/fructose ratios. *Journal of applied Microbiology*, 108(1), 73-80.

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. 10.3389/fmicb.2016.00411.

Pallman, C., Brown, J. B., Olineka, T.L., Cocolin, L., Mills, D. A., Bisson, L. F. (2001). Use of WL medium to profile native flora fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52:198-203.

Parish, M. E., & Carrol, D.E. (1985). Indigenous yeasts associated with Muscadine (*Vitis rotundifolia*) grapes and musts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36,165-169

Perpetuini, G., Tittarelli, F., Battistelli, N., Suzzi, G., & Tofalo, R. (2020). Contribution of *Pichia manshurica* strains to aroma profile of organic wines. *European Food Research and Technology*, 246: 1405-1417.

Perpetuini, G., Rossetti, A. P., Battistelli, N., Arfelli, G., & Tofalo, R. (2021). Adhesion properties, biofilm forming potential, and susceptibility to disinfectants of contaminant wine yeasts. *Microorganisms*, 9(3), 654.

Polizzotto, L.G., Barone, E., Ponticello, G., Fasciana, T., Barbera, D., Corona, O., Amore, G., Giammanco, A., & Oliva, D. (2016). Isolation, identification and oenological

characterization of non-*Saccharomyces* yeasts in a Mediterranean island. *Letters in Applied Microbiology*, 63:131-138.

Pretorius, I. S., Van der Westhuizen, T. J., & Augustyn, O. P. H. (1999). Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. A review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 20(2), 61-70.

Pretorius, I. (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: Novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 15, 675-629.

Raymond Eder, M. L., Reynoso, C., Lauret, S. C., & Rosa, A. L. (2017). Isolation and identification of the indigenous yeast population during spontaneous fermentation of Isabella (*Vitis labrusca* L.) grape must. *Frontiers in Microbiology*, 8, 532.

Raymond Eder, M. L., Conti, F., & Rosa, A. L. (2018). Differences between indigenous yeast populations in spontaneously fermenting musts from *V. vinifera* L. and *V. labrusca* L. Grapes harvested in the same geographic location. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1320.

Raymond Eder, M. L., & Rosa, A. L. (2021). Genetic, physiological, and industrial aspects of the fructophilic non-*Saccharomyces* yeast species, *Starmerella bacillaris*. *Fermentation*, 7(2), 87.

Redžepović, S., Orlić, S., Sikora, S., Majdak, A., & Pretorius, I. S. (2002). Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* strains isolated from Croatian vineyards. *Letters in Applied Microbiology*, 35(4), 305-310.

Renouf, V., Claisse, O., & Lonvaud-Funel, A. L. I. N. E. (2005). Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(3), 316-327.

Replansky, T., Koufopanou, V., Greig, D., & Bell, G. (2008). *Saccharomyces sensu stricto* as a model system for evolution and ecology. *Trends in ecology & evolution*, 23(9), 494-501.

Resolución OIV/OENO 206/2010. Análisis microbiológico del vino y del mosto: detección, diferenciación y recuento de microorganismos. Anexo 6, 25 junio 2010

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche., & Lonvaud, A. (2006). *Handbook of Enology: Vol 2. The Microbiology of Wines and Vinification*. 2<sup>nd</sup> edition. John Wiley & Sons, Ltd.

Rodrigues, F., Ludovico, P., & Leão, C. (2006). Sugar metabolism in yeasts: an overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism. *Biodiversity and Ecophysiology of yeasts*, 101-121.

Roels, J.A. (1983). *Energetics and kinetics in biotechnology*. Elsevier Medical Press.

Romano, P., & Suzzi, G. (1996). Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2), 309-315.

Romano, P., Capece, A., & Jespersen, L. (2006). Taxonomic and ecological diversity of food and beverage yeasts. In: A.Querol & G.H.Fleet (eds.) *Yeasts in Food and Beverages*, 13-53. Springer

Rosenfeld, E., & Beauvoit, B. (2003). Role of the non-respiratory pathways in the utilization of molecular oxygen by *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 20(13), 1115-1144.

Saez, J., Lopes, C.A., Kris, V., Sangorrin, M.P. (2011). Production of volatile phenols by *Pichia manshurica* and *P. membranifaciens* isolated from spoiled wines and cellar environment in Patagonia. *Food Microbiology*, 28(3):503-509.

Schena, L., Ippolito, A., Zahavi, T., Cohen, L., Nigro, F., & Droby, S. (1999). Genetic diversity and biocontrol activity of *Aureobasidium pullulans* isolates against postharvest rots. *Postharvest Biology and Technology*, 17(3), 189-199.

Shi, W. K., Wang, J., Chen, F. S., & Zhang, X. Y. (2019). Effect of *Issatchenkia terricola* and *Pichia kudriavzevii* on wine flavor and quality through simultaneous and sequential co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *LWT*, 116, 108477.

Schulze, U., Lidén, G., Nielsen, J., & Villadsen, J. (1996). Physiological effects of nitrogen starvation in an anaerobic batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 142(8), 2299-2310.

Segura, L. E., Kirchmayr, M. R., Flores, E. P., & Gschaedler, A. C. (2010). PCR-RFLP de la región ITS-5.8S como herramienta de identificación de levaduras: ventajas y desventajas. *e-Gnosis*, 8.

Setati, M.E., Jacobson, D., Andong, U. C., & Bauer, F. (2012). The vineyard yeast microbiome, a mixed model microbial map. *PLoS ONE* 7(12):e52609

Shi, W., Wang, J., Chen, F., & Zhang, X. (2019). Effect of *Issatchenkia terricola* and *Pichia kudriavzevii* on wine flavor and quality through simultaneous and sequential co-

fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Lwt - Food Science and Technology*, 116, 108477.

Sniegowski, P. D., Dombrowski, P. G., & Fingerman, E. (2002). *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* coexist in a natural woodland site in North America and display different levels of reproductive isolation from European conspecifics. *FEMS Yeast Research*, 1(4), 299-306.

Sipiczki, M. (2003). *Candida zemplinina* sp. nov., an osmotolerant and psychrotolerant yeast that ferments sweet botrytized wines. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(6), 2079-2083.

Tristezza, M., Tufariello, M., Capozzi, V., Spano, G., Mita, G., & Grieco, F. (2016). The oenological potential of *Hanseniaspora uvarum* in simultaneous and sequential co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for industrial wine production. *Frontiers in Microbiology*, 670.

Sipiczki, M. (2011). Diversity, variability and fast adaptive evolution of the wine yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) genome—a review. *Annals of Microbiology*, 61(1), 85-93.

Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. A., & Pretorius, I. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of grape and wine research*, 11(2), 139-173.

Suarez-Lepe, J.A., & Iñigo-Leal, B. (2003). *Microbiología Enológica: Fundamentos de Vinificación*. 3ra ed. Mundi Prensa.

Tristezza, M., Tufariello, M., Capozzi, V., Spano, G., Mita, G., & Grieco, F. (2016). The oenological potential of *Hanseniaspora uvarum* in simultaneous and sequential co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for industrial wine production. *Frontiers in Microbiology*, 670.

van der Walt, J.P., & Yarrow, D. (1984). Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts. In: N.J. W. Kreger-van Rij (ed.). Third edition, *The yeasts. A taxonomic study* (pp 45-104). Elsevier Scientific.

Van Dijken, J. P., & Scheffers, W. A. (1986). Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiology reviews*, 1(3-4), 199-224.

Varela, C., & Borneman, A. R. (2017). Yeasts found in vineyards and wineries. *Yeast*, 34(3), 111-128.

Vaudano, E., Quintero, G., Costantini, A., Pulcini, L., Pessione, E., & Garcia-Moruno, E. (2019). Yeast distribution in Grignolino grapes growing in a new vineyard in Piedmont and the technological characterization of indigenous *Saccharomyces* spp. strains. *International Journal of Food Microbiology*, 289, 154-161.

Wang, C., Mas, A., & Esteve-Zarzoso, B. (2016). The interaction between *Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeast during alcoholic fermentation is species and strain specific. *Frontiers in microbiology*, 7, 502.

Wang, C., García-Fernández, D., Mas, A., & Estevez Zarsozo, B. (2017). Fungal diversity in grape must and wine fermentation assessed by massive sequencing, quantitative PCR and DGGE. In G, Spano., & S, Torriani (eds.) *Microbiota of Grapes: Positive and Negative Role on Wine Quality*. Frontiers in Microbiology. Frontiers Media.

Zamora, F. (2009). Biochemistry of alcoholic fermentation. In: M.V. Moreno-Arribas., & M.C. Polo (eds.), *Wine Chemistry and Biochemistry*. Springer.

Zhang, Q., Li, H., Su, X., Huang, W., & Zhan, J. (2020). Exploitation of indigenous wine yeasts from spontaneously fermenting grape must and vineyard soil in Beijing, China. *eFood*, 1(4):316-325.

Zott, K., Miot-Sertier, C., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., & Masneuf-Pomarede, I. (2008). Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. *International Journal of Food Microbiology*, 125(2), 197-203.

**Capítulo 5.**  
**Caracterización de cepas**  
***Saccharomyces*. Ensayo de inoculación.**



## 5.1. Introducción.

La conversión natural de la uva en vino se denomina fermentación espontánea. Este último término indica que el proceso biológico de transformación del azúcar en alcohol puede evolucionar por sí mismo sin ninguna influencia externa. Al momento de la maduración, la baya contiene una comunidad de levaduras, bacterias y hongos cuya diversidad es el resultado de múltiples interacciones entre factores regionales, climáticos, variedad de vid y prácticas culturales (Barata et al., 2012; Bokulich et al., 2014). Una parte de dicha comunidad será la responsable de la fermentación espontánea que ocurre al encubar el mosto y puede variar año a año (Bisson & Walker., 2015; Ciani & Comitini, 2019). El proceso industrial es incluso más complejo desde el punto de vista microbiológico, ya que las levaduras instaladas en la bodega, principalmente *Saccharomyces* y algunas especies de no-*Saccharomyces*, suelen colonizar el mosto compitiendo con las levaduras naturales de la baya (Martini et al., 1996; Martini, 2003; Ciani et al., 2004; Mercado et al., 2007; Ocón et al., 2010). Esta situación hace que la fermentación espontánea sea en parte impredecible y al igual que los cambios de composición de la uva, puede contribuir a la variabilidad de los vinos en cada vendimia (Pretorius, 2000). Por tal motivo muchas bodegas recurren al uso de inóculos comerciales de levaduras seleccionadas para un mejor control de la fermentación.

La práctica de la inoculación tuvo sus comienzos a principios de la década del 60 (Pretorius, 2000; Gonzalez et al., 2011) y representó un avance importante en la biotecnología del vino, ya que era sinónimo de una cierta garantía para obtener resultados más reproducibles en las sucesivas vendimias y un menor riesgo de contaminación (Navarrete-Bolaños, 2012; Capozzi et al., 2017). Los principales starters utilizados en vinificación son cepas seleccionadas de *S. cerevisiae* o *S. bayanus* aisladas de diferentes regiones vitivinícolas (González et al., 2011). La revalorización del rol de las levaduras no-*Saccharomyces* en la fermentación del vino ha generado nuevas alternativas a la inoculación monocepa. Diversas investigaciones han demostrado que el uso de cultivos mixtos de especies no-*Saccharomyces* con cepas de *Saccharomyces* puede aumentar la complejidad sensorial del vino generando de esta manera productos alternativos a los obtenidos con la inoculación monocepa (Jolly et al., 2003, Ciani et al., 2010, Mateo & Maicas, 2016; Padilla et al. 2016; Padilla et al., 2017; Roudil et al., 2020)

Dentro de la estrategia de inoculación, una tendencia que avanza desde hace más de una década es el empleo de starters de cepas nativas o autóctonas, es decir,

cepas que han sido aisladas de la propia fermentación espontánea (Belda et al., 2014). Estas levaduras provienen del entorno del viñedo y son parte del “terroir” que caracteriza una determinada región vitivinícola (Knigth et al., 2015; Bozoudi & Tsaltas, 2016; Francesa et al., 2016). La justificación del empleo de levaduras autóctonas reside en que serían más competitivas que las cepas comerciales no nativas, y podrían incluso reforzar la tipicidad del vino regional o al menos no alterarlo (Lopes et al., 2007; Mendoza et al., 2011; Tristezza et al., 2012; Capece et al., 2014; Comitini et al., 2017, Tufariello et al., 2019). En el uso de cepas nativas se deben considerar además las cuestiones comerciales, ya que se podría hablar de vinos con sello autóctono y diferenciarlos del vino elaborado con levaduras no autóctonas (del Mónaco et al., 2016). La selección de una cepa para inocular requiere conocer sus propiedades enológicas. En el screening de las propiedades de las cepas se considera fundamentalmente el perfil de los productos de fermentación (incluyendo aquellos que podrían causar defectos), vigor fermentativo, tolerancia al alcohol, resistencia al SO<sub>2</sub>, factor killer, actividades enzimáticas y compuestos volátiles (Ciani et al., 2010; Rainieri & Pretorius, 2000; Suarez Lepe & Morata, 2012). Recientemente se han considerado propiedades más específicas, como son la capacidad de realzar el color del vino a través de la formación metabólica de pigmentos estables (e.j., vitisinas y piranoantocianinas vinilfenólicas), y la adsorción de antocianinas a la pared celular de la levadura (Suárez-Lepe & Morata, 2012; Comitini et al., 2017).

En los capítulos anteriores se demostró que tanto la composición de la uva Isabella como la fermentación espontánea variaban de una temporada a otra. Estos factores se combinaron para dar lugar a vinos con diferencias en su calidad y aceptabilidad. Para lograr un mayor control de al menos una variable, como es la microbiología de la fermentación, resultó interesante evaluar el efecto que podría tener la inoculación con una cepa autóctona de *Saccharomyces* en la fermentación de Isabella. Por lo tanto, el objetivo del presente capítulo fue comparar una fermentación espontánea con una inoculada, para lo cual se realizó previamente un primer screening de las cepas *Saccharomyces* aisladas de la fermentación espontánea. La principal propiedad estudiada fue la capacidad fermentativa y la distribución de los principales productos de fermentación, incluyendo los compuestos volátiles por su potencial impacto en el ajuste fino del flavor de los vinos (Ugliano & Henschke, 2009). Complementariamente, se realizaron tests de fermentación de azúcares, producción de enzimas, fermentación de mostos concentrados en azúcar y la tolerancia al SO<sub>2</sub>.

## 5.2. Materiales y métodos.

### 5.2.1. Vendimias y análisis fisicoquímico de las uvas.

El ensayo comparativo entre la fermentación espontánea y la inoculada se llevó a cabo con uvas de la vendimia 2019 (v19) cosechadas en la segunda semana de marzo. A diferencia de v18, las uvas v19 no maduraron correctamente debido a factores climáticos, y por lo tanto, el estudio contó con esa limitación; no obstante, resultó válido para evaluar una fermentación inoculada. Las prácticas culturales del viñedo durante la campaña v19 fueron similares a las realizadas en v17 y v18. Para el muestreo no se discriminó por bloques (réplicas), ya que el productor había recolectado las uvas al momento del ensayo; no obstante, se tomaron racimos al azar de los cajones que aún estaban en el viñedo para ser llevados al laboratorio y ser procesados el mismo día. Para el análisis fisicoquímico de las bayas se tomaron 3 muestras independientes de 100 bayas cada una y se procesaron de acuerdo a lo descrito en el capítulo 3. Los datos de composición de la uva Isabella v19 se muestran en la tabla 5.1; con fines comparativos se incluye los datos de las bayas v17 y v18.

**Tabla 5.1.** Características de Isabella (temporadas v17 a v19).

Parámetros	v19	v18	v17
<b>Peso baya [g]</b>	3,75 ± 0,33	3,75	3,50
<b>% hollejo fresco [g/100 g bayas]</b>	11,7	10,0	6,9
<b>% hollejo seco [g/100 g bayas]</b>	3,70	2,77	2,35
<b>% semillas [g/100 g bayas]</b>	2,7	2,4	2,5
<b>% pulpa [g/100 g bayas]</b>	85,6	87,5	90,6
<b>°Brix</b>	17,1	20,7	17,4
<b>Azúcares reductores en mosto [g/l]</b>	161,5	203,0	162,6
<b>Alcohol probable [% v/v]</b>	9,6	11,7	9,6
<b>pH</b>	3,38 ± 0,03	3,46	3,32
<b>AT [ácido tartárico %]</b>	0,63 ± 0,03	0,62	0,74
<b>N-asimilable (YAN) [mg/l]</b>	214 ± 22,1	207	228
<b>Antocianos en hollejo seco [mg/g]</b>	12,2 ± 0,71	21,9	16,1
<b>Antocianos cada 100 g baya [mg %]</b>	48,5 ± 2,94	60,6	37,9
<b>Índice de madurez Cillis-Odifredi (Brix/AT)</b>	27,0	33,3	23,3

Valores promedio de 3 réplicas con 3 repeticiones cada una. Análisis realizados con uvas congeladas.

Los parámetros de composición de las bayas v19 se encuentran dentro de los rangos observados en las campañas anteriores. El índice de madurez en v19 fue de 27, inferior al potencial de la variedad, debido principalmente al bajo valor de °Bx. Una característica de las uvas v19 fue el mayor % de hollejo, tanto húmedo como seco. El mayor contenido de hollejo no se tradujo en un mayor % de antocianos, ya que el contenido de pigmentos de la baya (en base seca) fue significativamente menor, incluso que v17. Por su parte, el nivel de YAN (~ 200 mg/l) indica un contenido de nitrógeno adecuado para el crecimiento de las levaduras. En la Tabla 5.2 se presentan los datos climáticos para v19, y a fines comparativos, los datos de las temporadas v15 a v18. Los datos de temperatura mostraron que la cantidad de calor recibido por el viñedo fue similar a la de los otros años, con valores de IW e IH del orden de 2000, pero al igual que v17 la pluviosidad fue considerablemente alta durante la etapa de maduración de la baya. Los bajos valores de °Bx en v19 también se observaron en el resto de los viñedos de la región. El factor climático lluvia aparece nuevamente como crítico en la maduración de la Isabella.

**Tabla 5.2.** Parámetros bioclimáticos del cultivo de Isabella (v15 a v19).

Parámetro	Período	v15	v16	v17	v18	v19
Índice de Winkler	Septiembre a cosecha	1757	1857	1945	1954	1917
Índice de Hughlin	Octubre a cosecha	1984	2103	2306	2259	2131
Lluvia (mm)	Desarrollo vegetativo (Septiembre a Diciembre)	577	283	364	348	437
	Envero a cosecha	193	190	300	148	237
	Total	770	473	664	496	674

### 5.2.2. Cepas

Para la selección de cepas se empleó como criterio simple seleccionar colonias de levaduras *Saccharomyces* aisladas de la etapa final de la fermentación espontánea. Puede considerarse que estas cepas han superado las condiciones de estrés que le impuso el proceso y por lo tanto, son las que mejor se adaptaron al medio específico donde se desarrolló la fermentación (Pulvirenti et al., 2009); en otras

palabras, estas cepas fueron previamente “seleccionadas” por el proceso natural de vinificación. De este modo, los aislamientos de *Saccharomyces* que se emplearon en este estudio se seleccionaron al azar de la población final dominante del vino de Isabella en las fermentaciones v15, v16 (considerada la fuente más adecuada por ser una fermentación en la cual se obtuvo un vino de calidad) y v17. Además, se incluyeron cuatro cepas *S. paradoxus* aisladas de v15 (tres del momento de la parada de fermentación, es decir del descube, y una del trasiego donde ya había finalizado la fermentación), y tres cepas *S. cerevisiae* aisladas de la fermentación espontánea de ciruelas. El “vino” de ciruela es una bebida alcohólica similar al vino de la Costa de Berisso, que se elabora en la bodega de la Cooperativa de la Costa con ciruelas cosechadas entre fines de diciembre (variedades Genovesa y Cristal) y mediados a fines de enero (variedad Remolacha), en las quintas donde se cultiva la vid. El objetivo de incorporar las cepas de ciruela al estudio fue considerar como hipótesis que levaduras *Saccharomyces cerevisiae* provenientes de diferentes nichos ecológicos dentro de la quinta donde están los viñedos podrían tener propiedades bioquímicas o fermentativas específicas en función de su origen; así, por ejemplo, a diferencia de la uva, las ciruelas contienen un alto contenido de pectina, lo que podría generar un nicho favorable para albergar cepas con capacidad para producir enzimas pectolíticas. Estas enzimas pueden contribuir a una mejor maceración y clarificación del mosto y mejorar sensorialmente al vino (Espejo, 2021)

Al igual que lo mencionado con las cepas no-*Saccharomyces*, no se realizó una tipificación con marcadores moleculares para seleccionar clones que expresaran diferencias genéticas. Las cepas estudiadas se detallan en el cuadro 5.3. Los ensayos incluyeron siete cepas de v15, nueve de v16 y dos de v17. Con respecto a las tres cepas de ciruela, dos de ellas (RPVC2 y GT2B) se aislaron de la etapa de descube (~ 5-6% de alcohol) de microvinificaciones de laboratorio donde se siguió un proceso equivalente a la fermentación de la Isabella (Brea, 2015), y por lo tanto, provinieron de la propia fruta. La cepa RPVC2 fue aislada de la fermentación de la variedad Remolacha (Re) y GT2B de la variedad Genovesa (Ge). Por otro lado, la tercer cepa de ciruela (GL15) se aisló de una fermentación en bodega, luego del descube, bajo condiciones de alta acidez, temperatura (> 30°C) y un nivel de alcohol del 11,7 % (Gonzalez, 2014; Villa Monte, 2015). Dado que la uva Isabella y las ciruelas se fermentan en los mismos tanques de fibrocemento, la GL15 podría tener su origen en la uva y ser parte de la flora microbiana residente en la bodega.

**Tabla 5.3.** Cepas de *Saccharomyces* empleadas en los ensayos de fermentación con mosto de Isabella pasteurizado.

Origen	Cepas	Año	Etapa de fermentación	Réplica	Especie	Ensayo	
						1	2
	29Cp		Descube	1	<i>S. paradoxus</i>	x	x
	29Dp			2		x	x
	29Ep			2		x	
	40FTp	2015		2	<i>S. paradoxus</i>	x	x
	44BT		Trasiego	1	<i>S. cerevisiae</i>	x	
	45AT			2		x	
	40DT			3		x	x
Isabella	205		Descube	1	<i>S. cerevisiae</i>	x	x
	206			1		x	x
	207			1		x	x
	225			2		x	x
	236	2016		2		x	x
	226			2		x	x
	252			3		x	x
	260			3		x	x
	249			3		x	x
	S20	2017	Descube	2	<i>S. cerevisiae</i>	x	x
	S21			3		x	x
Ciruela	GL15c (Ge)	2011	Trasiego		<i>S. cerevisiae</i>		x
	GT2Bc (Ge)	2014	Descube				x
	RPVC2c (Re)		Descube				x

Ge: variedad Genovesa; Re: variedad Remolacha.  
 Las cepas del fermentado de ciruela del año 2014 provienen de frutos recolectados de una quinta diferente a la de los viñedos de Isabella. La cepa GL15 se aisló de una fermentación en bodega.  
 Las cruces indican si se realizó un duplicado o una única fermentación. En total se ensayaron cuatro cepas de *S. paradoxus* y 17 cepas de *S. cerevisiae*

### 5.2.3. Caracterización bioquímica de las cepas.

Se llevaron a cabo distintos tests para evaluar la producción de enzimas y capacidad fermentativa de las cepas *Saccharomyces*.

#### **Fermentación de azúcares.**

El test de fermentación de azúcar (glucosa y maltosa) se efectuó en tubos de ensayo de acuerdo a Van der Walt & Farrow (1984). Como control positivo de

fermentación de maltosa se empleó una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* var. diastaticus (Lallemand), y como control negativo una cepa de *H.uvarum*. La fermentación se evaluó durante 7-10 días.

### **Test de enzimas.**

Diversas enzimas son utilizadas en la elaboración de vino y otras bebidas fermentadas con diversos fines (Espejo, 2021). Se testeó la capacidad de las cepas seleccionadas para producir enzimas extracelulares: poligalacturonasa, amilasa y proteasa. Las poligalacturonasas (pectinasas) favorecen la degradación de las pectinas, y por lo tanto, la disgregación del tejido vegetal, por lo que favorecen el proceso de extracción de azúcares y compuestos fenólicos durante la fermentación/maceración y facilitan la clarificación y filtrabilidad del mosto. Las proteasas hidrolizan las proteínas de la uva y por ende se reduce su capacidad para precipitar los taninos, los cuales aseguran una mejor estabilidad del color en las primeras etapas de la vinificación. Además, al reducir la fracción proteica del vino ayuda a reducir la dosis de bentonita durante la clarificación. Las amilasas, por otra parte, son de interés en la elaboración de cerveza, pero se evaluaron con el fin de detectar cepas que puedan aplicarse en la elaboración de dicha bebida en la región de Berisso. Estas enzimas hidrolizan el almidón durante la etapa de maceración en maltosa, dextrinas solubles y glucosa, por lo que suministran azúcares simples para la fermentación y reducen de la viscosidad del mosto.

Para amilasa se empleó el medio para PGAsa reemplazando el ácido poligalacturónico por almidón soluble (Anedra). Para revelar la presencia de halos de hidrólisis de almidón se utilizó la solución de Lugol del reactivo de Gram (Britania) diluida 1:20. Como control positivo del test (visualización de halos) de actividad amilasa se empleó la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* var diastaticus (Lallemand). La actividad proteasa se evaluó empleando leche descremada al 1% suplementada con 0,2% de extracto de levadura y 0,5% de glucosa. Los halos de hidrólisis son visibles sin necesidad de emplear revelador. Todos los medios se esterilizaron 15 minutos a 121 °C, excepto la leche que se pasteurizó 15 minutos a 118 °C. Como control positivo del test para proteasa se utilizó una proteasa alcalina provista por Nutring S.A. En este último caso, se colocaron 10 µl de solución diluida de enzima esterilizada por filtración en el centro de la placa de petri. Los halos de hidrólisis se visualizaron luego de incubar 24 hs a 30 °C (Figura 5.1).



Halos hidrólisis de leche.



Halos hidrólisis de almidón.

**Figura 5.1** Tests de proteasa y amilasa

#### **5.2.4. Ensayos en mosto de Isabella pasteurizado.**

Las microvinificaciones en frascos con 100 ml de mosto pasteurizado para determinar la cinética de fermentación y la producción de diferentes productos metabólicos se describieron en el capítulo 4. Para los ensayos de inhibición con  $\text{SO}_2$  y fermentación con mosto de 25° Bx se emplearon tubos de 5 ml con tapón plástico conteniendo 3 ml de mosto pasteurizado. Para observar la tolerancia al  $\text{SO}_2$  se inoculó cada tubo con 20  $\mu\text{l}$  de una solución al 5% de metabisulfito de potasio, que equivale a una concentración en mosto de  $\sim 165 \text{ mg SO}_2/\text{l}$ , que es el límite máximo permitido para vinos tintos dulces o abocados (INV). Para obtener un mosto de 25 °Bx, al mosto normal de 21 °Bx se adicionaron cantidades equivalentes de glucosa y fructosa previo a la pasteurización.

#### **5.2.5. Ensayos de fermentación espontánea vs fermentación inoculada.**

Los ensayos de fermentación se llevaron a cabo en recipientes de 10 litros con 7,3 kg de uva v19 y 100 mg de MBK/kg, tal como se describió en el capítulo 3. La cepa inoculada fue *S. cerevisiae* 260. A partir del stock conservado en la heladera se repicaron 3 placas de GPY que se denominaron A, B y C. Se incubaron 24 hs a 30°C. De cada placa se tomaron 4 ansadas para inocular 3 erlenmeyers de 1L conteniendo 100 ml de mosto estéril v19 diluido al 40%. Los cultivos se agitaron durante 24 hs a 30°C y 180 rpm. El recuento total promedio en los erlenmeyers fue de  $1,38 \times 10^8$  levaduras/ml. Se tomaron 50 ml de cada cultivo y se centrifugaron a 5000 rpm durante 15 minutos. Los pellets obtenidos se lavaron una vez con agua estéril, se



resuspendieron en 30 ml de agua estéril y se tomaron 3 ml de cada suspensión para inocular los mostos de 7,3 kg para obtener un inóculo de  $10^5$  levaduras/ml. Los bazuqueos se realizaron a partir del segundo día de fermentación hasta finalizar la fermentación (uno por día). A cada muestra se le midió pH, °Bx y temperatura. Además, se realizaron plaques en medio WL; para ello se tomó una muestra inicial de 10 ml y se diluyó en 90 ml de triptona 0,1%, para luego hacer diluciones seriadas. Los vinos inoculados se descubaron a los 4 días de fermentación, mientras que los espontáneos se descubaron a los 7 días. El procedimiento fue el mismo que en los ensayos descritos anteriormente (capítulo 4). La presión aplicada durante el prensado del orujo fue de  $10 \text{ kg/cm}^2$  durante 2 minutos. Se determinaron los volúmenes de vino y el peso húmedo y seco del orujo para efectuar el balance de materia. Luego del descube, el vino se estacionó a temperatura ambiente y se realizaron tres trasiegos: a los 15 días, 45 días y el último a los 3 meses posteriores al descube (previo al embotellado). Al embotellar se incorporó MBK (60 mg/l). Los vinos se analizaron por HPLC y en el INV. Las fermentaciones se realizaron por triplicado. Un esquema del protocolo empleado en los ensayos en frascos y en la comparación de la fermentación espontánea vs inoculada se muestra en la Figura. 5.2.

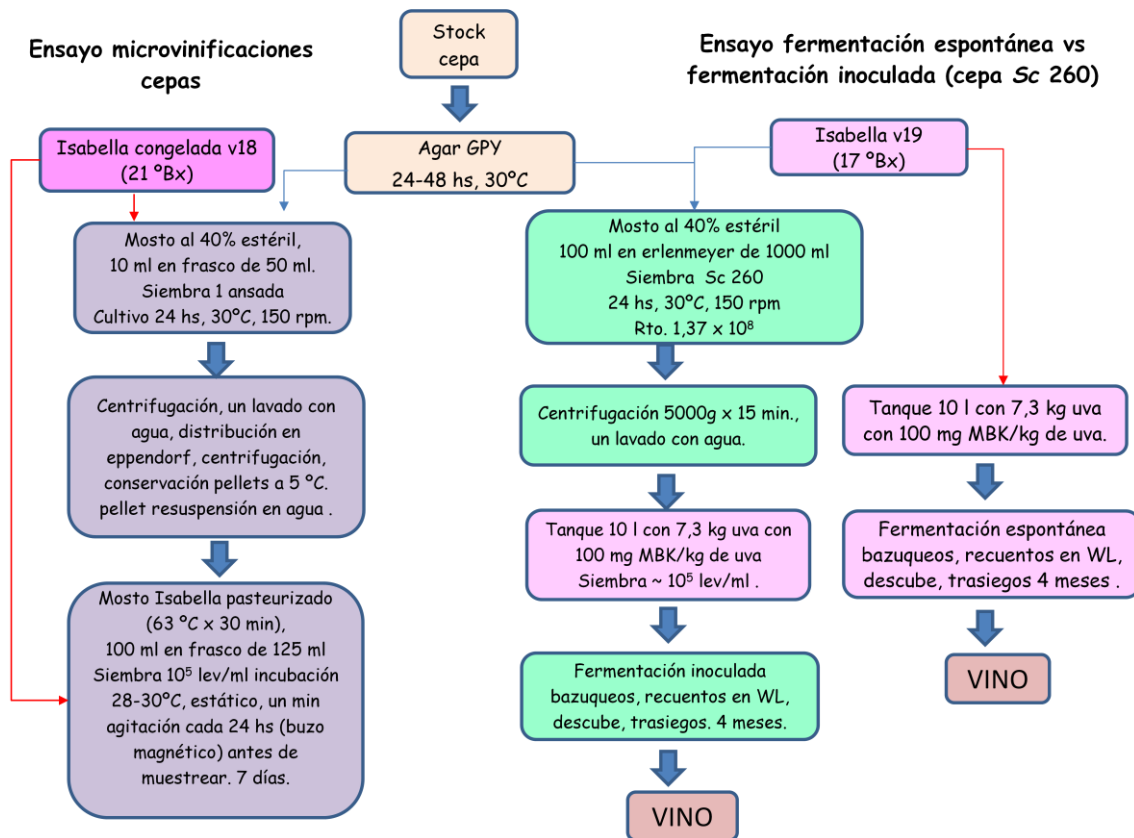


Figura 5.2 Esquema de los ensayos de fermentación.



como no estructurada (Catania & Avagnina, 2007). En la resolución de la OIV (2009) se encuentran las definiciones de cada atributo y el criterio para colocar el puntaje.

Tal como se describió en el capítulo 3, el jurado realizó una cata a ciegas, dándole un puntaje a cada atributo para obtener un valor medio. La suma total de los valores medios fue empleada para establecer un ranking final de “calidad” de los vinos, a partir del cual se definió la premiación.

#### **5.2.7. Análisis de compuestos volátiles de mostos pasteurizados.**

Para el análisis de compuestos volátiles en uvas y vinos es ampliamente utilizada la técnica SPME en combinación con GC/MSD (Panighel & Flamini, 2014). Los análisis de compuestos volátiles se realizaron en el Laboratorio de Bioquímica Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNCuyo-IBAM-CONICET). Se utilizó el método de microextracción en fase sólida (SPME) empleando una fibra de extracción de 65 µm con recubrimiento de Divinilbenceno-Carboxen-Polidimetilsiloxano (DVB-CAR-PDMS) marca Supelco (Sigma-Aldrich). De cada muestra se tomó un volumen de 5 ml, se colocó en un vial de 20 ml y se agregaron el patrón interno (2-octanol, Sigma-Aldrich) y cloruro de sodio. Luego de cerrar el vial, el mismo se colocó en un agitador magnético a 40 °C durante 10 minutos. Posteriormente, se ubicó la fibra de extracción en el espacio de cabeza del vial durante 30 minutos a la misma temperatura obteniéndose la muestra para el análisis. La muestra se inyectó en un cromatógrafo en fase gaseosa acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS) marca Perkin Elmer modelo Clarus 500. En cada cromatograma se realizó la identificación de cada pico (determinación cualitativa en referencia a la biblioteca interna NIST del equipo) y luego la determinación cuantitativa del compuesto expresada en ppb. Las determinaciones se hicieron por triplicado. La fibra DVDB-CAR-PDMS es muy eficiente para la adsorción de compuestos de polaridad intermedia, y es la que mejor resultado dio en relación al perfil de volátiles en vinos (Torrens et al., 2004). El proceso de extracción de volátiles con esta fibra ha sido optimizado para el análisis de los vinos de Isabella (Arcanjo et al., 2015), aunque las condiciones empleadas en el laboratorio analítico fueron algo diferentes a las descriptas en la publicación.

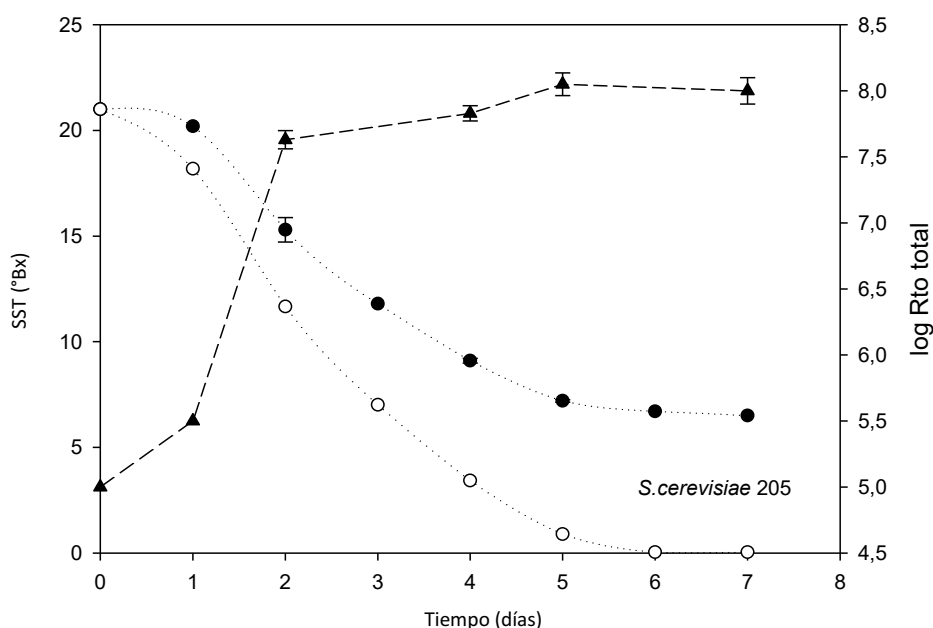
#### **5.2.8. Análisis estadístico de los resultados.**

Los análisis estadísticos se realizaron con el software MINITAB® (Minitab, LCC, State College, Pennsylvania) y la estimación de parámetros del modelo de regresión con Sigma Plot (Systat Software Inc. San Jose, California).

### 5.3. Resultados.

#### 5.3.1. Fermentación de mosto de Isabella pasteurizado con *Saccharomyces*.

Las cepas *Saccharomyces* mostraron la misma capacidad fermentativa, es decir, consumieron completamente los azúcares del mosto de Isabella pasteurizado (azúcar residual debajo del límite de cuantificación:  $\sim 2,0$  g/l), con excepción de las cepas 29Ep y S21, que finalizaron con concentraciones de azúcar entre 2,0 y 5,0 g/l, principalmente fructosa. La disminución de los °Bx con el tiempo de fermentación mostró también un patrón coincidente en todas las cepas, aunque en algunos casos (cepas 29Cp, 236, 40DT y 207) hubo cierta diferencia entre duplicados; sin embargo, estas diferencias pueden ser atribuidas a factores aleatorios, ya que al menos una fermentación coincidió totalmente con la curva de disminución de °Bx vs tiempo que exhibieron el resto de las fermentaciones. La fermentación utilizando un inóculo de  $10^5$  levaduras /ml se completó en 7 días a la temperatura de 28 °C. En la Figura 5.4 se muestra una curva típica de disminución de °Bx y del recuento de levaduras para una cepa representativa de *Saccharomyces*. A fines comparativos se incluye también el valor experimental de °Bx corregido por la presencia de alcohol.



**Figura 5.4.** Variación de °Bx en función del tiempo de fermentación. Mosto de Isabella pasteurizado. Cepa *S. cerevisiae* 205. ●: °Bx experimental. ○: °Bx corregido por etanol de acuerdo a Cojocarú & Antoce (2012) empleando un factor de conversión Brix/alcohol de 0,58, (▼) log Rto total (levaduras/ml). Los puntos representan el promedio de 3 réplicas y las barras la DE. Inóculo  $10^5$  levaduras/ml. Brix inicial  $\sim 21,0$  (promedio), pH inicial 3,2 Temperatura a  $28 \pm 1$  °C.

La curva de °Bx muestra el patrón general de las tres fases típicas de la fermentación alcohólica. A diferencia de lo observado con las cepas no-*Saccharomyces*, el período de latencia se limita a un día, seguido de una etapa tumultuosa de dos a tres días. La fase inicial donde los °Bx varían lentamente podría atribuirse a que la biomasa es inicialmente baja, y por lo tanto, los cambios en los °Bx no son perceptibles en las primeras horas de la fermentación, pero también al hecho de que las levaduras que provienen del inóculo aeróbico, donde su metabolismo es respirofermentativo por ser levaduras Crabtree positivas (De Deken,1996), necesitan un breve período de adaptación al pasar a la anaerobiosis (Jouhten et al., 2012). La fase de crecimiento celular corresponde a las primeras 48 hs de fermentación, al final de la cual se obtiene un recuento total promedio de  $4,0 \times 10^7$  levaduras/ml, un incremento de casi 3 órdenes respecto al valor inicial. El crecimiento posterior lleva el recuento final a  $\sim 1,1 \times 10^8$  levaduras/ml, que corresponde aproximadamente a valores de peso seco de biomasa de 2,0-2,7 g/l. Estos valores son estimativos, ya que que la relación recuento/peso seco depende de la fase de crecimiento (Henriques & Balsa-Canto., 2021). En la fase estacionaria las levaduras cambian la composición y acumulan carbohidratos de reserva y trehalosa (Schulze,1996; Varela et al., 2004), por lo que el peso de cada célula se incrementa. El rango de peso seco/recuento reportado para *Saccharomyces* crecido en medio sintético modelo o mosto de uva es de 3-5 g/l cada  $10^8$  levaduras/ml (Manginot et al.,1998; Liu et al., 2015). Probablemente, el valor de 2,7 g/l subestime la cantidad de biomasa formada durante la fermentación.

La fermentación alcohólica del mosto de uva es considerada un cultivo batch limitado en N (Schulze et al., 1996); esto significa que el crecimiento celular que se alcanza antes de la fase estacionaria dependerá de la cantidad de nitrógeno asimilable (YAN) presente inicialmente en el mosto. El consumo de YAN es paralelo al crecimiento de las levaduras, y como tal, ocurre generalmente en los dos primeros días de fermentación. El contenido de YAN de los mostos determina la concentración máxima de biomasa, pero también la cinética de la fermentación y la producción de ciertos metabolitos (Tesnière et al., 2015). Cuando hay deficiencia en nitrógeno suelen ocurrir fermentaciones lentas e incompletas, en particular cuando las concentraciones de azúcar en el mosto son altas (200-250 g/l) (Insa et al., 2005). El contenido de N asimilable de la uva es muy variable, pero para garantizar una fermentación correcta se considera aceptable un valor mínimo de 140 mg/l (Gobert et al., 2019). En las uvas v18 el contenido de YAN fue de 214 mg/l. Debido a la limitación del crecimiento por N,

una fracción importante de los azúcares se metabolizan a alcohol durante la fase estacionaria (Zamora, 2009, Marsit & Dequin 2015; Butnariu & Butu, 2019). Según la evolución de °Bx y los recuentos, la fase estacionaria ocupó el 70% del tiempo total de fermentación durante la cual se consumió el 57% de los azúcares fermentables del mosto. Conforme avanza la fermentación el proceso se ralentiza, lo cual se atribuye a cambios que ocurren en el sistema de transporte de hexosas cuando se agota el N del medio y a la progresiva inhibición que produce el aumento de la concentración de alcohol (Bely et al., 1994; Pérez et al, 2005; Palma et al., 2012).

### **5.3.2. Análisis de productos de fermentación mediante HPLC.**

El análisis por HPLC de los principales productos de fermentación se detalla en la Tabla 5.4. Globalmente, los valores se hallaron en el siguiente rango: etanol 11,6-12,9%, CO<sub>2</sub> (estimado indirectamente por pérdida de peso) 8,5-10%, glicerol 5-7 g/l, succínico 0,46-1,2 g/l y acético 0,2 (límite de cuantificación)-0,55 g/l. Tal como se mencionó en el capítulo 4, la relación CO<sub>2</sub>/etanol global debería ser superior a 0,96. Sin embargo, esta relación fue inferior para algunas cepas estudiadas y dicha discrepancia podría ser atribuida al error asociado a la estimación del CO<sub>2</sub> producido, ya que no se midió en forma directa, sino que se calculó por la pérdida de peso del frasco, lo que se asoció a la producción de CO<sub>2</sub>. No obstante, al realizar un cálculo global con todas las cepas, se obtuvo un valor promedio de CO<sub>2</sub> y de etanol de 94,6±3,8 (g/l) y 96,2±3,4 (g/l), respectivamente, con lo cual la relación entre ambos valores es de 0,98. El análisis de los productos de fermentación basado en los rendimientos de C-mol (Tabla 5.5) reveló que el 90% del C del azúcar fue recuperado en forma de alcohol y CO<sub>2</sub>, el 2,5-3,5% como glicerol y un 0,7% como acético y succínico. El rendimiento en biomasa promedio fue del 1,6%. Tanto el balance de C como del grado de reducción (Roels, 1982) mostraron consistencia en los datos experimentales. Algunos rendimientos en etanol se encuentran casi al límite del rendimiento máximo posible (0,66), lo cual puede atribuirse al error experimental; el valor promedio fue de 0,615, que representa el 92% del máximo teórico.

**Tabla 5.4.** Fermentación de mosto Isabella pasteurizado por cepas *Saccharomyces* compuestos analizados por HPLC.

Cepa	Vendimia	Especie	Azúcar residual (g/l)	Alcohol (%)	Glicerol (g/l)	Alcohol /glicerol (g/g)	Succínico (g/l)	Acético (g/l)	CO <sub>2</sub> (g/l)	CO <sub>2</sub> /etanol (g/g)
29Cp	2015	<i>S. paradoxus</i>	<LQ	12,3 ± 0,07	7,1±0,28	13,7	0,745±0,02	0,265	83,4	0,86
29Dp			2,03	12,3	6,7	14,5	1,2	0,46± 0,09	83	0,85
29Ep			6,1	11,3	8	11,1	0,87	0,29	80	
40FTp		<LQ	11,7	8,1	11,4	0,96	0,2	80		
44BT		<LQ	12	6,7	15,5	0,75	0,26	95	1,00	
45AT		<i>S. cerevisiae</i>	<LQ	12	6,1	15,5	0,51	0,39	95	1,00
40DT			<LQ	12,6 ± 0,01	7,3	13,6	0,49±0,01	0,58±0,08	94	0,94
206	2016	<i>S. cerevisiae</i>	<LQ	12,3 ± 0,2	6,9	15,4	0,42	0,52	92	0,94
207			< LQ	12,6 ± 0,2	5,7± 0,3	17,5	1,06± 0,3	0,24	100	0,91
205			<LQ	12,9 ± 0,05	6±0,4	16,7	0,87±0,1	0,24	92	0,91
225			< LQ	12,4	6,1± 0,25	16	0,79± 0,1	0,21	92,5	0,94
236			< LQ	12,3 ± 0,14	6,9± 0,25	14,1	0,725± 0,02	0,38±0,07	89	0,94
226			<LQ	11,85	6,4	14,6	1,2	0,2	94	1,00
252			< LQ	12,85 ± 0,2	6 ± 0,03	16,9	0,94± 0,02	0,37±0,13	92,1	0,91
260			< LQ	12,6 ± 0,25	5,8±0,07	17,2	0,77± 0,07	0,45±0,2	95	0,95
249			2,1	12,2 ± 0,36	5,15± 0,2	17,7	0,46± 0,18	0,23±0,05	99,4	1,03
S20	2017		< LQ	12,4 ± 0,03	5 ± 0,1	19,6	0,8 ± 0,06	0,5±0,25	92,3	0,94
S21			3,0 (75% Fru)	11,8 ± 0,28	7± 0,3	13,6	0,7± 0,08	0,415±0,02	90	0,97
GL15c*	2011	<i>S. cerevisiae</i>	< LQ	11,9	5,75	16,3	0,81	0,2	99,7	1,06
GT2Bc	2014		< LQ	11,9	5,3±0,2	17,3	0,58±0,1	0,29	99,6	1,05
RPVC2c*	2014		< LQ	11,45	7,5	12	0,6	0,44	98,8	1,09

\* Datos de una sola réplica, el resto es el promedio de dos réplicas (valor medio ± DE). Si no se indica el valor de DE es porque coinciden los valores de las réplicas. DE de 2 réplicas [(d1-d2)/2]1/2. Los análisis por HPLC se efectuaron por duplicado.

Los Brix iniciales para el mosto de Isabella variaron entre 20,5 y 21,5 (203 g/l).

La biomasa (g/l) se estimó de los recuentos totales al final de la fermentación, los cuales variaron entre 0,7 y 1,4 x 10<sup>8</sup> levaduras/ml. La biomasa promedio calculada de los recuentos fue de 2,8 ± 0,64 g/l (10<sup>8</sup> levaduras/ml = 2,7 ± 0,17 mg biomasa seca calculada a partir de cultivos líquidos en GPY).

LQ límite de cuantificación, Fru:fructosa

**Tabla 5.5.** Rendimientos de la fermentación de mosto Isabella pasteurizado.

Cepa		$Y_{EtOH}$	$Y_{GII}$	$Y_{Suc}$	$Y_{Ac}$	$Y_{CO_2}$	$Y_{biomasa}$	Balance C	Balance $\gamma_i$
29Cp		0,62	0,034	0,0037	0,0013	0,28		0,96	0,99
29Dp		0,63	0,030	0,0050	0,0023	0,28		0,97	1,01
29Ep		0,57	0,039	0,0044	0,0014	0,27		0,90	0,92
40FTp	2015	0,59	0,039	0,0048	0,001	0,27		0,92	0,95
45AT		0,61	0,034	0,0025	0,0019	0,32		0,98	0,98
44BT		0,61	0,032	0,0037	0,0013	0,32		0,98	0,98
40DT		0,63	0,035	0,0024	0,0028	0,31		1,00	0,99
205		0,65	0,029	0,0044	0,0012	0,31		1,02	1,05
206		0,63	0,033	0,0021	0,0026	0,31		1,00	0,95
207		0,63	0,028	0,0055	0,0012	0,35		1,04	1,05
225		0,65	0,030	0,0041	0,0011	0,32	0,016 (0,028)*	1,02	1,03
236	2016	0,63	0,033	0,0037	0,0019	0,30		0,99	1,01
226		0,60	0,033	0,0060	0,0010	0,32		0,98	0,96
252		0,65	0,030	0,0049	0,0015	0,32		1,02	0,98
249		0,62	0,025	0,0024	0,0012	0,35		1,02	0,96
260		0,63	0,029	0,0039	0,0022	0,32		1,00	0,92
S20		0,63	0,024	0,0040	0,0025	0,31		0,99	0,92
S21	2017	0,60	0,034	0,0035	0,002	0,30		0,95	0,96
GL15c	2011	0,59	0,027	0,0040	0,001	0,33		0,97	0,94
RPVC2c		0,57	0,033	0,0029	0,0021	0,32		0,95	0,92
GT2Bc	2014	0,59	0,025	0,0032	0,0014	0,33		0,97	0,94
<b>mediana</b>		0,63	0,032	0,039	0,0014	0,32			
<b>[mín-máx]</b>		[0,57-0,65]	[0,024-0,039]	[0,0021-0,006]	[0,0010-0,0028]	0,27-0,35			

Rendimientos: fracción de C del sustrato (azúcar) conservada en la biomasa y los productos de fermentación. El balance de C se basa en el concepto de C-mol (Roels, 1982).

C-mol: azúcar (30 g), etanol (23 g), glicerol (30,67 g), succínico (29,5 g), acético (30 g), biomasa estándar (25,8 g).

La biomasa promedio (2,8 g/l) corresponde a 0,11 C-mol/l de biomasa estándar. El azúcar inicial 6,8 C-mol/l

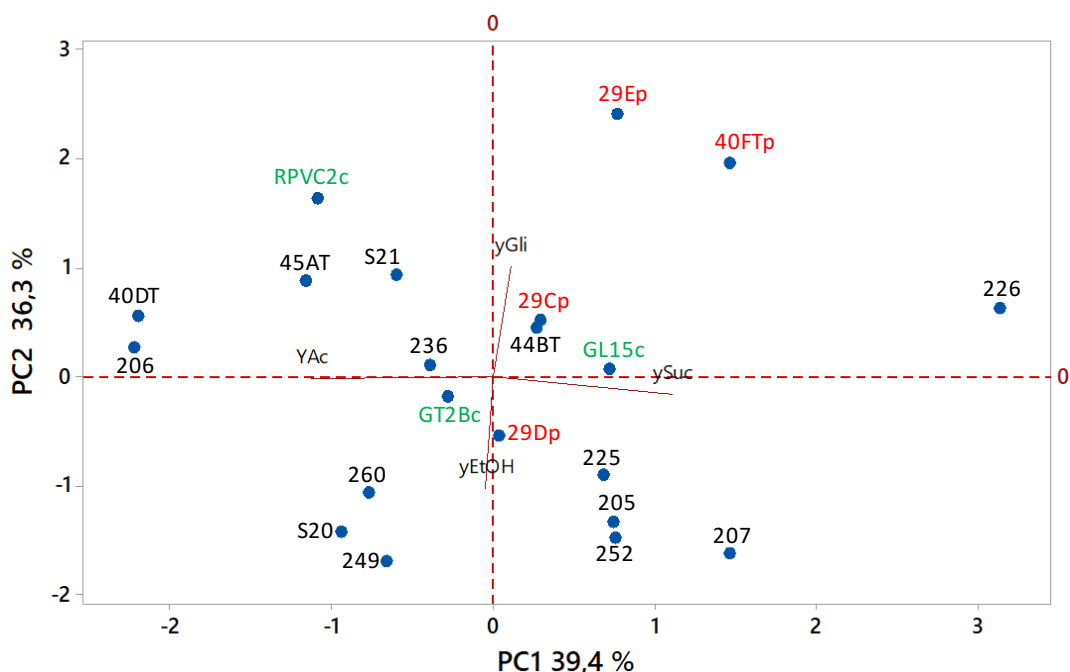
$\gamma_i$ : grado de reducción; el balance de  $\gamma_i$  permite definir la consistencia de los datos en relación al estado redox de sustratos y productos (Roels, 1982)

\* Rendimiento en biomasa estimada de diferentes datos bibliográficos.

p: paradoxus, c: ciruela



Para observar la asociación entre cepas y los cuatro productos de fermentación, se realizó un ACP con los valores de rendimiento (Figura 5.5).



**Figura 5.5.** ACP de los productos de fermentación expresados como rendimientos En rojo *S. paradoxus* aisladas en v15; en verde *S. cerevisiae* aisladas del vino de ciruela; el resto son aislamientos de *S. cerevisiae* de la fermentación de Isabella. **v15:** 44 BT (R1), 45AT (R2), 40DT (R3); **v16:** 205, 206, 207 (R1), 225, 226, 236 (R2), 260, 249, 225, 252 (R3); **v17:** S20 (R2), S21 (R3).

El gráfico bi-plot mostró claramente que las variables están bien definidas por los dos componentes principales. El primer componente se correlacionó fuertemente y en sentido opuesto con los rendimientos en succínico y acético ( $r = -0,576$ ,  $p = 0,006$ ), siendo insignificante el aporte del etanol y glicerol. El segundo componente se correlacionó también fuertemente y en sentido opuesto con los rendimientos en etanol y glicerol ( $r = -0,441$ ,  $p = 0,045$ ), siendo despreciable el aporte a este componente del succínico y acético. Ambos componentes contribuyeron con el mismo porcentaje (36%) a la variabilidad de los datos, y al ser ortogonales indicaron que los rendimientos en los dos ácidos orgánicos son independientes de los rendimientos en glicerol o etanol. Las cepas se distribuyeron de acuerdo a sus rendimientos relativos de manera aleatoria, es decir, sin tendencias de asociación de acuerdo al origen de las cepas (Isabella/ciruela, vendimia/réplica); no obstante, tres de las cuatro cepas de *S. paradoxus* se ubicaron en la zona de mayores rendimientos en glicerol y succínico.

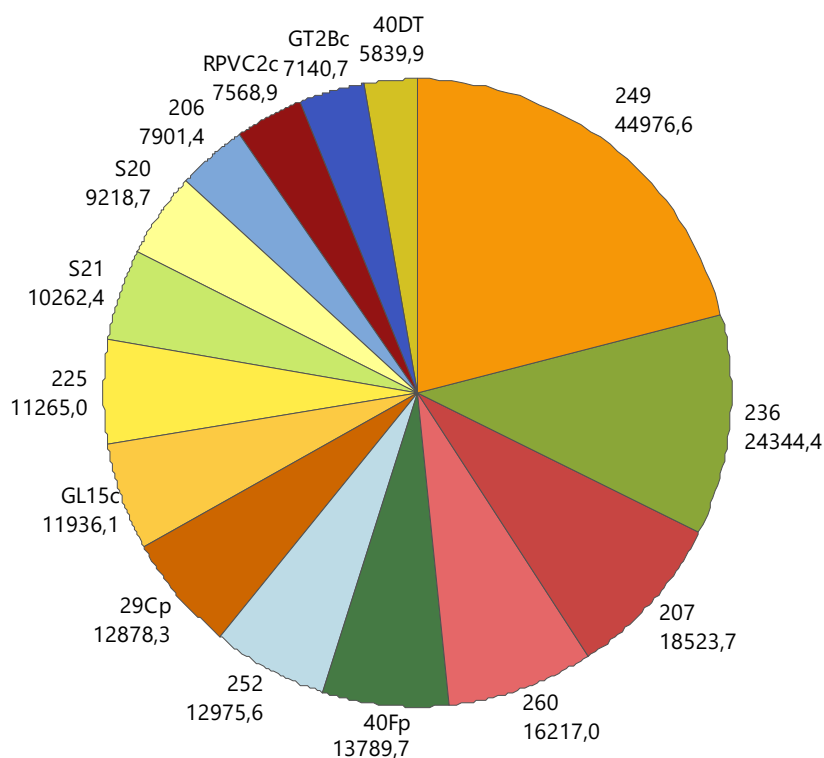
### 5.3.3. Producción de compuestos volátiles.

En paralelo a la producción de los metabolitos primarios, las levaduras, ya sea por su actividad fermentativa o por biotransformaciones de precursores presentes en la uva, generan una miríada de compuestos en el orden de  $\mu\text{g}$  a  $\text{mg/l}$ , muchos de los cuales son volátiles (odorant-active compounds, OAC) y tienen influencia en el flavor fino del vino según su concentración (Ugliano & Henschke, 2009; Dzialo et al., 2017). Entre los OAC de mayor impacto sensorial se encuentran los ácidos orgánicos, los alcoholes superiores, los ésteres de etilo, los ésteres de acetato, los terpenos, los tioles y los compuestos azufrados (Bisson & Karpel, 2010; Belda et al., 2017). La técnica más difundida para el análisis de volátiles en vino es SPME acoplado a GS-MS. De los resultados obtenidos en el análisis de los volátiles, solo se consideraron los del ensayo II (Tabla 5.3). Las concentraciones reportadas de todos los volátiles en el ensayo I fueron muy bajas, con valores inconsistentes respecto de los niveles reportados en vinos. La causa de este resultado no es del todo clara, ya que las muestras de todas las fermentaciones fueron procesadas y enviadas exactamente de la misma manera. Las concentraciones de los diferentes compuestos volátiles se muestran en la Tabla 5.6. Los valores tabulados representan el promedio de tres repeticiones de la misma muestra. Los coeficientes de variación de las tres repeticiones para los diferentes compuestos variaron entre 2 y 49%. En total se identificaron 43 compuestos: 14 ésteres, 9 alcoholes, 4 terpenos, 5 ácidos orgánicos y 11 compuestos de otras clases, incluyendo cetonas, aldehídos, dioles, oximas, hidrocarburos y fenoles. No se reportó la presencia de acetato de etilo.

**Tabla 5.6.** Compuestos volátiles producidos por cepas *Saccharomyces* en mosto de Isabella pasteurizado.

Especies químicas	Compuestos	Concentraciones (µg/l) de los volátiles producidos por las cepas																
		206	207	225	236	249	252	260	S20	S21	GL15c	GT2Bc	RPVC2c	40DT	40Fp	29Cp	Testigo	
Ácido acético	Ácido Acético	35,72	34,29	13,36	45,07	15,70	2,54	73,57	39,15	33,89	21,08	8,15	8,01	14,22	9,80	1,78	7,43	
	<b>total</b>	<b>35,72</b>	<b>34,29</b>	<b>13,36</b>	<b>45,07</b>	<b>15,70</b>	<b>2,54</b>	<b>73,57</b>	<b>39,15</b>	<b>33,89</b>	<b>21,08</b>	<b>8,15</b>	<b>8,01</b>	<b>14,22</b>	<b>9,80</b>	<b>1,78</b>	<b>7,43</b>	
Ácidos orgánicos	Ácido n-Decanoico	203,82	495,30	398,71	<b>2507,39</b>	<b>1533,53</b>	679,51	715,00	360,32	806,84	152,78	345,53	655,33	76,87	1189,85	1086,57	n d	
	Ácido Octanoico	315,80	435,33	328,01	<b>1817,48</b>	<b>2052,14</b>	503,65	415,00	432,27	816,14	510,79	390,09	534,91	161,05	749,29	817,03	1,50	
	Ácido Hexanoico	24,06	57,44	7,45	20,82	51,67	23,26	21,00	9,85	12,00	18,57	9,86	8,16	8,82	48,23	44,35	1,00	
	Ácido iso-Butanoico	1,68	3,18	4,14	n d	37,86	4,87	8,76	4,82	n d	1,82	n d	3,41	n d	n d	9,95	n d	
	<b>total</b>	<b>545,37</b>	<b>991,25</b>	<b>738,32</b>	<b>4345,69</b>	<b>3675,20</b>	<b>1211,28</b>	<b>1159,76</b>	<b>807,26</b>	<b>1634,98</b>	<b>682,15</b>	<b>747,31</b>	<b>1198,40</b>	<b>250,14</b>	<b>1987,37</b>	<b>1957,90</b>	<b>2,49</b>	
Alcoholes superiores	2-Feniletanol (alcohol fenilético)	590,76	1078,82	1028,68	<b>3745,25</b>	<b>4460,81</b>	1475,84	2585,45	1163,37	1471,09	1025,97	752,11	718,10	829,59	1402,55	1136,03	12,86	
	Alcohol isoamílico (3-metil-butan-1-ol)	366,00	1747,68	802,38	491,35	827,93	601,68	266,28	443,32	130,58	214,69	300,03	385,64	967,53	769,42	426,23	n d	
	Nonanol	9,12	31,85	34,70	81,59	46,52	11,38	16,41	19,10	24,58	24,73	6,82	3,81	34,63	68,76	53,47	n d	
	Heptanol	n d	8,07	2,77	10,86	5,51	n d	3,72	2,28	0,65	1,22	n d	1,32	n d	11,31	2,58	n d	
	2-Nonanol	3,64	10,42	6,55	25,69	52,23	8,74	16,13	9,67	10,55	13,09	5,72	11,63	16,30	80,64	31,75	n d	
	1-Octanol	2,38	1,57	2,08	13,54	29,54	2,66	4,53	1,75	2,78	2,29	11,02	15,94	17,94	40,62	4,72	0,15	
	<b>total</b>	<b>971,90</b>	<b>2878,40</b>	<b>1877,17</b>	<b>4368,28</b>	<b>5422,53</b>	<b>2100,30</b>	<b>2892,52</b>	<b>1639,50</b>	<b>1640,24</b>	<b>1282,00</b>	<b>1075,70</b>	<b>1136,45</b>	<b>1866,00</b>	<b>2373,30</b>	<b>1654,79</b>	<b>13,01</b>	
Ésteres de etilo	Etil decanoato	1246,82	3462,82	3185,32	<b>6447,47</b>	<b>14087,90</b>	3380,42	4351,29	2577,24	3160,30	3054,66	1318,64	1557,27	393,26	3468,79	2898,08	7,88	
	Etil octanoato	1124,44	3324,17	3179,59	<b>3579,02</b>	<b>9352,83</b>	2555,82	3459,10	1796,36	1724,61	3754,11	2012,82	1634,48	1559,90	2346,00	3221,18	n d	
	Etil dodecanoato	155,58	495,82	497,74	1216,38	2332,89	715,91	450,51	438,17	664,14	387,32	194,71	391,25	66,98	602,26	498,62	n d	
	Etil 9-decanoato	819,96	n d	n d	n d	2708,27	931,53	1095,98	576,36	430,58	938,11	495,03	543,44	760,17	1616,75	1366,65	3,52	
	Etil hexanoato	47,36	562,99	89,38	70,80	98,22	52,90	100,77	144,15	28,51	40,46	74,55	195,38	86,27	406,55	183,74	n d	
	Etil nonanoato	n d	n d	n d	n d	1,81	4,64	n d	n d	n d	n d	n d	n d	n d	n d	n d	n d	
	Etil 3-hidroxitridecanoato	1,25	0,90	0,38	1,77	6,77	3,19	1,36	1,08	4,48	3,05	8,44	3,26	1,29	0,35	1,49	n d	
	Etil 2-Hexenoate	5,25	3,77	1,95	1,75	15,83	1,92	1,69	2,06	1,16	1,98	0,87	2,71	4,31	6,42	4,28	n d	
	Etil 7-octenoato	2,60	8,64	6,83	n d	43,17	n d	n d	n d	n d	4,86	9,61	n d	n d	n d	n d	n d	
	Etil palmitato	3,55	5,45	2,71	7,42	22,68	5,26	3,38	3,32	6,21	3,83	0,81	0,41	2,18	2,34	1,64	n d	
	<b>total</b>	<b>3406,80</b>	<b>7864,55</b>	<b>6963,89</b>	<b>11324,61</b>	<b>28668,56</b>	<b>7648,75</b>	<b>9468,71</b>	<b>5538,73</b>	<b>6019,99</b>	<b>8183,50</b>	<b>4110,73</b>	<b>4337,82</b>	<b>2874,36</b>	<b>8449,45</b>	<b>8175,68</b>	<b>11,40</b>	
Ésteres de acetato	Acetato de 2-feniletilo	2370,31	1693,11	1591,13	<b>4060,79</b>	<b>6644,46</b>	1861,32	2506,07	1060,76	883,85	1676,57	1083,57	785,77	679,61	743,48	960,64	n d	
	Acetato de isoamilo	514,04	4934,67	882,87	384,44	815,15	274,53	331,63	215,85	120,59	56,57	87,02	243,02	90,06	319,73	63,45	n d	
	Acetato de hexilo	17,40	50,00	16,32	24,78	75,79	1,94	53,87	58,79	5,94	28,50	38,74	30,69	8,54	23,52	63,62	n d	
	<b>total</b>	<b>2901,74</b>	<b>6677,79</b>	<b>2490,32</b>	<b>4470,02</b>	<b>7535,40</b>	<b>2137,79</b>	<b>2891,56</b>	<b>1335,40</b>	<b>1010,39</b>	<b>1761,64</b>	<b>1209,33</b>	<b>1059,48</b>	<b>778,21</b>	<b>1086,73</b>	<b>1087,72</b>		
Otros ésteres	Octanoato de isoamilo	9,10	35,88	33,30	81,59	162,57	45,09	61,47	40,43	31,49	41,07	28,20	26,35	13,99	34,74	31,58	n d	
	2,2,4-trimetil-1,3-Pentanediol-di-isobutirato	3,03	4,03	1,35	7,20	8,18	1,37	18,59	38,36	4,72	16,43	11,58	26,99	0,80	8,71	4,51	0,06	
	<b>total</b>	<b>12,14</b>	<b>39,91</b>	<b>34,65</b>	<b>88,78</b>	<b>170,75</b>	<b>46,45</b>	<b>80,06</b>	<b>78,79</b>	<b>36,21</b>	<b>57,50</b>	<b>39,77</b>	<b>53,34</b>	<b>14,79</b>	<b>43,44</b>	<b>36,09</b>	<b>0,06</b>	
Terpenos	Linalol	11,90	14,85	4,57	6,96	21,60	6,45	3,81	6,09	2,77	2,73	7,01	3,04	31,25	25,40	2,23	2,30	
	Terpinen 4-ol	2,28	2,64	5,42	22,63	39,05	4,87	8,86	4,82	5,77	5,90	1,35	4,32	5,14	16,56	9,98	0,05	
	p Menth-1-en-8-ol	20,06	36,06	10,02	28,36	103,66	36,22	20,01	28,65	7,08	16,90	29,85	23,84	3,47	10,18	5,00	0,44	
	Nerolidol	12,76	5,32	8,67	16,88	101,49	45,21	14,36	11,35	8,83	9,61	11,49	14,53	94,94	49,70	2,03	n d	
<b>total</b>	<b>47,01</b>	<b>58,87</b>	<b>28,68</b>	<b>74,82</b>	<b>265,79</b>	<b>92,74</b>	<b>47,04</b>	<b>50,91</b>	<b>24,45</b>	<b>35,14</b>	<b>49,69</b>	<b>45,73</b>	<b>134,80</b>	<b>101,84</b>	<b>19,24</b>	<b>2,78</b>		
Dioles	2,3-Butanodiol	17,49	8,12	6,91	22,31	20,63	3,41	12,24	15,64	3,29	2,93	2,05	15,31	29,35	79,49	21,66	1,61	
	<b>total</b>	<b>17,49</b>	<b>8,12</b>	<b>6,91</b>	<b>22,31</b>	<b>20,63</b>	<b>3,41</b>	<b>12,24</b>	<b>15,64</b>	<b>3,29</b>	<b>2,93</b>	<b>2,05</b>	<b>15,31</b>	<b>29,35</b>	<b>79,49</b>	<b>21,66</b>	<b>1,61</b>	
Misceláneos	di-tert-butil fenol	19,42	16,90	16,15	63,80	62,00	14,20	28,30	22,30	21,40	7,12	6,81	7,72	12,50	76,00	4,80	1,60	
	Coumaran (Dihidrobencofurano)	12,91	9,86	0,17	2,90	0,22	0,06	0,16	0,69	0,33	0,04	0,68	0,52	0,20	0,76	0,18	n d	
	Nonil-Ciclopropano	9,11	12,47	7,34	23,96	48,64	10,03	18,51	14,39	8,03	12,03	11,63	8,87	3,68	40,85	4,05	1,09	
	Etil fenil acetato	4,84	7,67	17,70	35,22	20,67	5,85	10,85	5,83	4,48	3,43	7,16	3,02	3,91	11,54	11,82	0,10	
	<b>total</b>	<b>46,28</b>	<b>46,90</b>	<b>41,36</b>	<b>125,88</b>	<b>131,53</b>	<b>30,14</b>	<b>57,83</b>	<b>43,21</b>	<b>34,24</b>	<b>22,62</b>	<b>26,29</b>	<b>20,13</b>	<b>20,29</b>	<b>129,15</b>	<b>20,86</b>	<b>2,78</b>	
<b>Total volátiles</b>		<b>7982,00</b>	<b>18598,00</b>	<b>12193,00</b>	<b>24863,00</b>	<b>45903,00</b>	<b>13271,00</b>	<b>16681,00</b>	<b>9546,00</b>	<b>10434,00</b>	<b>12048,00</b>	<b>7266,00</b>	<b>7872,00</b>	<b>5981,00</b>	<b>14258,00</b>	<b>12973,00</b>	<b>39,90</b>	
Otros volátiles	Octan 2-ona	n d	n d	n d	n d	n d	n d	n d	n d	n d	n d	n d	n d	n d	n d	n d	0,10	
	3-Metil 1-Pentanol	1,55	2,24	2,24	5,75	59,81	38,93	2,37	0,43	0,28	0,68	41,42	56,67	65,21	40,15	25,95	57,74	
	2-Etil 1-hexanol	9,64	20,19	8,08	30,52	47,36	12,33	21,47	14,83	14,73	22,63	14,02	32,74	28,52	24,47	16,08	57,74	
	Fenil -Etanal	n d	n d	n d	n d	n d	n d	n d	n d	n d	n d	n d	n d	n d	n d	n d	n d	3,95
	1-(2,6,6-Trimetil-1,3-ciclohexadien-1-yl)-2-buten-1-ona	n d	n d	n d	n d	n d	n d	n d	n d	n d	n d	n d	n d	n d	n d	n d	n d	1,81
Metoxi -fenil -oxime	7,83	6,52	8,66	6,43	16,47	6,05	12,32	18,23	10,86	1,54	6,62	7,59	8,81	23,98	14,76	15,89		
<b>Total otros volátiles</b>		<b>19,02</b>	<b>28,95</b>	<b>18,98</b>	<b>42,70</b>	<b>123,64</b>	<b>57,32</b>	<b>36,15</b>	<b>33,49</b>	<b>25,88</b>	<b>24,85</b>	<b>62,05</b>	<b>97,00</b>	<b>102,54</b>	<b>88,60</b>	<b>56,79</b>	<b>137,22</b>	

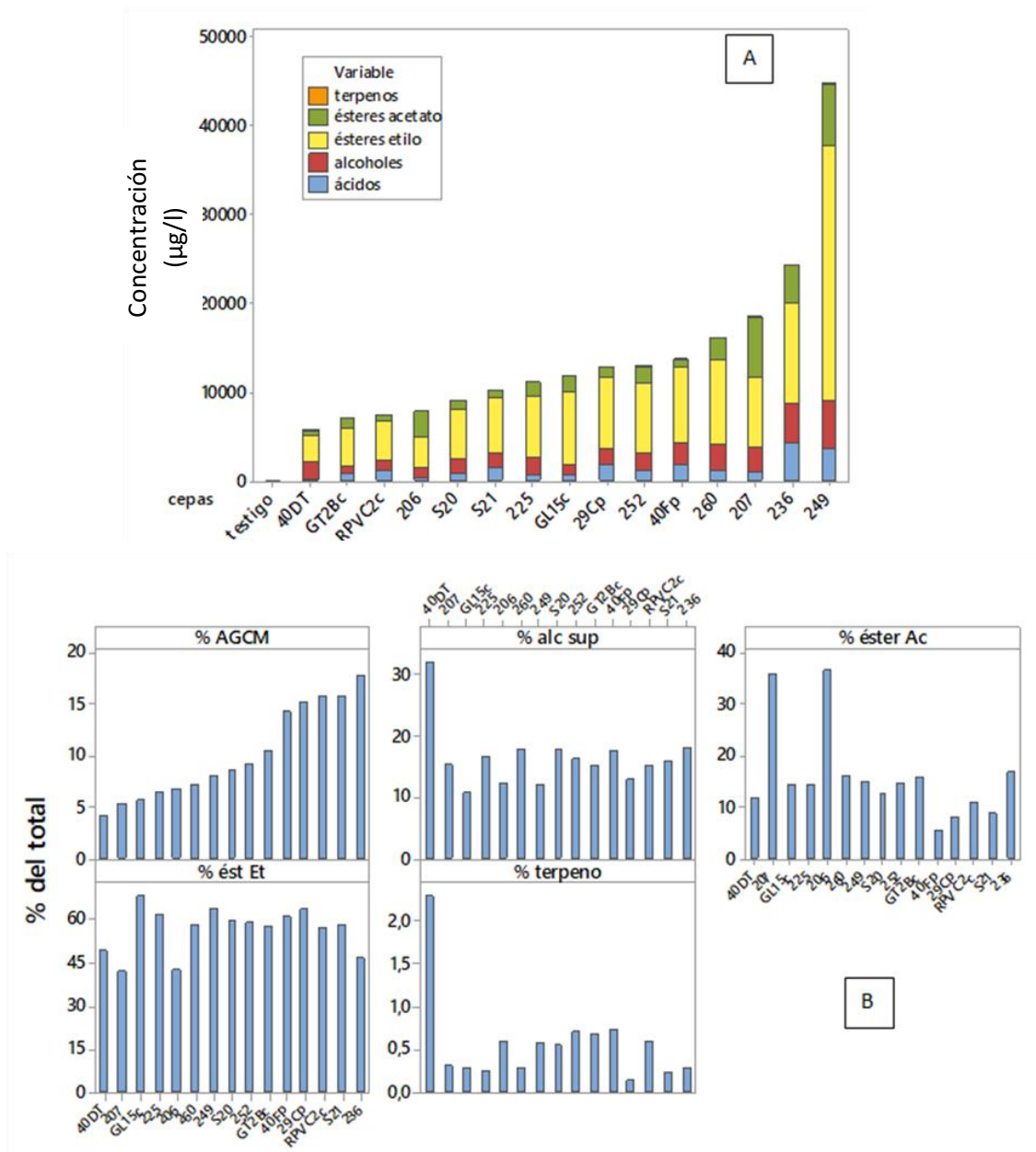
La concentración total de volátiles (suma de todos los compuestos detectados) varió entre 6 mg/l (cepa 40 DT) y 45 mg/l (cepa 249). En la Figura 5.6 se muestra la producción total de los principales grupos de volátiles por cepa. Sin considerar la cepas 40DT, 236 y 249, las restantes se ubicaron dentro de un rango de concentración comparable (7,0-18,5 mg/l).



**Figura 5.6.** Producción total (µg/l) de alcoholes superiores, ácidos grasos de cadena media (AGCM), ésteres de acetato, ésteres de etilo y terpenos por diferentes cepas *Saccharomyces* en la fermentación mosto de Isabella pasteurizado.

Un análisis global indicó que los ésteres de etilo representaron el 57% del total de compuestos volátiles, los ésteres de acetato y alcoholes 16% cada uno, los AGCM 10% y los terpenos 0,5%. Los compuestos con mayor concentración dentro de cada grupo fueron los alcoholes superiores 2-feniletanol y alcohol isoamilo y sus respectivos ésteres de acetato (acetato de 2-feniletanol y acetato de isoamilo), los AGCM octanoico y decanoico y sus correspondientes ésteres de etilo (octanoato y decanoato de etilo), y los terpenos  $\alpha$ -terpineol y nerolidol. En menor proporción se encontraron el ácido hexanoico y su etil éster (etil hexanoato). Si bien no se identificaron los ácidos libres dodecanoico y 9-decenoico (caproleico), sí se

encontraron sus correspondientes ésteres de etilo etil dodecanoico y etil 9-decenoico. En la Figura 5.7 A y B se presenta la producción de los diferentes grupos de volátiles en función de la cepa.



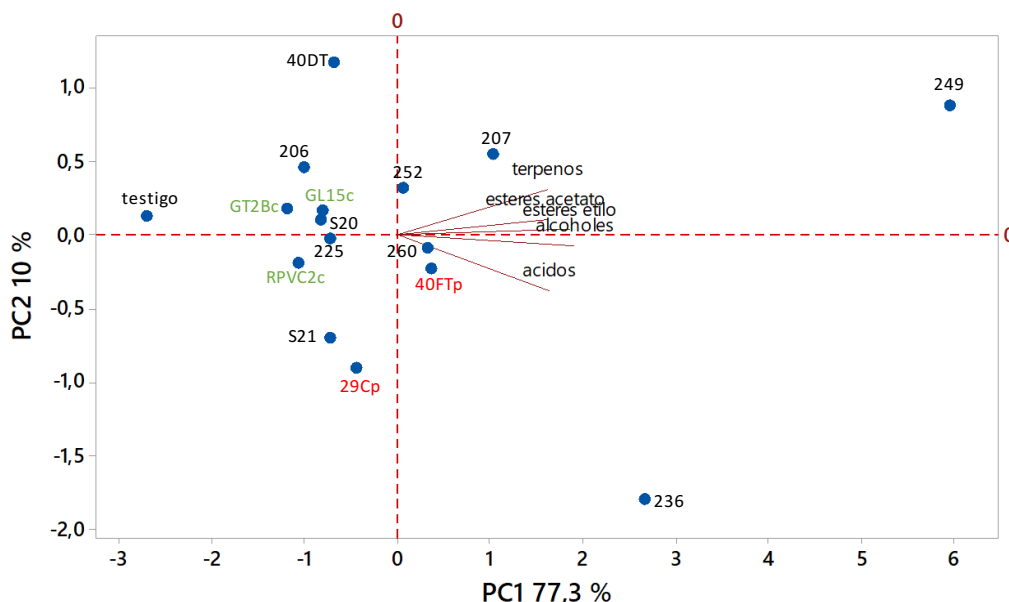
**Figura 5.7.** Producción de distintos tipos de compuestos volátiles por cepas *Saccharomyces*. A) Concentración B) Porcentaje de cada grupo de volátiles respecto del total producido por cada cepa.

Con excepción de los AGCM, las cepas produjeron la misma proporción de los diferentes grupos de compuestos volátiles, y dentro de cada grupo coincidieron en los

dos compuestos mayoritarios. Algunas excepciones fueron las altas proporciones de los alcoholes superiores y terpenos en la cepa 40DT y los ésteres de acetato en las cepas 206 y 207. En valor absoluto, se destacó la alta producción de ésteres de etilo por la cepa 249.

Es importante considerar que las uvas contienen componentes volátiles que pueden coincidir con los producidos por la levadura; estos compuestos pueden estar en forma libre o combinados mediante enlaces glicosídicos con un azúcar. Según Ghaste et al., (2015) Isabella contiene una amplia variedad de compuestos volátiles, en gran parte como precursores glicosilados. En su forma libre predominan el 2-feniletanol y terpinen-4-ol, lo que explicaría su presencia en la muestra testigo. En el mismo trabajo se reporta que ambos volátiles se liberan en altas concentraciones mediante una hidrólisis enzimática; por lo tanto, el incremento con respecto al testigo de estos compuestos en el mosto fermentado de todas las cepas se puede atribuir al metabolismo de las levaduras, pero también a una posible hidrólisis por glicosidasas producidas por la cepa. Los terpenos en general provienen de precursores glicosilados (Maicas & Mateo, 2005); sin embargo, se ha demostrado que diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* son capaces de sintetizarlos y excretarlos al medio, en particular 4-terpineol y su isómero  $\alpha$ -terpineol (Zea et al., 1995; Carrau et al., 2005).

Para visualizar la relación entre las cepas y los compuestos volátiles los datos se analizaron mediante ACP (Figura 5.8).



**Figura 5.8.** ACP de los productos volátiles producidos por cepas *Saccharomyces* en mosto de Isabella pasteurizado. En rojo, aisladas en v15; en verde, *S.cerevisiae* aisladas del vino de ciruela; el resto son aislamientos de *S. cerevisiae* de la fermentación de Isabella. **v15:** 40FTp (R1), 29Cp (R2), 40DT (R3); **v16:** 206, 207 (R1), 225, 236 (R2), 260, 249, 225, 252 (R3); **v17:** S20 (R2), S21 (R3).

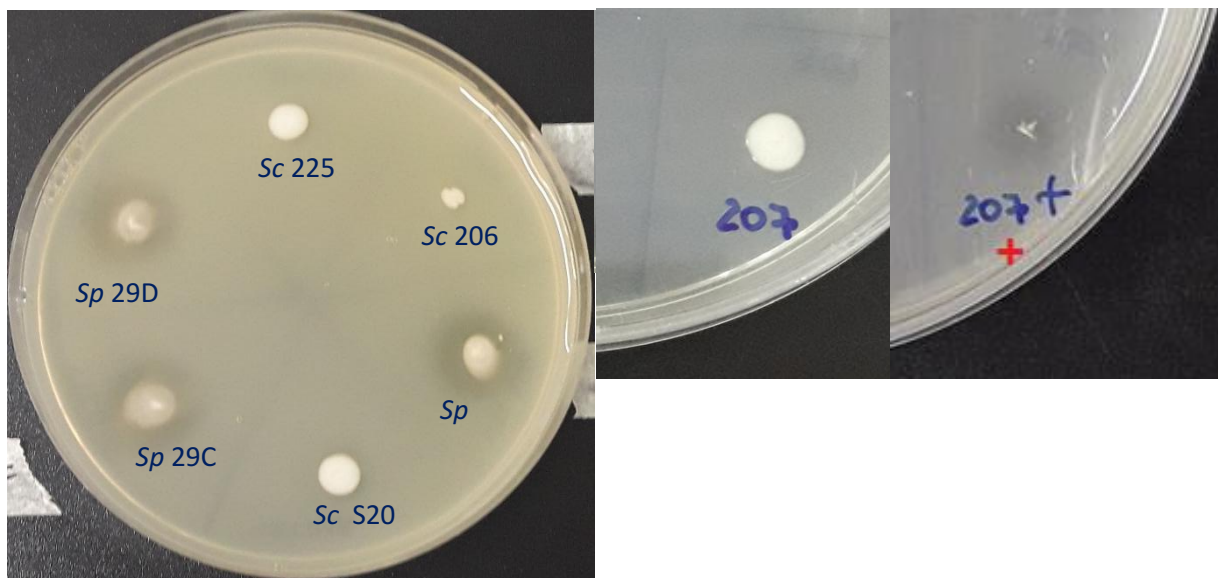
Todos los grupos de compuestos tuvieron influencias positivas y similares en el componente 1, es decir, contribuyeron aproximadamente en la misma proporción a la varianza del primer componente, que representó el 77 % de la varianza total. En el componente 2, los terpenos y AGCM fueron los compuestos más influyentes, con una tendencia opuesta y medianamente correlacionados ( $r = -0,469$ ). La mayoría de las cepas se distribuyen aleatoriamente entre los componentes principales, al igual que lo observado en la producción de los principales compuestos de fermentación. En este contexto cabe destacar que las dos cepas de *S.paradoxus* y las tres cepas de *S. cerevisiae* aisladas de la fermentación de la ciruela no presentaron un perfil de volátiles que las pudiera diferenciar del resto de las cepas.

Si bien el programa estadístico no mostró valores atípicos, la cepa 249 se ubicó muy distante del resto de cepas por su alta producción volátiles, en particular la producción de ésteres de etilo, la cepa 236 en el cuadrante inferior por su producción de AGCM y con menor distancia la cepa 40DT principalmente por el aporte de los terpenos en el componente 2. Por su parte, la cepa 260 se ubicó muy cerca del punto central, por lo que puede considerarse una cepa “promedio”, ya que los niveles de los compuestos volátiles que produce se encontraron cercanos al valor medio de todas las cepas: por ejemplo, la producción de ésteres de acetato de esta cepa fue de 2900  $\mu\text{g/l}$ , mientras que el promedio de todas las cepas fue de 2202  $\mu\text{g/l}$ . Como era de esperar, el testigo (mosto sin inocular) se ubicó distante y en sentido opuesto a la producción de volátiles en el componente 1. Finalmente, cabe mencionar que ninguna de los mostos fermentados por las cepas evidenció aromas reducidos o desagradables y fue notoria la percepción del aroma a ésteres en la cepa 249.

#### **5.3.4. Otras propiedades de las cepas.**

Todas las cepas fermentaron completamente en 8 días un mosto de Isabella pasteurizado con 25 °Bx (enriquecido en partes iguales con glucosa y fructosa). El tiempo de fermentación con mosto “normal” (sin adicionado de azúcar) no fue afectado por el agregado de 50 mg  $\text{SO}_2/\text{l}$  (100 mg/l metabisulfito de potasio), lo que era esperable, ya que todas las cepas fueron aisladas de mostos sulfitados con la misma concentración de  $\text{SO}_2$ . Por el contrario, no hubo fermentación visible cuando se agregó 160 mg  $\text{SO}_2/\text{l}$  (10 días de observación). Todas las cepas fermentaron maltosa aunque en proporción variable, este resultado es interesante a futuro para evaluar estas cepas en la fermentación de la cerveza incluyendo a *S. paradoxus* (Nikukin et al., 2020).

Todas las cepas dieron negativos los test de amilasa y proteasa. Sin embargo, la producción de PGasa fue variable, pudiendo distinguirse tres grupos: cepas + que dieron un halo nítido de hidrólisis alrededor de la colonia, este fue el caso de todas las cepas de *S. paradoxus*; cepas que mostraron hidrólisis luego de lavar la colonias con agua, es decir, que la actividad PGasa se visualizó en el agar que estuvo en contacto debajo de la colonia, pero no hubo difusión marcada al medio (cepas +/-); y cepas que dieron negativo el test (cepas -). Estos dos últimos casos se dieron solo con las cepas de *S. cerevisiae*. La hipótesis de que cepas provenientes de frutas ricas en pectina pudieran expresar actividad poligalacturonasa no puedo aceptarse. En la Figura 5.9 se pueden observar las placas de PGA de los tres tipos de cepas.



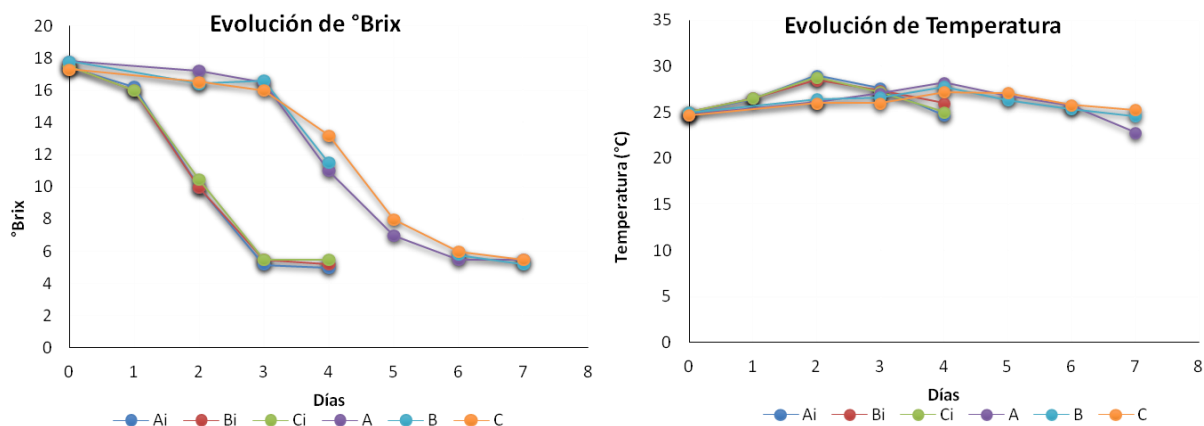
**Figura 5.9.** Test PGasa. **Cepas (+):** 29C, 29D, 29E, 40FT. **Cepas (+/-):** 205, 207, 236, 249, S21. **Cepas (-):** 44BT, 40DT, 225, 226, 252, 260, 206, GT2B, GL15, RPVC2, S20. Sc: *S. cerevisiae*; sp: *S. paradoxus*.

### 5.3.5. Fermentación espontánea vs inoculada.

Para llevar a cabo la fermentación inoculada fue necesario seleccionar una cepa sobre la base de las propiedades estudiadas. Se optó a los fines prácticos por la cepa “media” 260, es decir, la cepa cuya producción de compuestos volátiles es equilibrada y tiene buen rendimiento en alcohol. El objetivo del ensayo fue determinar el efecto de la inoculación en el desarrollo de la fermentación, la composición del vino y sus características sensoriales. El curso de la fermentación se siguió mediante la evolución



de los °Bx, la temperatura del mosto, el recuento viable de levaduras en WL para visualizar morfotipos y la observación microscópica. En la Figura 5.10 se muestra la evolución de los °Bx y la temperatura del medio durante la fermentación espontánea e inoculada del mosto v19 sulfitado.

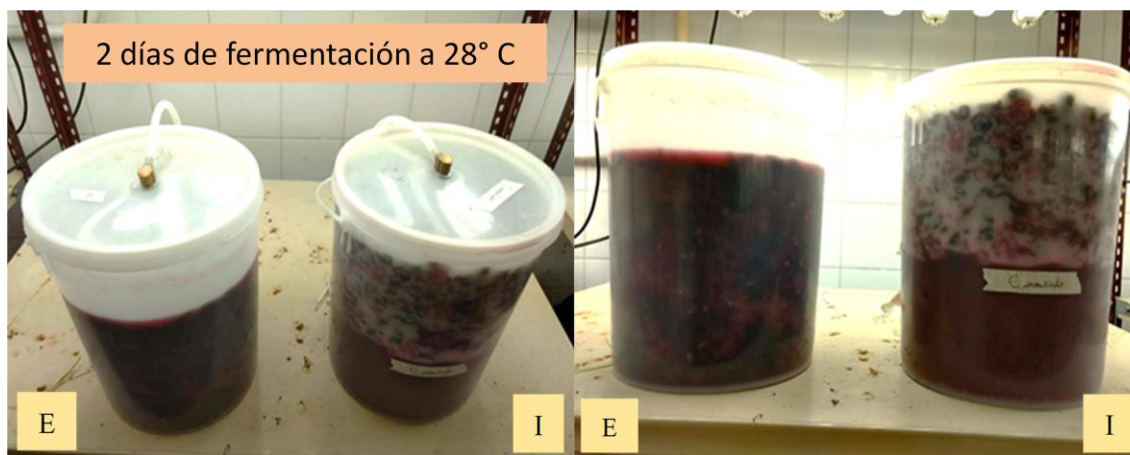


**Figura 5.10.** Evolución de °Bx (sin corrección por alcohol) y temperatura en la fermentación inoculada y espontánea de Isabella v19. Mosto sulfitado con ~50 mg SO<sub>2</sub>/l. A, B, C: réplicas de la fermentación espontánea; Ai, Bi, Ci: réplicas de la fermentación inoculada.

Como puede observarse en el gráfico, las cinéticas de ambas fermentaciones fueron muy diferentes, aunque en ambas se distinguen las tres fases características del proceso. El tiempo total de la fermentación espontánea fue de siete días, con un período de latencia de tres días y una fase tumultuosa de dos días. En el mosto inoculado el proceso fue mucho más rápido: el período de latencia fue de un día y la fermentación se completó rápidamente en tres días. La diferencia entre las cinéticas de ambas fermentaciones se pudo visualizar claramente al comparar el tiempo de fermentación requerido para alcanzar un determinado valor de °Bx. Así, por ejemplo, en la fermentación inoculada el valor de °Bx a los dos días fue de 10, mientras que el mismo valor en la espontánea se alcanzó a los cuatro días aproximadamente. Los cambios de temperatura del vino fueron indicativos de como evolucionó la fermentación: la temperatura máxima del mosto se registró en el momento de mayor actividad fermentativa, esto es, al segundo día en la inoculada y a los cuatro días en la espontánea, luego decreció paulatinamente hasta el final.

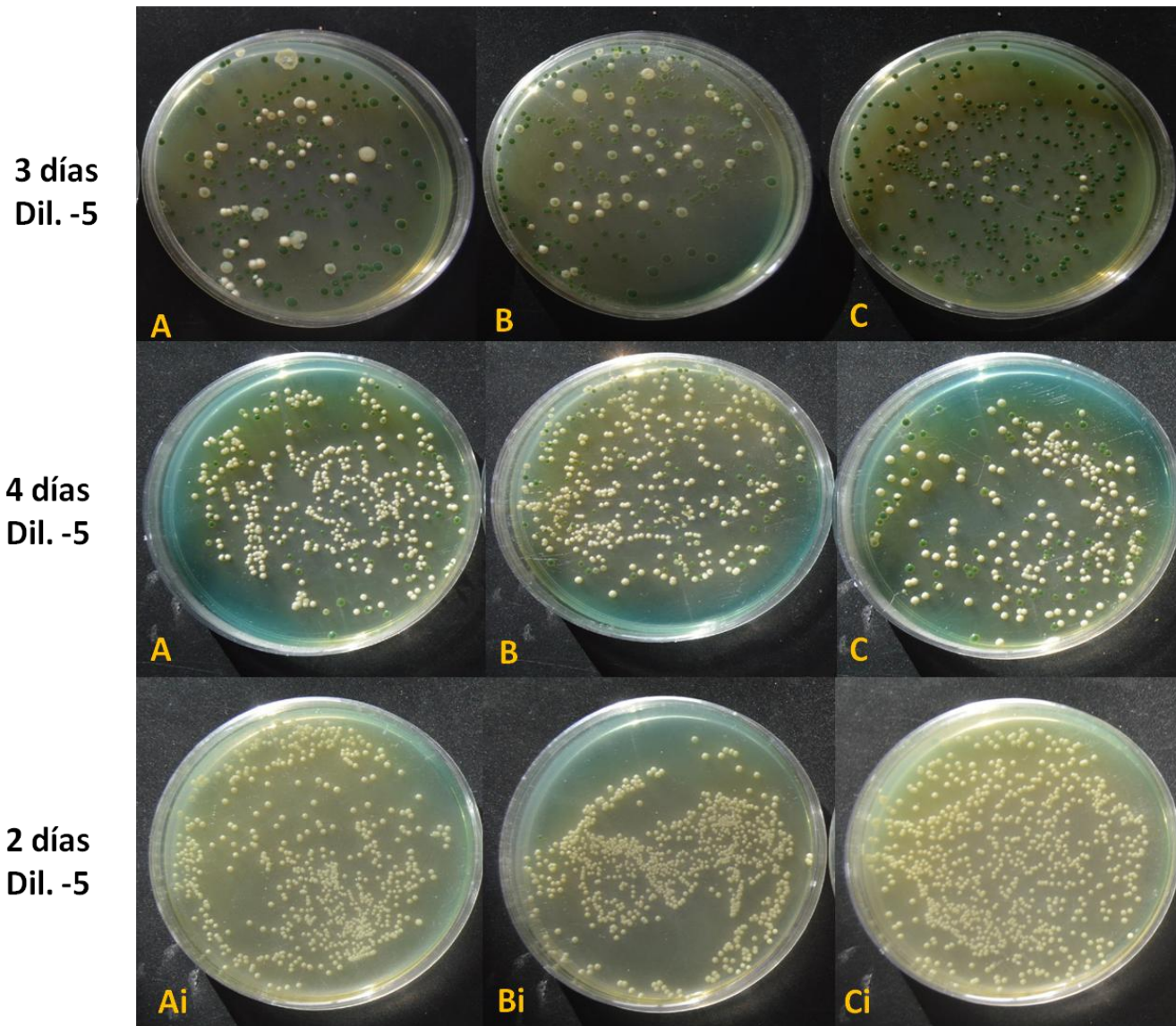
La fermentación inoculada mostró una mayor reproducibilidad que la espontánea cuando se compararon las cinéticas de las tres réplicas; por ejemplo, la réplica C de la

fermentación espontánea fue más lenta que las otras dos réplicas. Además se apreció la diferencia en la evolución de los °Bx: los °Bx a los cuatro días de la fermentación espontánea fueron  $11,9 \pm 1,15$  (CV 9,7 %), y para el inoculado a los dos días fue  $10,2 \pm 0,29$  (CV 2,8 %). En la Figura 5.11 se pueden visualizar los fermentadores luego de dos días de proceso, el inoculado finalizando la fermentación tumultuosa y espontáneo en el final de la fase de latencia.



**Figura 5.11.** Fermentación espontánea (E) e inoculada (I) a los dos días de fermentación.

Para el análisis microbiológico de la fermentación se realizaron recuentos de células viables en agar WL. En la Figura 5.12 se muestran las placas de dilución -5 de diferentes muestras de la fermentación. En la fermentación espontánea, a los tres días (nivel de alcohol estimado 2%), solo se observó la presencia de distintas especies no *Saccharomyces* (dil. -5), con un recuento promedio de  $2,08 (\pm 0,34) \times 10^7$  UFC/ml. A los cuatro días (etapa tumultuosa) se visualizó una población mixta con colonias típicas de *Saccharomyces*, con recuentos para este género de  $4,15 \times 10^7$  UFC/ml para las réplicas A y B, y  $2,8 \times 10^7$  UFC/ml para la réplica C, lo que representa un 80, 88 y 53% de la población total de levaduras viables, respectivamente. Los recuentos de no-*Saccharomyces* disminuyeron,  $6,5 \times 10^6$  UFC/ml para A y B y  $1,3 \times 10^7$  UFC/ml para la réplica C. En el descube, en la misma dilución -5 solo se observaron colonias típicas de *Saccharomyces*, con recuentos del orden de  $10^8$  UFC/ml (no mostrado).



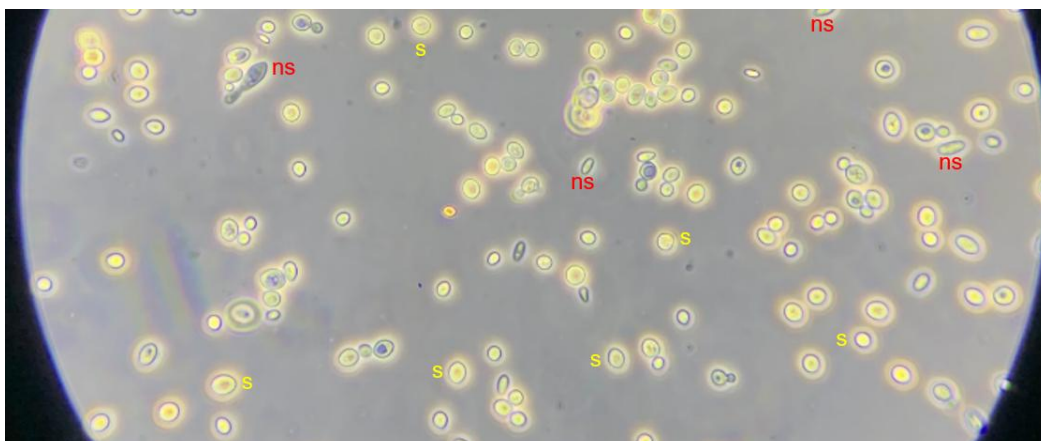
**Figura 5.12.** Colonias en WL de mostos/vinos de fermentación espontánea e inoculada, plaqueos (-5).

A, B y C réplicas de la fermentación espontánea. 3 días: A:  $2,17 \times 10^7$  UFC/ml ( $17,0 \text{ }^\circ\text{Bx}$ ); B:  $2,37 \times 10^7$  UFC/ml ( $17,0 \text{ }^\circ\text{Bx}$ ); C:  $1,7 \times 10^7$  UFC/ml ( $16,0 \text{ }^\circ\text{Bx}$ ). 4 días: A:  $4,4 \times 10^7$  UFC/ml ( $11^\circ\text{Bx}$ ); B:  $4,1 \times 10^7$  UFC/ml ( $12^\circ\text{Bx}$ ); C:  $4,8 \times 10^7$  UFC/ml ( $13 \text{ }^\circ\text{Bx}$ ). Las colonias blancas de los 3 días no corresponden a *Saccharomyces*.

Ai, Bi y Ci réplicas de la fermentación inoculada, 2 días. Ai:  $9,1 \times 10^7$  UFC/ml ( $10 \text{ }^\circ\text{Bx}$ ); Bi:  $1,22 \times 10^8$  UFC/ml ( $10^\circ\text{Bx}$ ); Ci:  $8,1 \times 10^7$  UFC/ml ( $11 \text{ }^\circ\text{Bx}$ ).

En las fermentaciones inoculadas, a los dos días se observaron en -5 (la menor dilución plaqueada) únicamente colonias típicas de *Saccharomyces*; esto implica que la inoculación redujo la colonización del mosto por parte de las levaduras no-*Saccharomyces* nativas, y confirmó lo observado en las fermentaciones v15 a v17: que la tasa de fermentación (velocidad de consumo de azúcar), y por ende el tiempo de fermentación hasta el agotamiento de los azúcares, depende del crecimiento de *Saccharomyces*. Si se asume la relación de conversión de azúcar a alcohol °Bx/alcohol de 0,58 y se corrigen los Brix por alcohol (Brix experimental 10,2, Brix corregido 6,2), el nivel de alcohol a los dos días de la fermentación inoculada se puede estimar en ~ 6,2%

La observación microscópica es el método más directo y eficaz para seguir el curso microbiológico de la fermentación del vino, existiendo siempre consistencia con lo observado en las placas de los recuentos viables en WL. En la Fig. 5.13 se muestra la microfotografía que corresponde a la muestra A de fermentación espontánea a los 4 días. Se puede apreciar la presencia mayoritaria de *Saccharomyces* y algunas morfologías características de no-*Saccharomyces*.



**Fig 5.13.** Observación por contraste de fase 1250 x. Fermentación espontánea 4 días, réplica A. ns: no-*Saccharomyces*, s: *Saccharomyces*.

El descube se llevó a cabo a los cuatro días para la fermentación inoculada y a los siete días para la espontánea. Los rendimientos de las distintas fracciones de vino y orujo se indican en la Tabla 5.7. El rendimiento promedio total en vino fue del 73% y el de orujo cercano al 19%; el 8% restante es el CO<sub>2</sub> producido en la fermentación. Si

bien no se observan diferencias significativas en los rendimientos en vino de las dos fermentaciones (test t,  $p < 0,05$ ), los valores medios fueron mayores en la fermentación espontánea. Con el orujo, la diferencia fue estadísticamente significativa siendo un 20% menor en la fermentación espontánea. De acuerdo a estos datos, se podría decir que en la fermentación espontánea se produjo una mayor maceración de la uva, dando lugar a un mayor volumen de vino y menor de orujo; sin embargo, esta situación debería haberse reflejado en un menor contenido de humedad del orujo en la fermentación espontánea, lo cual no sucedió.

**Tabla 5.7.** Rendimientos de la fermentación espontánea e inoculada en el descube.

Fermentación		Vino gota (ml)	Vino prensa (ml)	Vino total (ml)	Orujo húmedo (g)	Humedad orujo (%)	Σ total (vino + orujo) (g)
<b>Espontánea</b>	Media±DE	4883±76,4	530±61	5413±23,1	1260±26,5	84,13±2	6673±29
	%	67	7,2	74	17		91
<b>Inoculada</b>	Media±DE	4750±95,4	507±144	5257±102	1503±45,5	81,5±1,5	6760±61
	%	65	6,9	72,0	20,5		92,4
P (test t) <0.05		0,132	0,81	0,061	0,001	0,164	0,09
% se refiere a los kg iniciales de uva (7,3 kg). DE desviación estándar							

En la Tabla 5.8 se muestra la composición de los vinos obtenidos en ambos tipos de fermentaciones (inoculada y espontánea). Algunos productos, como etanol y glicerol, fueron analizados tanto por HPLC como por el INV, y hubo coincidencia en los valores obtenidos en ambas mediciones. El primer dato llamativo es que no hubo diferencias en los principales productos de fermentación: etanol, glicerol, succínico y CO<sub>2</sub> (estimado del balance de orujo + vino). Los cromatogramas de los vinos no mostraron diferencias significativas (Figura 5.14). Los análisis fisicoquímicos del INV dieron valores de acidez volátil superiores para la fermentación espontánea, del orden de 0,6 g/l. Sin embargo, el pico de acético no se pudo cuantificar en el HPLC (Figura 5.14), ya que las áreas de los picos dieron valores por debajo del límite de cuantificación. Cabe mencionar que en este análisis HPLC se utilizó un detector de IR de menor sensibilidad que el habitual, siendo el límite de detección del acético de 0,37 g/l. Otro dato a destacar fue la ausencia de fermentación maloláctica, ya que el pico de ácido láctico estuvo ausente en ambas fermentaciones. El pico de ácido málico (MAL,



tr 9,55 min) no es completamente separable del de fructosa (FRU, tr 9,95 min), pero al consumirse el azúcar se puede observar en el cromatograma el pico de ácido málico y un ligero hombro a su derecha, que es la fructosa residual. El nivel de alcohol promedio fue de 9,5%, que coincide con el valor potencial estimado de los °Bx iniciales (Tabla 5.1). La relación CO<sub>2</sub>/alcohol fue 1,06 g/g, y el balance de C cercano a la unidad confirmó la consistencia de los datos obtenidos (Tabla 5.9). Con excepción del glicerol, los rendimientos de los productos de fermentación en el mosto v19 inoculado no mostraron diferencias respecto a los obtenidos con la cepa 260 en mosto v18 pasteurizado.

Algunos parámetros de los vinos se diferenciaron significativamente, como el índice de color (IC) y el SO<sub>2</sub> total, que fueron más altos en la vinificación espontánea. En el caso de la acidez, los valores medios del pH y AT mostraron ligeros cambios respecto al valor del mosto, aunque estadísticamente no fueron significativos: la disminución del pH fue de 0,08 y 0,11 unidades y el incremento de la AT de 0,08% y 0,11% para el espontáneo e inoculado respectivamente. Otros análisis fisicoquímicos, como azúcares reductores, densidad y extracto seco no dieron diferencias significativas, mientras que el metanol, OCa y sulfatos estuvieron dentro de los límites establecidos por el INV (datos no mostrados).

**Tabla 5.8.** Características físicoquímicas de los vinos obtenidos por fermentación espontánea e inoculada.

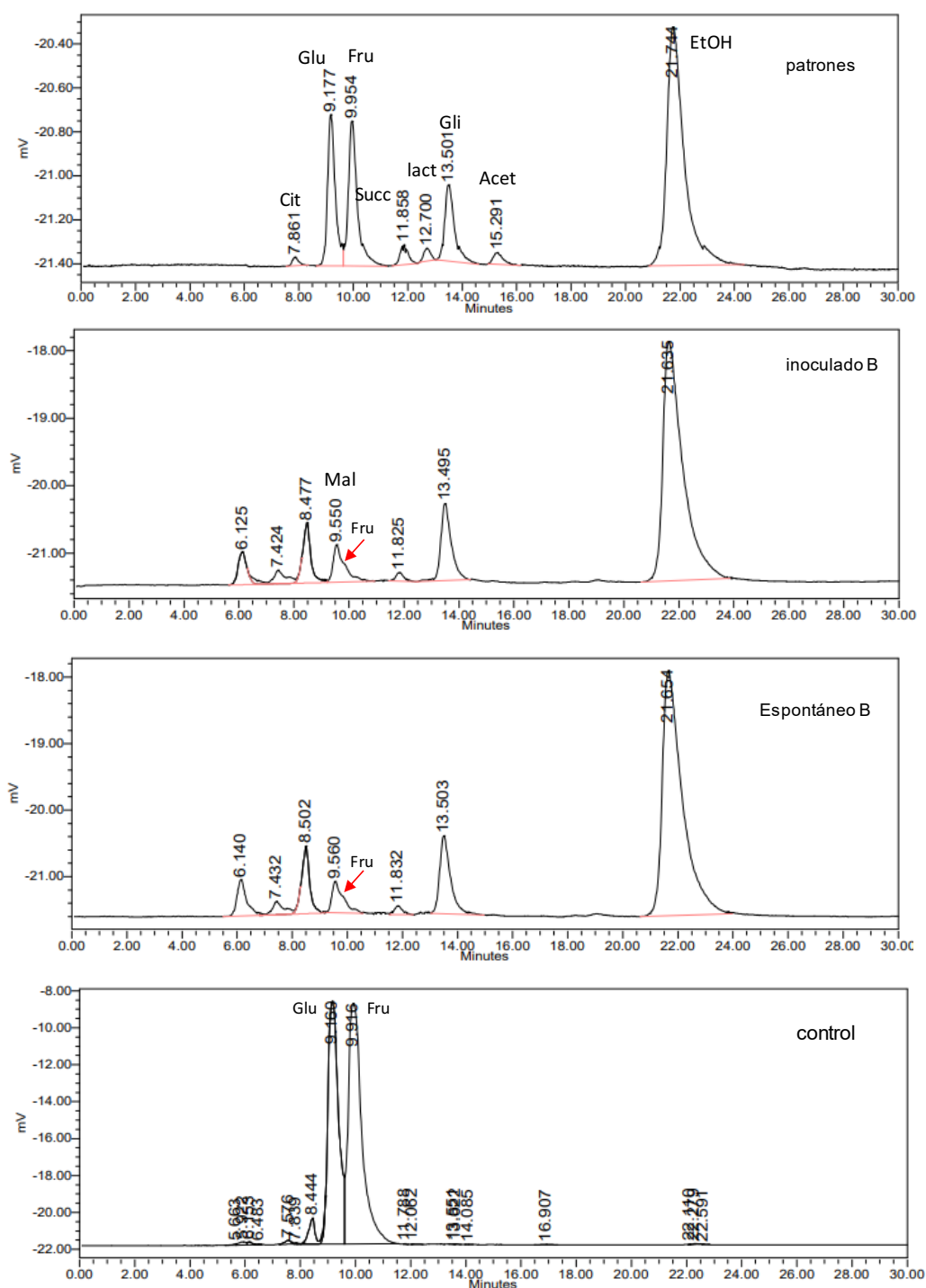
Fermentaciones		Densidad 20°C (g/ml)	Extracto seco (g/l)	Azúcares reductores (g/l)	pH	Acidez titulable (g tartárico/l)	Acidez volátil (g acético /l)	Alcohol (% 20°C)	Glicerol (g/l)	Succínico (g/l)	CO <sub>2</sub> total * (g)	Índice de color (IC)	Anhidrido sulfuroso total (mg/l)
<b>Espontánea</b>	Media±DE	0,995±0,0003	26,3±0,4	1,70±0,49	3,3±0,1	7,10±0,18	0,56±0,02	9,6±0,2	6,9±0,5	0,68±0,027	627±29	1330±75	58±7
<b>Inoculada</b>	Media±DE	0,995±0,0004	25,7±0,7	2,04±0,43	3,2±0,1	7,43±0,1	0,51±0,02	9,5±0,1	6,8±0,26	0,72±0,06	540±61	1158±48	38±0
<b>Test t (p &lt;0,05) Espontáneo vs. inoculado</b>		no difieren	p 0,29	p 0,43	p 0,29	p 0,19	p 0,038	p 0,52	p 0,78	p 0,428	p 0,15	p 0,04	p 0,038

Alcohol y glicerol fueron determinados por HPLC y por el INV, succínico por HPLC y el resto de los análisis fueron realizados en el INV. No se detectó acético por HPLC.  
\*CO<sub>2</sub> total estimado del balance de materia realizado en el descube (Tabla 5.8). Datos del mosto: Brix 17,0, azúcar 161,5 g/l, pH 3,4, AT 7,8 g/l  
Valores de p < 0,05 implican diferencias significativas en el test t. Análisis realizados 3 meses posteriores del envasado.

**Tabla 5.9.** Rendimientos en base al C y balance redox de la fermentación espontánea e inoculada.

Fermentación	Y <sub>alcohol</sub>	Y <sub>glicerol</sub>	Y <sub>succínico</sub>	Y <sub>acético</sub>	Y <sub>CO2</sub>	Balance de C	Balance de $\gamma$ i
<b>Espontánea</b>	0,62	0,042	0,0047	0,0035	0,37	1,04	0,99
<b>Inoculada</b>	0,61 (0,63)	0,042 - 0,029	0,0047 - 0,0039	0,0019 - 0,0022	0,32	0,98	0,97

En el balance de C no se incluyó la biomasa.  $y_{acético}$  calculado de la acidez volátil. Entre paréntesis rendimientos obtenido con la cepa 260 en mosto pasteurizado v18 (Tabla 5.5).  $\gamma$ i grado de reducción

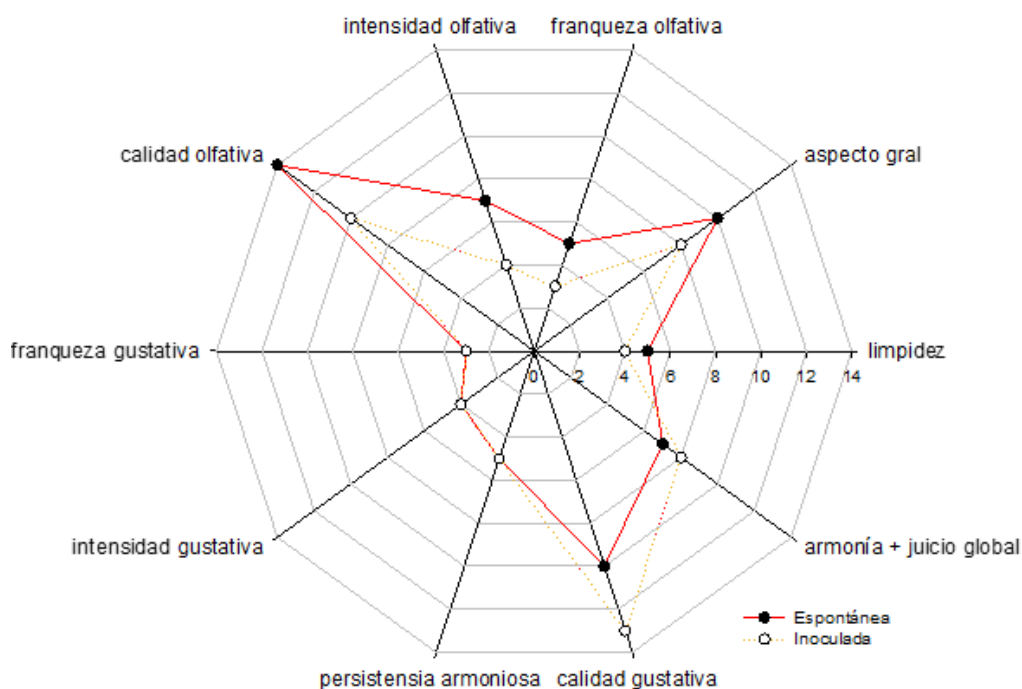


**Figura 5.14.** Cromatogramas de HPLC de vinos obtenidos por fermentación espontánea e inoculada. Detector RID Beckman 156. Límite de detección de acético 0,37 g/l. Los picos con  $tr \leq 8,05$  min no fueron identificados. Control: mosto pasteurizado sin inocular, 8 días de incubación a 30°C. Muestras analizadas sin diluir. Los picos en el cromatograma control donde se indican los tiempos de retención se encuentran cerca del límite de detección y además no fueron identificados.



### 5.3.6 Análisis sensorial de los vinos.

Los vinos de la fermentación espontánea e inoculada fueron evaluados sensorialmente (cata) en la Fiesta del Vino de la Costa año 2019, tres semanas después del embotellado. Es importante mencionar que el jurado no llevó a cabo un estudio comparativo de los vinos inoculado y espontáneo, sino que fue una cata a ciegas de varios vinos llevados al concurso por diferentes productores, similar a lo que se realizó en años anteriores, con la diferencia de que en este concurso se colocó puntaje a cada uno de los atributos indicados en la ficha de cata. Los resultados de la evaluación sensorial con el valor medio del puntaje de cada atributo se presentan en la Figura 5.16.



**Figura 5.16.** Gráfico radar de los atributos de los vinos obtenidos por fermentación espontánea e inoculada.

Los vinos v19 fueron considerados como aceptables, es decir, sin defectos que pudieran objetar su consumo. El vino de la fermentación espontánea se diferenció por un mejor aspecto general y por sus atributos olfativos. En el caso de la limpieza, la diferencia estuvo entre excelente (nota 5) para el espontáneo y límpido (nota 4) para el inoculado. El aspecto general se refiere a aspectos distintos a la limpieza, y que son

evaluados visualmente, como color principal, intensidad, matices, etc. La percepción de un mejor color en el vino espontáneo fue consistente con su mayor índice de color en el análisis fisicoquímico del INV.

El análisis olfativo incluyó la franqueza olfativa, que en el caso de la cata del Vino de la Costa el jurado lo refiere al grado de interferencia que puede percibir el olfato en el aroma “foxy” que ellos identifican como típico del vino de Isabella (ver capítulo. 2) y la intensidad olfativa, que es la facilidad de percibir el aroma o la potencia con que se percibe el aroma. Una intensidad olfativa alta se percibe sin necesidad de acercarse a la copa a la nariz; lo contrario ocurre cuando la intensidad es baja. El vino de fermentación espontánea fue mejor evaluado en franqueza e intensidad olfativa, por lo cual la calidad olfativa global recibió un puntaje significativamente mayor (14 a 10) y estadísticamente fue significativa (test t,  $p < 0,05$ ). Diferente fue la situación en la fase gustativa, ya que no hubo diferencias en la evaluación de la franqueza, intensidad y la persistencia armoniosa (medida de la duración remanente olfato-gustativa tras beber el vino), sin embargo, el jurado notó una acidez más marcada en el vino inoculado, que fue resaltado en la ficha de cata, por lo que finalmente la calidad gustativa global resultó en un menor puntaje comparado con el espontáneo. La valoración global, expresada como armonía + juicio global, mostró una diferencia de un punto en favor del vino inoculado, lo cual no es fácil de explicar según los resultados de los otros atributos. Según la OIV (2009), la armonía + juicio global permite abordar el concepto difícil de tipicidad. El puntaje final (suma total de los atributos) fue 70 para la espontánea y 62 para el vino inoculado. Como se mencionó en el capítulo 3, la valoración del vino debe de considerarse también en función de los puntajes obtenidos por vinos similares en el año del concurso. En v19, los puntajes de los vinos se encontraron en el rango de 79 a 86 (primer premio), por lo que hubo una diferencia apreciable de los vinos del ensayo con respecto a los premiados. Al igual que lo ocurrido en años anteriores, los únicos vinos que fueron acompañados con un análisis fisicoquímico básico fueron los del presente ensayo, lo que dificulta la interpretación de los resultados globales de la cata.

#### **5.4. Discusión y conclusiones.**

La fermentación natural de la uva para transformarse en vino es un proceso complejo, fuertemente influenciado por las características fisicoquímicas y biológicas (microbiota) de la uva al momento de la vendimia. Debido a las variaciones en las condiciones iniciales del mosto, es inevitable que el vino no tenga una composición

constante entre vendimias. Los cambios de composición se traducen en variaciones organolépticas y en la percepción de calidad que el consumidor tiene del producto. Los ensayos en pequeña escala, aún bajo condiciones controladas, mostraron que efectivamente esto ocurre en la fermentación espontánea de Isabella. Una manera de disminuir hasta cierto punto la variabilidad de la vinificación es controlar las levaduras de la fermentación; en la práctica esto implica inocular el vino. De esta manera, teniendo en cuenta la tendencia actual de emplear cepas de levaduras autóctonas para realizar vinificaciones dirigidas, se realizó el presente estudio a escala de laboratorio con el fin de evaluar el efecto de la inoculación en la fermentación y en las características fisicoquímicas y sensoriales del vino de Isabella.

Para “seleccionar” una cepa se analizó previamente el comportamiento fermentativo de varias cepas de *S. cerevisiae* y *S. paradoxus* aisladas durante el desarrollo de la fermentación espontánea en diferentes vendimias (v15, v16 y v17), y de cepas aisladas del denominado fermentado de ciruela. Todas las cepas ensayadas llevaron a cabo la fermentación alcohólica del mosto de Isabella pasteurizado sin defectos o aromas negativos y con una cinética de disminución de los Brix muy similar. Si se considera a las cepas estudiadas como las más adaptadas para fermentar Isabella, entonces las diferencias en los tiempos de fermentación que se observaron en las fermentaciones espontáneas v15 a v17, se deben atribuir a diferencias en la composición química y microbiológica inicial del mosto que condicionaron el crecimiento de *Saccharomyces*, y no a la capacidad intrínseca de las cepas de realizar la fermentación. Cuando las cepas fueron inoculadas en forma aislada en una misma condición, el patrón de fermentación no mostró diferencias. Este resultado también indica que la capacidad de las cepas para llevar a cabo la fermentación alcohólica no depende necesariamente de la presencia de otros microorganismos. Las cepas aisladas del fermentado de ciruela respondieron de manera similar a las cepas provenientes de la uva Isabella. Se puede concluir que las cepas *Saccharomyces* estudiadas no son específicas para fermentar una u otra fruta y que en realidad son funcionalmente equivalentes, aún cuando provengan de diferente hábitats o nichos ecológicos, tal como lo sugiere Goddard & Grey (2015).

El análisis por HPLC confirmó que los principales productos de la fermentación de las cepas *Saccharomyces* fueron el alcohol, glicerol, succínico y acético, cuyas concentraciones se encontraron dentro de los valores usualmente reportados para *S. cerevisiae* en mostos con 200 g/l de azúcar fermentable. El análisis mediante ACP de los rendimientos de cada producto mostró tendencias opuestas en la producción de

etanol/glicerol y de acético/succínico. Las cepas de *S. cerevisiae* se distribuyeron sin un patrón definido, es decir en forma aleatoria en relación a los rendimientos, pero en el caso de *S. paradoxus* se observó una tendencia hacia una mayor rendimiento en glicerol y menor rendimiento en acético, en coincidencia con el trabajo de Orlić et al, (2010) y el más reciente de Constantini et al., (2021). Existe un interés actual en buscar cepas que produzcan mayor cantidad de glicerol y menor concentración de alcohol, debido al incremento del azúcar en la uva por efecto del cambio climático (Goold et al., 2014). Este objetivo es de importancia relativa en la fermentación del Vino de la Costa, ya que en realidad es preferible que las cepas produzcan alcohol con un buen rendimiento, debido a que el nivel de azúcar de la Isabella es de por sí bajo respecto a las uvas viníferas. Las cepas produjeron entre 5 y 8 g/l de glicerol, y según algunos estudios, este rango de glicerol tendría poco impacto sensorial en el vino (Yanniotis et al., 2007).

El análisis de compuestos volátiles mostró que los ésteres de etilo, etil octanoato y etildecanoato fueron los compuestos predominantes, seguidos de los alcoholes superiores y ésteres de acetato. A diferencia de su contraparte (los alcoholes superiores y los AGCM), los ésteres tienen un bajo umbral odorífico y presentan notas frutales y florales, por lo cual son muy importantes en la percepción fina de los aromas y sabores del vino (Bartowsky & Pretorius, 2009; Carrau et al., 2017). A modo de ejemplo, el alcohol isoamílico (esmalte de uñas) tiene un umbral odorífico de 30 mg/l, el acetato de isoamilo (banana, pera) 0,03 mg/l, el ácido decanoico (graso) ~ 7 mg/l y el correspondiente decanoato de etilo (floral, jabonoso) 0,2 mg/l. Las cepas produjeron estos compuestos volátiles en diferentes concentraciones, pero en proporciones similares, con excepción de la AGCM y algunos casos aislados que deben confirmarse, por ejemplo, la alta concentración de ésteres de acetato de la cepa 249.

La selección de una cepa para inocular debe tener en cuenta el tipo de vino que se desea obtener. En base a los resultados expuestos, varias de las cepas estudiadas podrían haberse utilizado como inóculo para una fermentación dirigida. Se seleccionó la cepa 260 por su buen rendimiento en alcohol y un perfil balanceado de volátiles. Si bien no se utilizaron marcadores moleculares para la trazabilidad de la cepa inoculada, la evolución de los °Bx y el análisis microbiológico sugirieron que la cepa colonizó rápidamente el mosto de Isabella, limitando el crecimiento de las no-*Saccharomyces* y reduciendo a la mitad el tiempo de fermentación. Este resultado demostró nuevamente que el crecimiento de *Saccharomyces* es el que controla la cinética de la fermentación alcohólica. Por su parte, la inhibición de las levaduras no-*Saccharomyces* por cepas

específicas de *S. cerevisiae* ha sido reportado por varios autores (Raspor et al., 2002, Albergaria et al., 2010; Bagheri et al., 2017).

El análisis químico de los vinos obtenidos en las dos fermentaciones mostró resultados interesantes. En primer lugar, no hubo diferencias significativas en los principales productos de fermentación, como alcohol, glicerol y succínico. Una hipótesis sencilla en el caso del etanol, es que las principales especies de levaduras no-*Saccharomyces* aisladas de la Isabella, como *H.uvarum* y *S. bacillaris* (capítulo 4), tienen menor capacidad fermentativa (menor producción de alcohol); pero el rendimiento de alcohol en base al azúcar consumido no fue tan disímil del rendimiento respecto a las *Saccharomyces*; por lo tanto, si estas mismas especies predominaron en los primeros días de la fermentación espontánea, la concentración final de etanol sería similar a la que produciría una única cepa de *Saccharomyces*. Por otra parte, la inoculación redujo la acidez volátil y la concentración de SO<sub>2</sub>, lo que puede considerarse beneficioso para el vino.

Los vinos de fermentación espontánea e inoculada fueron evaluados sensorialmente (cata) por un jurado que es conocedor del Vino de la Costa. El resultado global proporcionó un mayor puntaje al vino obtenido de la fermentación espontánea. En el vino inoculado se notó cierta interferencia con el aroma característico de la uva Isabella y en la fase gustativa una marcada acidez. Según Amerine et al., (1965) el pH y la acidez titulable inciden en la respuesta sensorial al sabor ácido; las diferencias en los valores de estos parámetros entre ambos vinos (0,1 unidad de pH, 0,03 % AT) podrían explicar en parte la mayor percepción de la acidez en el vino inoculado (Amerine et al., 1965), más allá de que el vino de la Costa tiene una acidez de base característica cuya causa no es del todo clara (capítulo 2). Tal como se mencionó en el capítulo 3, las muestras de vino para la cata deberían haberse presentado con un análisis químico básico, lo cual no fue exigido por los organizadores. La falta de información sobre la composición de los vinos dificulta la interpretación de las diferencias encontradas en los resultados de la cata cuando se compara los vinos del presente trabajo con las muestras llevada por otros productores.

Como conclusión general, se puede establecer que es posible controlar la fermentación de Isabella inoculando el mosto con una cepa nativa, pero su impacto en las características del vino debe ser evaluado con mayor detalle. Dado que se han aislado numerosas cepas de *S. cerevisiae* y de *S. paradoxus* de la fermentación espontánea de Isabella, los estudios de inoculación pueden extenderse a otras cepas de la misma especie, para lo cual es necesario llevar a cabo un amplio estudio previo

que incluya el empleo de técnicas moleculares para la diferenciación intraespecífica de los aislamientos y un screening más extenso de sus propiedades fermentativas y enológicas.

Debido a que *Saccharomyces* presenta una elevada propensión a modificar su genoma (de ahí su alta variabilidad genética), incluso durante la fermentación, la etapa final de selección debería incluir algún plan de “estabilización genética” para garantizar la obtención de resultados reproducibles (Sipiczki, 2010).

## 5.5. Referencias.

Albers, E.; Larsson, C.; Lid n, G.; Niklasson, C., & Gustafsson, L. (1996). Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(9), 3187-3195.

Albergaria, H. & Arneborg, N. (2016). Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(5), 2035-2046.

Amerine, M. A.; Roessler, E. B. & Ough, C. S. (1965). Acids and the acid taste. I. The effect of pH and titratable acidity. *American Journal of Enology and viticulture*, 16(1), 29-37.

Ansanay-Galeote, V.; Blondin, B.; Dequin, S. & Sablayrolles, J. M. (2001). Stress effect of ethanol on fermentation kinetics by stationary-phase cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 23(9), 677-681.

Arcanjo, N. M. D. O.; Bezerra, T. K. A.; Silva, F. L. H. D. & Madruga, M. S. (2015). Optimization of the HS-SPME-GC/MS technique for determining volatile compounds in red wines made from Isabel grapes (*Vitis labrusca*). *Food Science and Technology*, 35, 676-682.

Barata, A.; Malfeito-Ferreira, M. & Loureiro, V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, 153(3), 243-259.

Bagheri, B.; Bauer, F. F. & Setati, M. E. (2017). The impact of *Saccharomyces cerevisiae* on a wine yeast consortium in natural and inoculated fermentations. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1988.

Bartowsky, E. J. & Pretorius, I. S. (2009). Microbial formation and modification of flavor and off-flavor compounds in wine (pp. 209-231). Springer Berlin Heidelberg.

Belda, I.; Zorraonaindia, I.; Perisin, M.; Palacios, A. & Acedo, A. (2017). From vineyard soil to wine fermentation: microbiome approximations to explain the “terroir” concept. *Frontiers in Microbiology*, 8, 821.

Belda, I.; Ruiz, J.; Esteban-Fernández, A.; Navascués, E.; Marquina, D.; Santos, A. & Moreno-Arribas, M. V. (2017). Microbial contribution to wine aroma and its intended use for wine quality improvement. *Molecules*, 22(2), 189.

Bely, M.; Salmon, J. M. & Barre, P. (1994). Assimilable nitrogen addition and hexose transport system activity during enological fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 100(4), 279-282.

Bely, M.; Sablayrolles, J. M. & Barre, P. (1990). Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 70(4), 246-252.

Bisson, L. F. & Walker, G. A. (2015). The microbial dynamics of wine fermentation. In *Advances in Fermented Foods and Beverages* (pp. 435-476). Woodhead Publishing.

Bozoudi, D. & Tsaltas, D. (2016). Grape microbiome: potential and opportunities as a source of starter cultures. *Grape and Wine Biotechnology*.

Brea, A. (2015). Utilización de pectinasas en el proceso de elaboración del vino de ciruela de Berisso (Laboratorio de Procesos Biotecnológicos). Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. La Plata.

Butnariu, M. & Butu, A. (2019). The Evolution and the development phases of wine. In *Alcoholic beverages* (pp. 303-345). Woodhead Publishing.

Camarasa, C.; Sanchez, I.; Brial, P.; Bigey, F. & Dequin, S. (2011). Phenotypic landscape of *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation: evidence for origin-dependent metabolic traits. *PloS one*, 6(9), e25147.

Capece, A.; Romaniello, R.; Pietrafesa, R. & Romano, P. (2014). Indigenous *Saccharomyces cerevisiae* yeasts as a source of biodiversity for the selection of starters for specific fermentations. In *BIO web of Conferences* (Vol. 3, p. 02003). EDP Sciences.

Capozzi, V.; Fragasso, M.; Romaniello, R.; Berbegal, C.; Russo, P. & Spano, G. (2017). Spontaneous food fermentations and potential risks for human health. *Fermentation*, 3(4), 49.

Carrau, F.; Medina, K.; Fariña, L.; Boido, E. & Dellacassa, E. (2010). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* inoculum size on wine fermentation aroma compounds and its relation with assimilable nitrogen content. *International Journal of Food microbiology*, 143(1-2), 81-85.

Carrau, F.; Boido, E. & Dellacassa, E. (2017). Yeast diversity and flavor compounds. *Fungal metabolites*, 569-597.

Catania, C. & Avagnina, S. (2007). Curso Superior de Degustación de Vinos. EEAMendoza. INTA.

Charters, S. & Pettigrew, S. (2007). The dimensions of wine quality. *Food Quality and Preference*, 18(7), 997-1007.

Ciani, M.; Mannazzu, I.; Marinangeli, P.; Clementi, F. & Martini, A. (2004). Contribution of winery-resident *Saccharomyces cerevisiae* strains to spontaneous grape must fermentation. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 85(2), 159-164.

Ciani, M.; Comitini, F.; Mannazzu, I. & Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS yeast research*, 10(2), 123-133.

Ciani, M.; Capece, A.; Comitini, F.; Canonico, L.; Siesto, G., & Romano, P. (2016). Yeast interactions in inoculated wine fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 7, 555.

Ciani, M., & Comitini, F. (2019). Yeast ecology of wine production. In *Yeasts in the Production of Wine* (pp. 1-42). Springer, New York, NY.

Cojocar, G. A. & Antocea, A. O. (2012). A new refractometric methodology used to monitor fermentations. *Scientific Papers-Series B, Horticulture*, (56), 451-456.

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.

Comitini, F., Agarbati, A., Canonico, L., & Ciani, M. (2021). Yeast interactions and molecular mechanisms in wine fermentation: A Comprehensive Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 7754.

Costantini, A.; Cravero, M. C.; Panero, L.; Bonello, F.; Vaudano, E.; Pulcini, L. & Garcia-Moruno, E. (2021). Wine fermentation performance of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* strains isolated in a Piedmont vineyard. *Beverages*, 7(2), 30.

De Deken, R. H. (1966). The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *Microbiology*, 44(2), 149-156.

Del Mónaco, S. M.; Curilen, Y.; Maturano, R. C.; Bravo, S. M. E.; Simes, A. B. & Caballero, A. C. (2016). The use of indigenous yeast to develop high-quality Patagonian wines. *Grape and Wine Biotechnology*, 325-344.

Dzialo, M. C.; Park, R.; Steensels, J.; Lievens, B. & Verstrepen, K. J. (2017). Physiology, ecology and industrial applications of aroma formation in yeast. *FEMS microbiology reviews*, 41(Supp\_1), S95-S128.



Espejo, F. (2021). Role of commercial enzymes in wine production: A critical review of recent research. *Journal of Food Science and Technology*, 58(1), 9-21.

Ghaste, M.; Narduzzi, L.; Carlin, S.; Vrhovsek, U.; Shulaev, V. & Mattivi, F. (2015). Chemical composition of volatile aroma metabolites and their glycosylated precursors that can uniquely differentiate individual grape cultivars. *Food Chemistry*, 188, 309-319.

Gobert, A.; Tourdot-Maréchal, R.; Sparrow, C.; Morge, C. & Alexandre, H. (2019). Influence of nitrogen status in wine alcoholic fermentation. *Food microbiology*, 83, 71-85.

Gonzalez, R.; Munoz, R. & Carrascosa, A. V. (2011). Production of wine starter cultures. *Molecular Wine Microbiology*, 279-302.

González, M.; Voget, C.; Fernández, R.; Fernández, M.; Mengucci, F.; Brea, A.; Tenorio, C., & Ruiz-Larrea, F. (2014). Molecular identification and characterization of the indigenous *Saccharomyces cerevisiae* GL15 strain responsible of traditional plum juice fermentations. NAFI. International Food Congress 2014. Kusadasi. Turquía.

Goddard, M. R., & Greig, D. (2015). *Saccharomyces cerevisiae*: a nomadic yeast with no niche?. *FEMS yeast research*, 15(3), fov009.

Goold, H. D.; Kroukamp, H.; Williams, T. C.; Paulsen, I. T.; Varela, C. & Pretorius, I. S. (2017). Yeast's balancing act between ethanol and glycerol production in low-alcohol wines. *Microbial biotechnology*, 10(2), 264-278.

Grangeteau, C.; Gerhards, D.; von Wallbrunn, C.; Alexandre, H.; Rousseaux, S., & Guilloux-Benatier, M. (2016). Persistence of two non-*Saccharomyces* yeasts (*Hanseniaspora* and *Starmerella*) in the cellar. *Frontiers in Microbiology*, 7, 268.

Granchi, L.; Ganucci, D.; Buscioni, G.; Mangani, S. & Guerrini, S. (2019). The biodiversity of *Saccharomyces cerevisiae* in spontaneous wine fermentation: the occurrence and persistence of winery-strains. *Fermentation*, 5(4), 86.

Henriques, D. & Balsa-Canto, E. (2021). The Monod model is insufficient to explain biomass growth in nitrogen-limited yeast fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(20), e01084-21.

Insa, G.; Sablayrolles, J. M. & Douzal, V. (1995). Alcoholic fermentation under oenological conditions. *Bioprocess Engineering*, 13(4), 171-176.

Jolly, N. P.; Augustyn, O. P. R. & Pretorius, I. S. (2003). The effect of non-*Saccharomyces* yeasts on fermentation and wine quality. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 24(2), 55-62.

Jouhten, P., Wiebe, M., & Penttilä, M. (2012). Dynamic flux balance analysis of the metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* during the shift from fully respirative or respirofermentative metabolic states to anaerobiosis. *The FEBS journal*, 279(18), 3338-3354.

Knight, S.; Klaere, S.; Fedrizzi, B. & Goddard, M. R. (2015). Regional microbial signatures positively correlate with differential wine phenotypes: evidence for a microbial aspect to terroir. *Scientific reports*, 5(1), 14233.

Le Jeune, C.; Erny, C.; Demuyter, C. & Lollier, M. (2006). Evolution of the population of *Saccharomyces cerevisiae* from grape to wine in a spontaneous fermentation. *Food Microbiology*, 23(8), 709-716.

Liu, X.; Jia, B.; Sun, X.; Ai, J.; Wang, L.; Wang, C. & Huang, W. (2015). Effect of initial pH on growth characteristics and fermentation properties of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Food Science*, 80(4), M800-M808.

Lopes, C. A.; Rodríguez, M. E.; Sangorrín, M.; Querol, A. & Caballero, A. C. (2007). Patagonian wines: the selection of an indigenous yeast starter. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34(8), 539-546.

Luzikov, V. N.; Zubatov, A. 5. & Rainina, E. 1. (1970). Degradation of mitochondria<sup>1</sup> respiratory system of *Saccharomyces cerevisiae*, induced by respiratory inhibitors, uncouplers and anaerobiosis. *FEBS Lett* 11, 233-236.

Maicas, S. & Mateo, J. J. (2005). Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(3), 322-335.

Manginot, C.; Roustan, J. L. & Sablayrolles, J. M. (1998). Nitrogen demand of different yeast strains during alcoholic fermentation. Importance of the stationary phase. *Enzyme and Microbial Technology*, 23(7-8), 511-517.

Marsit, S. & Dequin, S. (2015). Diversity and adaptive evolution of *Saccharomyces* wine yeast: a review. *FEMS Yeast Research*, 15(7), fov067.

Martini, A.; Ciani, M. & Scorzetti, G. (1996). Direct enumeration and isolation of wine yeasts from grape surfaces. *American Journal of Enology and viticulture*, 47(4), 435-440.

Martini, A. (2003). Biotechnology of natural and winery-associated strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Microbiology*, 6(3), 207-209.

Martínez-Moreno, R.; Morales, P.; Gonzalez, R.; Mas, A. & Beltran, G. (2012). Biomass production and alcoholic fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* as a function of nitrogen source. *FEMS Yeast Research*, 12(4), 477-485.

Mateo, J. J. & Maicas, S. (2016). Application of non-*Saccharomyces* yeasts to wine-making process. *Fermentation*, 2(3), 14.

Mendes-Ferreira, A.; Mendes-Faia, A. & Leão, C. (2004). Growth and fermentation patterns of *Saccharomyces cerevisiae* under different ammonium concentrations and its implications in winemaking industry. *Journal of Applied Microbiology*, 97(3), 540-545.

Mendoza, L. M., Merín, M. G., Morata, V. I., & Farías, M. E. (2011). Characterization of wines produced by mixed culture of autochthonous yeasts and *Oenococcus oeni* from the northwest region of Argentina. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(11), 1777-1785.

Mercado, L.; Dalcerro, A.; Masuelli, R. & Combina, M. (2007). Diversity of *Saccharomyces* strains on grapes and winery surfaces: analysis of their contribution to fermentative flora of Malbec wine from Mendoza (Argentina) during two consecutive years. *Food microbiology*, 24(4), 403-412.

Mercado, L.; Jubany, S.; Gaggero, C.; Masuelli, R. W. & Combina, M. (2010). Molecular relationships between *Saccharomyces cerevisiae* strains involved in winemaking from Mendoza, Argentina. *Current microbiology*, 61(6), 506-514.

Mills, D. A.; Phister, T.; Neeley, E. & Johannsen, E. (2008). Wine fermentation. In *Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods* (pp. 162-192). Springer, New York, NY.

Navarrete-Bolaños, J. L. (2012). Improving traditional fermented beverages: how to evolve from spontaneous to directed fermentation. *Engineering in Life Sciences*, 12(4), 410-418.

Nikulín, J., Vidgren, V., Krogerus, K., Magalhães, F., Valkeemäki, S., Kangas-Heiska, T., & Gibson, B. (2020). Brewing potential of the wild yeast species *Saccharomyces paradoxus*. *European Food Research and Technology*, 246, 2283-2297.

Ocón, E.; Gutiérrez, A. R.; Garijo, P.; López, R. & Santamaría, P. (2010). Presence of non-*Saccharomyces* yeasts in cellar equipment and grape juice during harvest time. *Food microbiology*, 27(8), 1023-1027.

OIV. (2009). Resolución OIV/CONCOURS 332a/2009. Norma OIV de los concursos internacionales de vinos y bebidas espirituosas de origen vitivinícola.

Orlić, S.; Arroyo-López, F. N.; Huić-Babić, K.; Lucilla, I.; Querol, A. & Barrio, E. (2010). A comparative study of the wine fermentation performance of *Saccharomyces*

*paradoxus* under different nitrogen concentrations and glucose/fructose ratios. *Journal of Applied Microbiology*, 108(1), 73-80.

Otero, R. C. (2010). Desarrollo de cepas dianas de levadura para la industria vínica. *ACE: Revista de enología*, (120), 1.

Padilla, B.; Gil, J. V. & Manzanares, P. (2016). Past and future of non-*Saccharomyces* yeasts: From spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity. *Frontiers in Microbiology*, 7, 411.

Padilla, B.; Zulian L.; Ferreres, À.; Pastor, R.; Esteve-Zarzoso, B.; Beltran, G. & Mas, A. (2017). Sequential inoculation of native non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae* strains for wine making. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1293.

Palma, M.; Madeira, S. C.; Mendes-Ferreira, A. & Sá-Correia, I. (2012). Impact of assimilable nitrogen availability in glucose uptake kinetics in *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *Microbial Cell Factories*, 11(1), 1-11.

Panighel, A. & Flamini, R. (2014). Applications of solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry (SPME-GC/MS) in the study of grape and wine volatile compounds. *Molecules*, 19(12), 21291-21309.

Perez, M.; Luyten, K.; Michel, R.; Riou, C. & Blondin, B. (2005). Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* hexose carrier expression during wine fermentation: both low-and high-affinity Hxt transporters are expressed. *FEMS Yeast Research*, 5(4-5), 351-361.

Perry, D.M.; Byrnes, N.K.; Heymann, H. & Hayes, J.E. (2019). Rejection of *labrusca*-type aromas in wine differs by wine expertise and geographic region. *Food Quality and Preference*, 74, 147-154.

Pretorius, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16(8), 675-729.

Pulvirenti, A.; Rainieri, S.; Boveri, S. & Giudici, P. (2009). Optimizing the selection process of yeast starter cultures by preselecting strains dominating spontaneous fermentations. *Canadian Journal of Microbiology*, 55(3), 326-332.

Rainieri, S. & Pretorius, I. S. (2000). Selection and improvement of wine yeasts. *Annals of Microbiology*, 50(1), 15-32.

Raymond Eder, M. L., Reynoso, C., Lauret, S. C., & Rosa, A. L. (2017). Isolation and identification of the indigenous yeast population during spontaneous fermentation of Isabella (*Vitis labrusca* L.) grape must. *Frontiers in Microbiology*, 8, 532.

Raymond Eder, M. L., Conti, F., & Rosa, A. L. (2018). Differences between indigenous yeast populations in spontaneously fermenting musts from *V. vinifera* L.

and *V. labrusca* L. Grapes harvested in the same geographic location. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1320.

Rosini, G. (1984). Assessment of dominance of added yeast in wine fermentation and origin of *Saccharomyces cerevisiae* in wine-making. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 30(4), 249-256.

Raspor, P.; Cus, F.; Povhe Jemec, K.; Zagorc, T.; Cadez, N. & Nemanic, J. (2002). Yeast population dynamics in spontaneous and inoculated alcoholic fermentations of Zametovka must. *Food Technology and Biotechnology*, 40(2), 95-102.

Roudil, L.; Russo, P.; Berbegal, C.; Albertin, W.; Spano, G. & Capozzi, V. (2020). Non-*Saccharomyces* commercial starter cultures: Scientific trends, recent patents and innovation in the wine sector. *Recent patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 11(1), 27-39.

Saerens, S. M.; Delvaux, F. R.; Verstrepen, K. J. & Thevelein, J. M. (2010). Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial biotechnology*, 3(2), 165-177.

Schulze, U.; Lidén, G.; Nielsen, J. & Villadsen, J. (1996). Physiological effects of nitrogen starvation in an anaerobic batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 142(8), 2299-2310.

Sipiczki, M. (2010). Diversity, variability and fast adaptive evolution of the wine yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) genome—a review. *Annals of microbiology*, 61(1), 85-93.

Stevens, S. & Hofmeyr, J. H. S. (1993). Effects of ethanol, octanoic and decanoic acids on fermentation and the passive influx of protons through the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38, 656-663.

Suárez-Lepe, J. A. & Morata, A. (2012). New trends in yeast selection for winemaking. *Trends in Food Science & Technology*, 23(1), 39-50.

Sturm, J.; Grossmann, M. & Schnell, S. (2006). Influence of grape treatment on the wine yeast populations isolated from spontaneous fermentations. *Journal of Applied Microbiology*, 101(6), 1241-1248.

Tesnière, C.; Brice, C. & Blondin, B. (2015). Responses of *Saccharomyces cerevisiae* to nitrogen starvation in wine alcoholic fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(17), 7025-7034.

Torrens, J.; Riu-Aumatell, M.; López-Tamames, E. & Buxaderas, S. (2004). Volatile compounds of red and white wines by headspace-solid-phase microextraction using different fibers. *Journal of Chromatographic Science*, 42(6), 310-316.

Tristezza, M.; Vetrano, C.; Bleve, G.; Grieco, F.; Tufariello, M.; Quarta, A. & Grieco, F. (2012). Autochthonous fermentation starters for the industrial production of Negroamaro wines. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39(1), 81-92.

Tufariello, M.; Maiorano, G.; Rampino, P.; Spano, G.; Grieco, F.; Perrotta, C. & Capozzi, V. (2019). Selection of an autochthonous yeast starter culture for industrial production of Primitivo "Gioia del Colle" PDO/DOC in Apulia (Southern Italy). *LWT*, 99, 188-196.

Ugliano, M. & Henschke, P. A. (2009). Yeasts and wine flavour. In *Wine chemistry and biochemistry* (pp. 313-392). Springer, New York, NY.

Van Dijken, J. P. & Scheffers, W. A. (1986). Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiology reviews*, 1(3-4), 199-224.

Varela, C.; Pizarro, F. & Agosin, E. (2004). Biomass content governs fermentation rate in nitrogen-deficient wine musts. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), 3392-3400.

Villa Monte, I. (2015). Bebidas alcohólicas regionales: caracterización del proceso de elaboración del vino de ciruela de Berisso. Licenciatura en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ciencias Exactas. UNLP.

Yanniotis, S.; Kotseridis, G.; Orfanidou, A. & Petraki, A. (2007). Effect of ethanol, dry extract and glycerol on the viscosity of wine. *Journal of Food Engineering*, 81(2), 399-403.

Zamora, F. (2009). Biochemistry of alcoholic fermentation. In *Wine chemistry and biochemistry* (pp. 3-26). Springer, New York, NY.

Zea, L.; Moreno, J.; Ortega, J. M. & Medina, M. (1995). Content of free terpenic compounds in cells and musts during vinification with three *Saccharomyces cerevisiae* races. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(4), 1110-1114.

Zink, R. T. & Chatterjee, A. K. (1985). Cloning and expression in *Escherichia coli* of pectinase genes of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(3), 714-717.

Zwietering, M. H.; Jongenburger, I.; Rombouts, F. M. & Van't Riet, K. J. A. E. M. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1875-1881.

## **Conclusiones generales**

La uva Isabella tiene un origen natural y una historia de más de 200 años. Podría decirse que es una variedad de vid producto de la inmigración, ya que surgió por un entrecruzamiento de una especie de vid americana (*V. labrusca*) con una especie de *V. vinifera* que había sido llevada a la costa atlántica de Estados Unidos por inmigrantes europeos. Si bien fue descubierta en Carolina del Sur a principios del siglo XIX, el primer registro comercial de Isabella data de 1820 en un vivero de Long Island en Nueva York, lugar donde fue bautizada con su nombre por W. Prince. Nueva York fue el punto de partida para su viaje a otras regiones del mundo. Su itinerario es poco conocido, pero su llegada a Europa fue motivada por cuestiones estéticas, ya que la vid era frondosa, y sus racimos aromáticos con bayas azules a negras resultaban muy atractivos. Con el tiempo comenzó a cultivarse en diferentes regiones del mundo para producir vino y otros productos. Isabella se adaptó muy bien a regiones donde las condiciones de clima y suelo eran adversas para el cultivo de *V. vinifera*, pero esta situación no fue la única razón para la expansión de su cultivo; también influyeron en su elección su gran vigor, resistencia al frío y ciertas plagas, alta fertilidad, facilidad de reproducción y el hecho de no requerir grandes cuidados para su cultivo.

La llegada de Isabella a América Latina a fines del siglo XIX, en particular Argentina y Brasil, se debió a la inmigración de campesinos del norte de Italia (donde Isabella gozaba de cierta popularidad), que instalaron quintas para cultivar la tierra y llevar a la práctica su oficio de viñateros. Isabella se adaptó rápidamente a las condiciones que en el clima y los humedales de la Costa de Berisso. Con el tiempo, el vino se fue identificando con una ciudad fabril que albergó a miles de inmigrantes y que fue protagonista de acontecimientos históricos importantes. Además, Isabella fue y es la única vid cultivada en Berisso, lo que hace al Vino de la Costa un producto muy singular. Luego de su auge entre 1940 y 1960 y su casi extinción en la década de 1990, el vino de la Costa resurgió con fuerza y hoy ha recuperado su identidad con la ciudad y el territorio

El análisis fisicoquímico durante 5 años (2015 - 2019) de la uva Isabella proveniente de un viñedo tipo parral, mostró que la composición promedio de las bayas varió año tras año de manera alternada, es decir, un año de buena maduración seguido de un año de maduración insuficiente. Luego de comparar los datos de composición de la uva con los respectivos índices bioclimáticos de cada campaña, se concluyó que las precipitaciones ocurridas durante el ciclo vegetativo de la vid serían el factor más influyente en la composición de la uva, correspondiendo las uvas de mejor calidad a las temporadas más secas. La calidad de las uvas en el sentido



enológico se refiere al hecho que los vinos elaborados con estas uvas resultaron en una mayor aceptabilidad cuando fueron analizadas por un jurado de cata en la fiesta del Vino de la Costa. Por lo tanto, se concluyó que las uvas con las características fisicoquímicas exhibidas en las temporadas más secas deben ser consideradas como referencia para evaluar la calidad enológica de Isabella en futuras campañas.

Según los resultados de los análisis fisicoquímicos básicos realizados por el INV, los vinos obtenidos en las microvinificaciones con esta variedad de uva (más allá de su calidad sensorial) cumplieron con todos los requisitos de la legislación vigente en relación a los límites máximos establecidos para acidez volátil, índice de color, concentración de cobre y metanol.

La realización de microvinificaciones con uvas provenientes directamente del viñedo permitió determinar cuales son las especies de levaduras vínicas autóctonas que llevan a cabo la fermentación espontánea. *H. uvarum* fue la especie no-*Saccharomyces* dominante en las etapas temprana y media de la fermentación, cuando el nivel de alcohol no sobrepasó el 5-6% (v/v). Sin embargo, en ciertas situaciones específicas predominó *S. bacillaris*. Ambas especies de levaduras difieren en su metabolismo fermentativo, por lo que pueden afectar en forma diferente la composición del vino. *S. bacillaris* es fructofílica y tiene mayor capacidad fermentativa que *H. uvarum*, por lo que produce más alcohol y además se destaca por su alta producción de glicerol.

La fermentación espontánea de Isabella dura entre 6 y 8 días según los Brix del mosto y el crecimiento y actividad fermentativa de *Saccharomyces*. Esta especie no se detectó en la fase de latencia, pero sí entre los 4 y 5 días de fermentación, momento en el que la vinificación consistió en un cultivo mixto de levaduras no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces*. Finalmente, en la etapa final de la fermentación, durante la cual el nivel de alcohol llega al 10-11%, la actividad fermentativa dependió exclusivamente de *Saccharomyces*. La parada de fermentación observada en la campaña v15 se debió precisamente al crecimiento tardío de esta levadura, lo que incidió en la velocidad de acumulación de alcohol. De este modo, algunas especies no-*Saccharomyces*, en particular *S. bacillaris*, prevalecieron en el vino por un tiempo mayor al esperado. La capacidad de *S. bacillaris* para desplazar a *H. uvarum* y así predominar en el momento de la parada de fermentación, podría explicarse por su mayor tolerancia al alcohol. Por otro lado, otras especies no-*Saccharomyces*, como *P. kudriavzevii*, lograron crecer y permanecer viables en presencia de niveles bajo/medio de alcohol junto a *H. uvarum* y

*S. bacillaris*. Finalmente, estas especies no-*Saccharomyces* perdieron viabilidad cuando se reactivó la fermentación y aumentó el nivel de alcohol en el vino.

La mayoría de las cepas identificadas en la etapa final de la fermentación pertenecieron a la especie *S. cerevisiae*; sin embargo, también se identificó (aunque en baja proporción) *S. paradoxus*, principalmente en la campaña v15. La identificación de *S. paradoxus* es un hallazgo que merece resaltarse, ya que no es habitual hallar esta especie en ambientes vínicos. Por lo tanto, la misma debe ser incluida en futuras investigaciones, y evaluar su potencial empleo en la vinificación de Isabella o incluso en otros procesos fermentativos de la región de Berisso, como el fermentado de ciruela o la cerveza.

Todas las especies de *Pichia* aisladas de las microvinificaciones espontáneas fueron capaces de formar velo o biofilms, lo cual podría explicar la aparición de este defecto en el vino envasado en la bodega. Sin embargo, la única especie formadora de velo aislada en vinos de la bodega fue *P. manshurica*, la cual no fue detectada en las microvinificaciones de laboratorio con uvas traídas directamente desde el viñedo. El origen de *P. manshurica* es desconocido, pero podría formar parte de la flora microbiana de la bodega y ser capaz de sobrevivir bajo las condiciones ambientales impuestas por las características fisicoquímicas del Vino de la Costa. Dado que la prevención de este defecto es un objetivo a resolver en la bodega, queda pendiente a futuro realizar ensayos de inhibición de esta levadura a escala de laboratorio y finalmente en la bodega.

Es difícil establecer con certeza que influencia tuvo la fermentación espontánea en la calidad del vino. Si se tiene en cuenta que las especies de levaduras predominantes en las diferentes fases de la fermentación v16 y v17 fueron las mismas, se puede inferir que el factor principal que incidió en la calidad del vino en esas campañas fue la composición de la uva. En v15 la situación fue más compleja, pero la parada de fermentación confirmó que la fermentación espontánea es impredecible, lo que constituye el principal argumento para justificar la fermentación inoculada.

Los ensayos de fermentación para seleccionar cepas de *Saccharomyces* para inocular mostraron una distribución aleatoria en relación a la producción de los principales metabolitos de la fermentación alcohólica como etanol, glicerol, ácido succínico y ácido acético, aunque las cepas de *S. paradoxus* mostraron cierta tendencia a producir más glicerol y ácido succínico. Con respecto a la producción de compuestos volátiles, todas las cepas de *S. cerevisiae* y *S. paradoxus* ensayadas se caracterizaron por la producción mayoritaria de los alcoholes superiores isoamílico y 2

fenil-etanol y sus respectivos ésteres de acetato, y los AGCM octanoico y decanoico y sus respectivos ésteres de etilo. En segundo lugar se ubicaron el etil dodecanoato y el etil-9 decenoato. Solo una cepa de *S. cerevisiae* sobresalió por su alta producción de los ésteres de etilo antes mencionados y 2 fenil-etanol, por lo que debería incluirse en futuros ensayos de fermentación. Es importante señalar que la producción de volátiles es afectada por la composición del mosto y el proceso de vinificación, razón por la cual estos resultados deberían validarse ensayando las mismas cepas en diferentes condiciones de fermentación.

Tal como se mencionó anteriormente, la fermentación espontánea dio lugar a procesos variables y difíciles de predecir. De aquí surgió la necesidad de estudiar la inoculación del vino. La inoculación de mosto con una cepa autóctona de *S. cerevisiae* redujo el tiempo de fermentación a tres días (a la mitad respecto a la fermentación espontánea del mismo mosto) e inhibió el desarrollo de las levaduras no-*Saccharomyces*. No obstante, en el análisis sensorial el jurado de cata detectó en el vino inoculado cierta interferencia en lo que ellos consideraron el flavor natural o normal del Vino de la Costa y una acidez más pronunciada, por lo que en términos globales fue considerado de menor aceptabilidad que el espontáneo. Si bien el análisis sensorial tuvo sus limitaciones, este resultado es relevante, ya que plantea el desafío de encontrar cepas autóctonas que garanticen el éxito de la fermentación sin interferir con el característico aroma varietal que esta uva le transmite al vino.

Cabe finalmente destacar que las cepas aisladas de los viñedos de Berisso en las diferentes campañas constituyen un recurso genético muy valioso disponible para futuras investigaciones y aplicaciones. Dada la gran cantidad de cepas aisladas aún sin estudiar, es necesario realizar en el futuro un screening más exhaustivo de sus propiedades enológicas y un análisis a nivel genético con marcadores moleculares para diferenciar cepas. Finalmente, la cepa seleccionada deberá ser evaluada en condiciones reales de vinificación, donde competirá también con la flora microbiana instalada en la bodega. En la selección de cepas será necesario considerar además el impacto de los compuestos volátiles que se producen en la fermentación, ya que aquellas cepas capaces de producir altas concentraciones de ésteres podrían contribuir de manera positiva en el ajuste fino del flavor del Vino de la Costa.

Finalmente, es importante destacar que a diferencia de otras regiones donde se cultiva Isabella (como en Colonia Caroya y Brasil), en Berisso los intentos de implantar variedades de *V. vinifera* no han tenido éxito hasta el momento. Por lo tanto, no solo por tradición sino también por cuestiones agronómicas, la uva Isabella seguirá siendo

en Berisso la variedad de vid empleada para vinificar. Los resultados de la presente tesis podrían ser un punto de partida para futuras innovaciones e investigaciones en el cultivo de esta vid y en la elaboración del Vino de la Costa, que permitan sostener la actividad vitivinícola de Berisso en el tiempo. Algunas sugerencias podrían ser la adecuación de las prácticas culturales de los viñedos al clima cambiante en cada temporada para disminuir la variabilidad de la calidad de la materia, un análisis más amplio de la composición fisicoquímica de la uva Isabella y su relación con el clima, y una mejora del proceso de vinificación mediante el empleo de inóculos seleccionados.

# **Anexos**

## **I. Cromatografía de productos de fermentación por HPLC.**

Se analizaron productos de la fermentación y azúcares mediante HPLC. Se tomó como referencia el trabajo de Falqué y Fernández (1996), donde se analizaron muestras de vino blanco y mosto. Para vino tinto se utilizó PVPP para disminuir los compuestos fenólicos, entre ellos los pigmentos.

## **II. Sistema de HPLC.**

Se utilizó un sistema cromatográfico HPLC (Water Associates) equipado con una bomba binaria (Waters 1525), un inyector automático (Waters 717, 10 µl), una columna Aminex HPX-87H (9 µm, 300 x 7,8, Bio-Rad Labs, USA) con su correspondiente precolumna conectada en serie. La columna se operó a una temperatura de 50°C y las muestras se eluyeron con 0,65mM de ácido sulfúrico, a un caudal de 0,6 ml/min. Los compuestos fueron detectados con un detector de arreglo de fotodiodos (Waters 1996) a 210 nm y conectado en serie con un detector de índice de refracción (RID). Para la integración de los picos se empleó el programa EMPOWER.

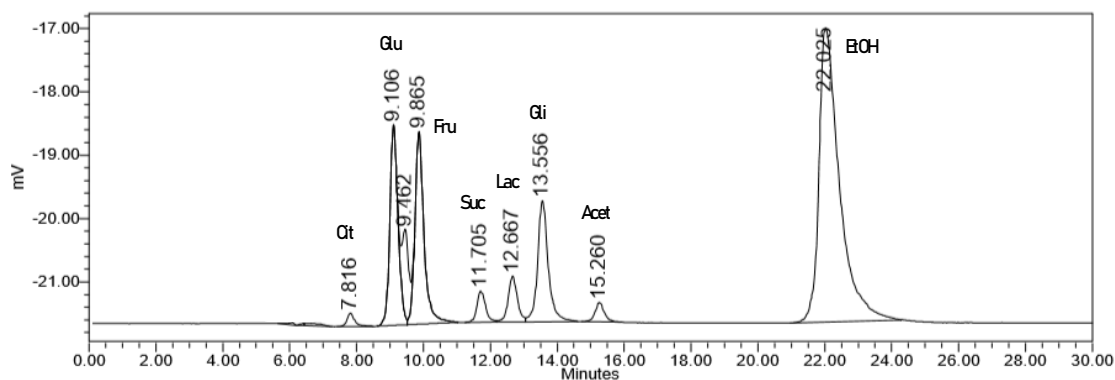
## **III. Soluciones estándar.**

Se prepararon las soluciones patrones con agua deionizada a partir de las cuales se realizaron las correspondientes diluciones. Los compuestos analizados y los rangos de concentración ensayados fueron los siguientes: ácido cítrico (Carlo Erba) 0,1-0,5 g/l; glucosa (Cicarelli) 0,7-11,0 g/l; fructosa (Biopack) 0,7-11,0 g/l, DL-málico (Sigma-Aldrich) 1,0-4,0 g/l, ácido tartárico (Sigma-Aldrich) 3,0 g/l, glicerol (Anedra, Research AG) 0,25-10,0 g/l, ácido succínico (Sigma-Aldrich) 0,06-2,0 g/l, lactato de calcio (Merck) 0,5-3,0 g/l, ácido acético glacial (BDH) 0,1-2,0 g/l, etanol absoluto (PANCREAC Química) 0,075-13 % v/v. Las muestras se filtraron por filtros estériles de acetato de celulosa de 0,45 µm. Para la corrida los compuestos se analizaron individualmente o en grupo.

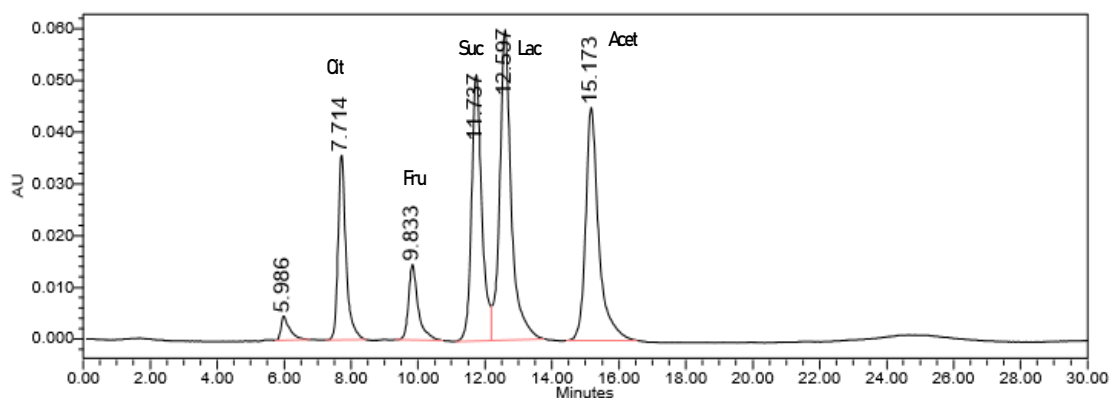
## **IV. Cromatogramas de los patrones.**

En las Figuras I y II se muestran los cromatogramas de una mezcla de todos los patrones en su máxima concentración, ensayada en modo RID y UV a 210 nm. Los cromatogramas muestran una excelente separación de los ácidos orgánicos, glicerol y

etanol en el análisis por RID, y de ácidos orgánicos en el caso del UV. El problema se planteó con la determinación de los azúcares, ya que el málico no se separa totalmente de la fructosa y glucosa. En este caso, es posible cuantificar la fructosa y glucosa si se encuentran al menos 5 veces más concentradas que el málico, es decir 15-20 g/l, y la muestra se diluye. Los tiempos de retención de los ácidos orgánicos son similares a los reportados por Bell y col (1991), que emplearon condiciones de separación parecidas. Por el contrario, en el trabajo de Falqué y Fernández (1996) con el mismo caudal de elución, los tiempos de retención son el doble, pero en ese caso se emplearon dos columnas Aminex HPX-87H. En ese trabajo los picos de succínico y láctico se encuentran invertidos, por lo que se asume que hay un error en asignar los picos del cromatograma. En el UV solo se detectan los picos de fructosa y los ácidos orgánicos, ya que absorben a 210-214 nm, no así el glicerol, etanol y glucosa. En este cromatograma la muestra no contenía málico. Las curvas de calibración para todos los compuestos ensayados mostraron un excelente ajuste lineal en el rango ensayado ( $R^2 > 99\%$ ).



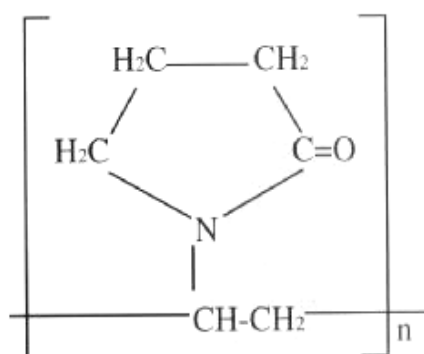
**Figura I.** Cromatograma de patrones con la integración de las áreas, detector índice de refracción. Los números indican los tiempos de retención. Ci: cítrico (0,5 g/l), Glu: glucosa (9 g/l), Fru: fructosa (9 g/l), Suc: succínico (2,0 g/l), Lac: ácido láctico (3,8 g/l), Gli: glicerol 8,0 g/l, Acet: acético (2,1 g/l), EtOH: etanol (10% v/v). El pico que eluye a los 9,46 min (entre glucosa y fructosa) corresponde al ácido málico (3 g/l).



**Figura II.** Cromatograma de patrones con la integración de las áreas, detector arreglo de diodos UV 210 nm. Los números indican los tiempos de retención. Ci: cítrico (0,5 g/l), Fru: fructosa (9 g/l), Suc: succínico (2,0 g/l), Lac: ácido láctico (3,8 g/l), Acet: acético (2,1 g/l). Los tiempos de retención son inferiores a los observados con RI, ya que los detectores están conectados en serie. El patrón para este cromatograma se preparó sin málico.

## V. Tratamiento con polivinilpirrolidona (PVPP).

En el trabajo de Falqué y Fernández (1996) las muestras de mosto y vino blanco no recibieron tratamiento alguno y solo se filtraron por membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  para retener partículas. En este trabajo, y teniendo en cuenta que las muestras a analizar provenían de uvas tintas, se decidió tratarlas con PVPP, que es un polímero insoluble derivado de la pirrolidona con una alta afinidad por los polifenoles (Figura III).



**Figura III.** PVPP.

<http://www.stdpovidone.com/nvp-crosslinked-polymer/insoluble-polyvinylpyrrolidone-pvpp-25249-54.html>



El PVPP es un clarificante empleado con diversos fines en enología, entre ellos la eliminación de taninos astringentes y amargos, sabores vegetales, proteínas desnaturalizadas, etc. Las concentraciones típicas oscilan entre 0,3 y 0,6 g/l (Sims et al, 1995). El mecanismo de adsorción de los polifenoles al PVPP se basa en la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos fenólicos y el oxígeno del grupo amida del anillo pirrolidona del PVPP (Laborde et al, 2006). Al centrifugar la muestra se elimina el PVPP y los compuestos adsorbidos. La hipótesis fue que el tratamiento con PVPP permitiría una mejor visualización de los picos y al mismo tiempo disminuiría la carga de contaminantes de la columna. Para poner a punto la técnica se realizaron ensayos siguiendo el siguiente protocolo: en un tubo eppendorf de 2 ml se colocaron 20 mg de PVPP y 2 ml de la solución a tratar. La mezcla se agitó en un agitador rotatorio a temperatura ambiente entre 15 y 30 min, y luego se centrifugó a 10000g x 5min. El sobrenadante corresponde al obtenido en una etapa de adsorción. Para aumentar el número de etapas de decoloración se repitió el tratamiento con el sobrenadante.

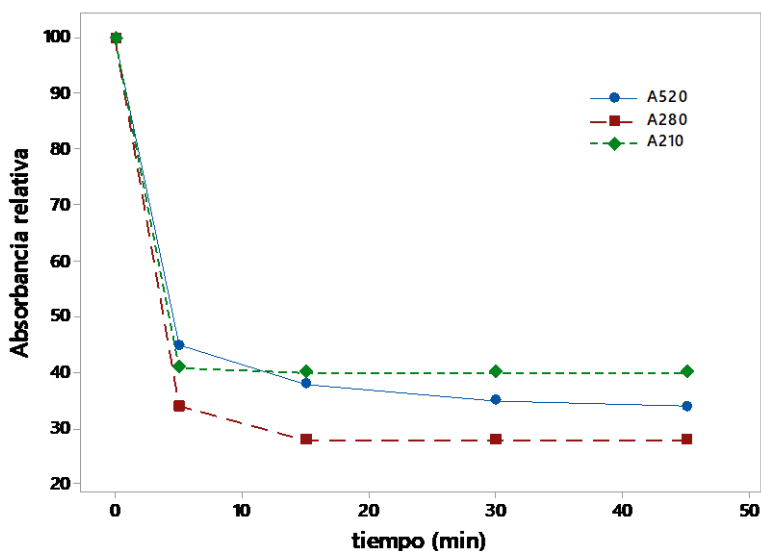
## **VI. Ensayo preliminar de adsorción de los patrones.**

Los primeros ensayos se efectuaron con los patrones disueltos en agua, debido a la presencia de ácidos orgánicos en el patrón; el pH de la mezcla fue de 4-5. Se realizaron dos etapas de adsorción de una hora cada una con la solución patrón, y se compararon los cromatogramas del patrón con y sin tratamiento. Ambos cromatogramas resultaron iguales, con diferencias en las áreas (duplicados o triplicados) de 3,6 % en promedio, observándose que las muestras tratadas con PVPP tienden a dar áreas menores. Este resultado indicó que los ácidos orgánicos, azúcares, glicerol y etanol no son significativamente adsorbidos por el polímero.

## **VII. Cinética de adsorción de pigmentos y compuestos fenólicos.**

Para evaluar el empleo de PVPP en los mostos y vinos se estudió el tiempo de contacto y el número de etapas en la adsorción con una muestra de mosto Isabella. La muestra se trató durante un tiempo total de 60 min a temperatura ambiente. A intervalos de tiempo determinados, se detuvo el agitador, se retiró el eppendorf y se centrifugó 10 segundos en una centrifuga de mesa (LABNET international Inc. Korea); luego de tomar una muestra, se resuspendió el pellet y se continuó con la agitación. El

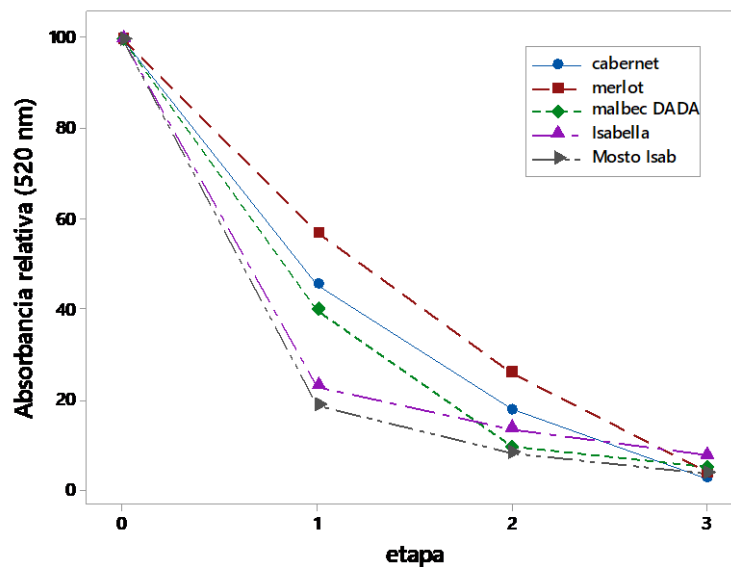
sobrenadante se diluyó en HCl 1.0N para la medición espectrofotométrica en el visible y UV. Los valores de A520 nm muestran que la adsorción fue rápida, los pigmentos asociados principalmente a los antocianos disminuyeron a un 45 % de su valor inicial luego de 5 min de tratamiento y se estabilizan en un valor residual de 34 %. Los compuestos que absorben en el UV, que incluye también a los antocianos (Giusti and Wrolstad, 2001), siguieron una cinética similar (Figura IV)



**Figura IV.** Cinética de adsorción con PVPP. Muestra: mosto de uva Isabella v18. Las absorbancias iniciales fueron 17, 133 y 505 para 520, 280 y 210 respectivamente. Las muestras de mosto se tomaron a diferentes tiempos, se diluyeron con HCl 1,0 N; 1:35 para visible y 1:400 para UV.

### VIII. Efecto del número de etapas de adsorción.

Se realizó un ensayo para determinar la adsorción en función del número de etapas de tratamiento con PVPP. Para el ensayo se utilizaron muestras de mosto Isabella v18 y muestras vinos Isabella y vinos comerciales de *V. vinifera*: variedad Merlot y Cabernet (familia Martinez Croce) y Malbec (DADA). El tiempo de contacto en cada etapa fue de 30 min para asegurar que la adsorción alcanzara el equilibrio. En la Figura V se presentan los resultados.

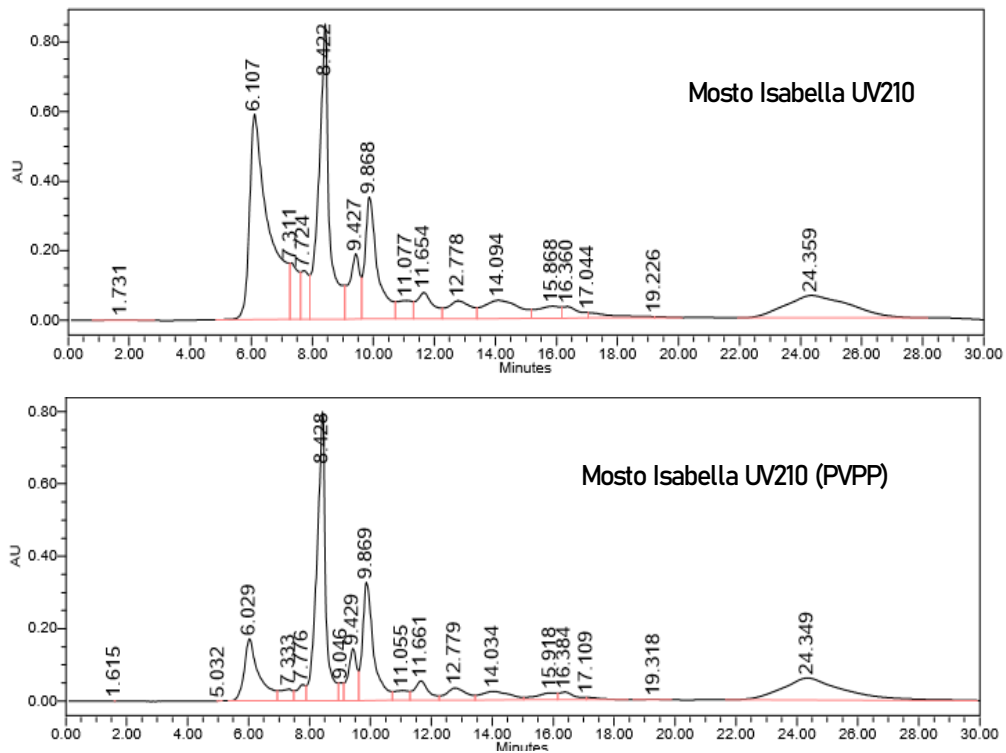


**Figura V.** Efecto del número de etapas en la adsorción con PVPP. Muestras: mosto de uva Isabella v18, vinos Isabella, Cabernet, Merlot y Malbec. En cada etapa la muestra se incubó una hora con agitación a temperatura ambiente con 20 mg PVPP. Para la medida de A520 los sobrenadantes se diluyeron con HCl 1,0 N.

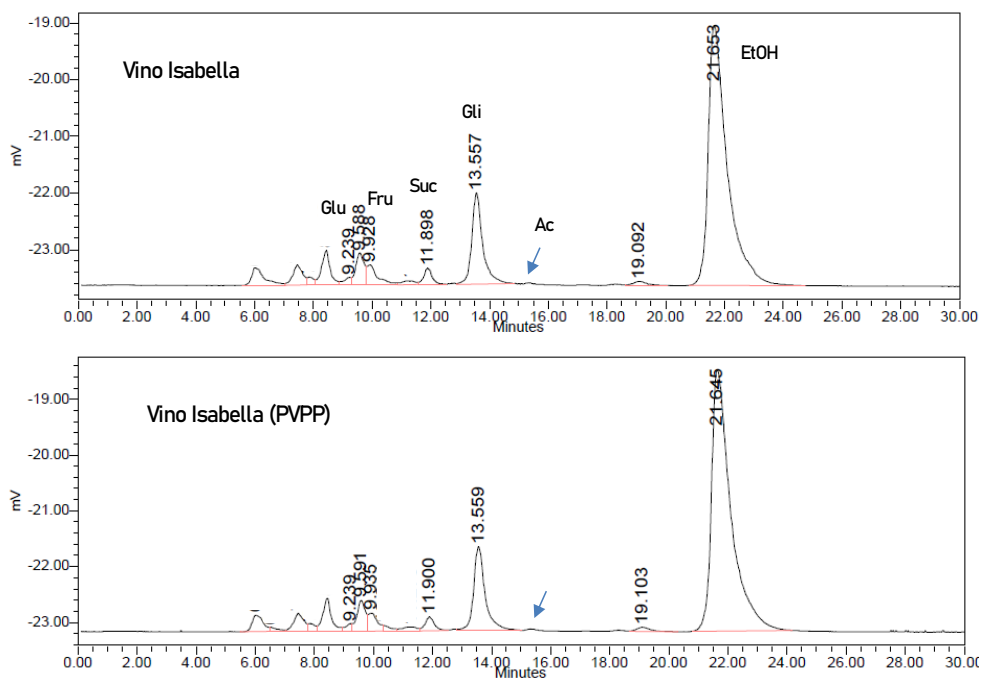
Se observó que la adsorción fue más eficiente con mosto o vino de Isabella, ya que con una sola etapa la adsorción se adsorbió cerca del 80 %. En las muestras de *V. vinifera* se requirieron al menos dos etapas para una adsorción equivalente, con excepción de la muestra de Merlot. Con tres etapas, las muestras tendieron a reducir en un 90% el contenido de pigmentos. Las medidas en el UV siguieron un patrón similar. Luego de dos etapas de adsorción la disminución relativa de la absorbancia a 280 nm fue: Malbec 82%, Cabernet 84%, Merlot 66 %, Isabella 84 % y mosto Isabella 72 %.

#### IX. Cromatogramas de muestras con y sin tratamiento con PVPP.

En las Figuras VI y VII se comparan cromatogramas con detector UV y RID de una muestra de vino Isabella sin y con tratamiento PVPP (3 etapas). Se observó un cromatograma más limpio en la muestra tratada con PVPP, en particular en los primeros tiempos de retención.



**Figura VI.** Cromatogramas (UV210) para muestra de vino Isabella sin y con tratamiento PVPP (3 etapas).



**Figura VII.** Cromatogramas para muestra de vino Isabella sin y con tratamiento PVPP (3 etapas).

## **X. Comparación de resultados HPLC con análisis fisicoquímicos del INV.**

En la Tabla I se presentan datos de productos de fermentación, comparándose valores del INV con los obtenidos por HPLC para etanol, glicerol y acético con detector RID, y por otra parte datos comparativos de láctico, succínico y acético empleando RID y UV. Para glicerol, acético y láctico una prueba t pareada no mostró diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ) entre las dos mediciones (HPLC, INV); en cambio, sí las hubo para etanol. Los datos de succínico en el UV fueron inconsistentes en las muestras de vinos de *V. vinifera*. El dato más llamativo fue la diferencia entre la acidez volátil y los datos de acético en los vinos de Isabella, lo cual no se observó en los vinos de *V. vinifera*. Este resultado amerita ser confirmado, ya que el principal compuesto que aporta a la acidez volátil de un vino es el ácido acético, lo que no ocurrió en estos vinos.

**Tabla I.** Datos del HPLC y del INV para diferentes vinos de Isabella y de *V. vinifera*.

Muestra de vinos	Glicerol (g/l)		Etanol (%)		Acidez volátil* INV	Acético HPLC (g/l)		Láctico HPLC (g/l)		Succínico HPLC (g/l)	
	HPLC	INV	HPLC	INV		RID	UV	RID	UV	RID	UV
<b>IsA</b>	6,9	6,9	9,2	9,7	0,58	0,2	0,2			1,24	1,37
<b>IsB</b>	6,3	6,4	9,7	9,7	0,55	0,15	0,19			1,24	1,42
<b>IsC</b>	6,8	7,4	9,25	9,4	0,55	0,15	0,2			1,2	1,42
<b>IsD</b>	6,6	6,6	9,65	9,6	0,49	0,12	0,12	-		1,2	1,73
<b>IsE</b>	6,25	7,1	9,4	9,4	0,52	0,15	0,15	-		1,2	1,69
<b>MER</b>	4,5	6,5	11,9	12	0,74	0,96	0,73	7,1	7,1	1,3	3,92
<b>CAB</b>	10,5	9,9	11,95	12	0,52	0,43	0,39	3,3	3,4	1,3	9,7
<b>MAL</b>	10,7	10,6	12	12	0,65	0,59	0,49	3,45	3,8	1,25	9,45

\*expresada en acético (g/l). MER: Merlot; CAB: Cabernet; MAL: Malbec

## XI. Límites analíticos del método.

En la Tabla II se presentan algunos datos del método de HPLC con patrones tratados con PVPP (una sola etapa). Para el análisis de los datos se tomó como referencia la guía de MacDougall & Crummett (2006).

**Tabla II.** Calibración de patrones para HPLC tratados con PVPP (detector RID).

Compuesto	tr (m)	m	s	Rango (g/l)	LOD	LOQ
<b>Cítrico</b>						
<b>Glucosa</b>	9,55	217178	38200	0,6-12	0,87	2,17
<b>Fructosa</b>	10,3	249442	44415	0,6-12	0,87	2,17
<b>Succínico</b>	12,6	160800	7265	0,15-3,0	0,19	0,47
<b>Láctico</b>	13,4					
<b>Glicerol</b>	13,9	176930	1768	0,5-10	0,041	0,1
<b>Acético</b>	15,9	102543	1738	0,15-3,0	0,19	0,47
<b>Etanol</b>	22,1	704614	75261	0,6-13	0,44	1,1

Detector RID. tr: tiempo de retención; m: pendiente; s: error estándar de la estimación, LOD: límite de detección; LOQ: límite de cuantificación.

## XII. Resultados de las fermentaciones espontáneas v15, v16, v17.

En las tablas III, IV y V se detallan los resultados de los análisis fisicoquímicos y microbiológicos de las distintas réplicas de las fermentaciones espontáneas v15, v16 y v17 respectivamente. En la figura VIII se muestra la evolución de la población microbiana en dichas fermentaciones.

**Tabla III.** Fermentación de Isabella v15.

Días de fermentación	Réplica	Alcohol (% v/v)	°Brix	Azúcar residual (g/l)	F/G	Glicerol (g/l)	Recuento viable (UFC/ml)	% <i>Saccharomyces</i>
2 días	VR1	<0,4	17				3,50E+06	nd
	VR2	<0,4	16,5				6,80E+06	nd
	VR3	<0,4	17				3,10E+06	nd
5 días (tumultuosa)	VR1	4,3	12	77	0,74	5,7	2,1 5E+07	nd
	VR2	4,8	12,8	71,5	0,61	5,9	2,19E+07	nd
	VR3	4,5	12,4	82	0,64	5,8	4,0 E+07	nd
8 días (descube)	VR1	5,6	8	37	0,68	6,7	2,40E+06	2,08
	VR2	6	8	36,6	0,63		6,40E+06	1,5
	VR3	4,6	9	40	0,54	6,2	9,20E+06	nd
15 días (1° trasiego)	VR1	8,9	5,5			7,49	4,20E+05	75
	VR2	9	5,5	< LQ		7,9	6,10E+03	100
	VR3	8,9	5,5			6,5	1,06E+05	100

Datos iniciales mosto (promedio tres réplicas): Brix:17,3 (azúcar 159 g/l), pH 2,99, AT: 0,8 %; YAN 204 mg/l. Azúcar: suma de fructosa y glucosa; F/G relación fructosa/glucosa, LQ límite de cuantificación. Azúcar y alcohol determinados por HPLC. Nd: no detectado en la dilución menor



**Tabla IV.** Fermentación de Isabella v16.

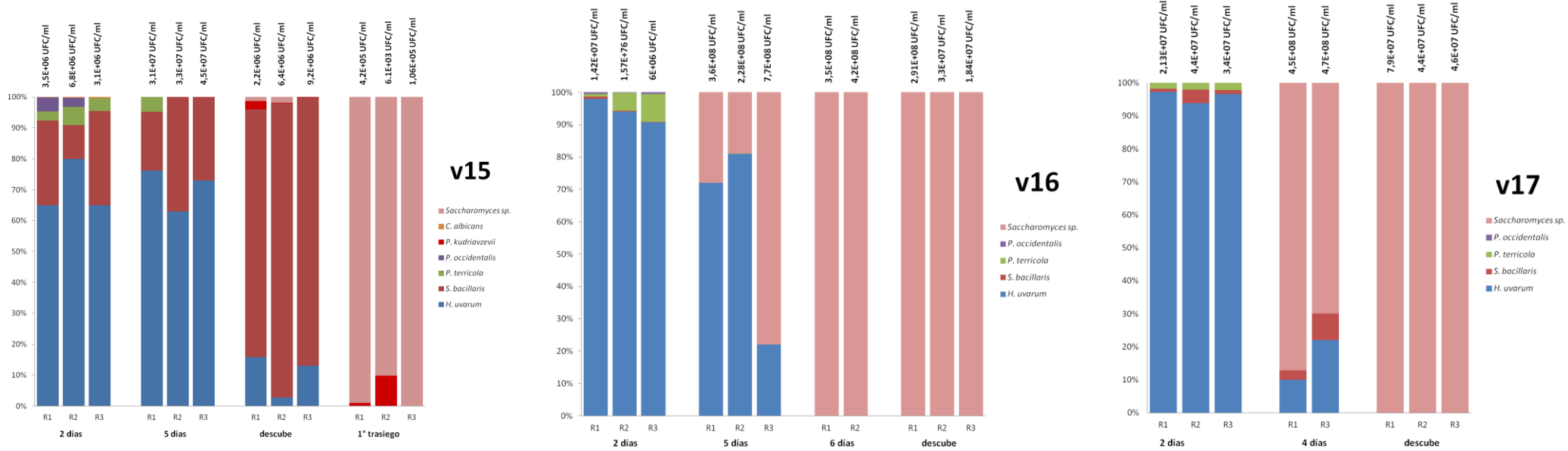
Días de fermentación	Réplica	Alcohol (% v/v)	°Brix	Azúcar residual (g/l)	F/G	Glicerol (g/l)	Recuento viable (UFC/ml)	% <i>Saccharomyces</i>
2 días	VR1	<0,5	19,5				1,48E+07	nd
	VR2	<0,5	19,8				1,68E+07	nd
	VR3	<0,5	19,5				6,00E+06	nd
5 días (tumultuosa)	VR1	4,1	15	114	0,915	4,7	3,60E+08	26,6
	VR2	3,8	15	117	0,9	4,3	2,28E+08	19
	VR3	6,5	11,5	90	0,875	5,5	7,70E+08	76,5
6 días	VR1		11				3,50E+08	100
	VR2		12				4,20E+08	
	VR3		9					
8 días (descube)	VR1	10,9	5,5			7,3	2,91E+07	100
	VR2	11,1	5,5	< LQ		7,4	3,30E+07	
	VR3	10,9	6			6,9	1,84E+07	

Datos iniciales mosto (promedio tres réplicas). Brix: 20,3 (azúcar 195 g/l), pH: 3,12; AT: 0,66 % ; YAN: 149 mg/l. Azúcar: suma de fructosa y glucosa; F/G: relación fructosa/glucosa, LQ: límite de cuantificación. Azúcar y alcohol determinados por HPLC. Nd: no detectado en la dilución menor.

**Tabla V.** Fermentación de Isabella v17.

Días de fermentación	Réplica	Alcohol (% v/v)	°Brix	Azúcar residual (g/l)	F/G	Glicerol (g/l)	Recuento viable (UFC/ml)	% <i>Saccharomyces</i>
2 días	VR1	0,55	17,4	148	1,03	0,8	2,25E+07	< 0,01
	VR2	0,56	17,5	152	1,05	0,85	3,96E+07	< 0,01
	VR3	0,79	17,4	150	1,03	1,1	3,20E+07	< 0,01
4 días (tumultuosa)	VR1	6,9	11	43 (57)	1	5,3	4,50E+108	84
	VR2		11					
	VR3	6,8	10,9	68	1,03	5,2	4,40E+108	70
6 días (descube)	VR1	9,1	5,5			6,1	7,40E+07	
	VR2	9,6	5,5	< LQ		5,8	4,40E+07	> 99 %
	VR3	9,5	6				4,70E+07	

Datos iniciales mosto (promedio tres réplicas). Brix: 17,4 (azúcar 163 g/l) ; pH: 3,32; AT: 0,74 %; YAN: 207 mg/l. Azúcar: suma de fructosa y glucosa; F/G: relación fructosa/glucosa, LQ: limite de cuantificación. Azúcar, glicerol y alcohol determinados por HPLC



**Figura VIII.** Evolución de las distintas especies de levaduras en los mostos de fermentación espontánea de los años 2015, 2016 y 2017. Los recuentos de levaduras totales de cada etapa y de cada réplica se indican encima de la barra correspondiente.

### **XIII. Referencias.**

Bell, D. J., Blake, J. D., Prazak, M., Rowell, D., & Wilson, P. N. (1991). Studies on yeast differentiation using organic acid metabolites Part 1. development of methodology using high performance liquid chromatography. *Journal of the Institute of Brewing*, 97(4), 297-305.

Giusti, M., Wrolstad, R. E (2001) Characterization and measurement of anthocyanins by UV-Visible spectroscopy, *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, F1.2.1

Laborde, B., Moine-Ledoux, V., Richard, T., Saucier, C., Dubourdieu, D., & Monti, J. P. (2006). PVPP–polyphenol complexes: a molecular approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(12), 4383-4389.

López, E. F., & Gómez, E. F. (1996). Simultaneous determination of the major organic acids, sugars, glycerol, and ethanol by HPLC in grape musts and white wines. *Journal of Chromatographic Science*, 34(5), 254-257.

MacDougall, D., & Crummett, W. B. (1980). Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. *Analytical Chemistry*, 52(14), 2242-2249.

Sims, C. A., Eastridge, J. S., & Bates, R. P. (1995). Changes in phenols, color, and sensory characteristics of muscadine wines by pre-and post-fermentation additions of PVPP, casein, and gelatin. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46(2), 155-158.