

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL

GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Coinoculación de levaduras No Saccharomyces y Saccharomyces en vinos de las variedades Merlot, Garnacha y Cabernet Sauvignon. Efecto sobre la composición polifenólica.

CURSO 2018/2019

VALENCIA, JUNIO 2019

Alumno: David Blasco Sanchis

Tutora: Victoria Lizama Abad

Valencia, junio 2019

Alumno: David Blasco Sanchis

Tutora: Prof. Dña. Victoria Lizama Abad

Resumen

En este trabajo se analiza el comportamiento de 4 cepas de levaduras seleccionadas sobre la composición polifenólica de vinos elaborados a partir de las variedades de uva Merlot, Garnacha y Cabernet Sauvignon. Se ha analizado el comportamiento de la cepa *Saccharomyces* 22H a modo de control, y al mismo tiempo el comportamiento derivado de la coinoculación de *Saccharomyces* 22H y las *No Saccharomyces* 49C (*Hanseniaspora uvarum*), 58E (*Torulaspota delbrueckii*) y 42D (*Hanseniaspora uvarum*), respectivamente. Las cepas de levaduras empleadas son cepas indígenas pertenecientes a los géneros *Saccharomyces cerevisiae* y *No Saccharomyces cerevisiae*. Las uvas fueron vendimiadas en su momento óptimo, y se vinificaron, realizando la fermentación con las levaduras seleccionadas. Cuando los vinos terminaron de fermentar, tres meses embotellados, se realizó la analítica de los parámetros generales, los relacionados con el color y los relacionados con la astringencia. Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis estadístico ANOVA para valorar cual es la cepa de levadura que mejor mantiene las características polifenólicas de los vinos.

Palabras clave: cepa de levadura, Merlot, Garnacha, Cabernet Sauvignon, *Saccharomyces*, *No Saccharomyces*, características polifenólicas, astringencia, color.

Resum

En aquest treball s'analitza el comportament de 4 ceps de llevat seleccionades sobre la composició polifenòlica de vins elaborats a partir de les varietats de raïm Merlot, Garnacha i Cabernet Sauvignon. S'ha analitzat el comportament del cep *Saccharomyces* 22H a manera de control, i al mateix temps el comportament derivat de la coinoculació de *Saccharomyces* 22H i les *No Saccharomyces* 49C (*Hanseniaspora uvarum*), 58E (*Torulaspota delbrueckii*) i 42D (*Hanseniaspora uvarum*), respectivament. Els ceps de llevat utilitzats són ceps indígenes pertanyents als gèneres *Saccharomyces cerevisiae* i *No Saccharomyces cerevisiae*. El raïm va ser vendimiada en el seu moment òptim, i es va vinificar, realitzant la fermentació amb els llevats seleccionats. Quan els vins van acabar de fermentar, després de tres mesos embotellats, es va realitzar l'analítica dels paràmetres generals, els relacionats amb el color i els relacionats amb l'astringència. Els resultats obtinguts es van sotmetre a una anàlisi estadístic ANOVA per a valorar quin és el cep de llevat que millor manté les característiques polifenòliques dels vins.

Paraules clau: cep de llevat, Merlot, Garnacha, Cabernet Sauvignon, *Saccharomyces*, *No Saccharomyces*, característiques polifenòliques, astringència, color.

Abstract

In this study it is analysed the behavior of 4 strains of yeast in the polyphenolic composition of wines made from the Merlot, Garnacha and Cabernet Sauvignon grape varieties. The behavior of the *Saccharomyces* 22H strain was analyzed as a control, and at the same time the behavior of the co-inoculation of *Saccharomyces* 22H and the *No Saccharomyces* 49C (*Hanseniaspora uvarum*), 58E (*Torulaspota delbrueckii*) and 42D (*Hanseniaspora uvarum*), respectively. The strains of yeast that were used are indigenous strains belonging to the genera *Saccharomyces cerevisiae* and *No Saccharomyces cerevisiae*. The grapes were harvested at their optimum moment, and they were vinified, carrying out the fermentation with the selected yeasts. When the wines finished fermenting, three months bottled, the analytical of the general parameters, those related to color and those related to astringency were performed. The results were included in an ANOVA statistical analysis to assess which is the yeast strain that maintains the best polyphenolic characteristics of the wines.

Key words: Yeast strains, Merlot, Garnacha, Cabernet Sauvignon, *Saccharomyces*, *No Saccharomyces*, polyphenolic characteristics , astringency, colour.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. EL CULTIVO DE LA VID.....	1
1.2. DIFERENCIA ENTRE LEVADURAS INDÍGENAS Y COMERCIALES.....	1
1.3. LEVADURA <i>SACCHAROMYCES</i>	2
1.4. LEVADURA <i>NO SACCHAROMYCES</i>	2
1.5. COMPOSICIÓN POLIFENÓLICA.....	4
1.5.1. Clasificación de los compuestos polifenólicos.....	4
1.5.1.1. Antocianos.....	4
1.5.1.2. Taninos.....	5
1.5.2. Reacciones de interacción entre compuestos fenólicos.....	5
1.5.2.1. Condensación Tanino – Antociano.....	5
1.5.2.2. Polimerización por medio de la unión con acetaldehído.....	5
2. OBJETIVOS.....	6
3. PLAN DE TRABAJO.....	6
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
4.1. VARIEDADES DE UVA.....	7
4.1.1. Merlot.....	7
4.1.2. Garnacha.....	8
4.1.3. Cabernet Sauvignon.....	8
4.2. PROCESO DE ELABORACIÓN.....	9
4.3. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	10
4.3.1. Parámetros generales.....	10
4.3.2. Determinación de compuestos polifenólicos.....	10
4.3.2.1. Compuestos coloreados.....	10
4.3.2.2. Compuestos astringentes.....	11
4.4. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.....	12
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
5.1. EVOLUCIÓN DE LOS MOSTOS DURANTE EL SEGUIMIENTO DE LAS MICROVINIFICACIONES.....	13
5.2. EFECTO DE LA CEPA DE LEVADURA 22H Y DE LAS COINOCULACIONES 49C-22H, 42D- 22H Y 58E-22H EN LOS PARÁMETROS CONVENCIONALES Y POLIFENÓLICOS DE LOS VINOS ELABORADOS CON LA VARIEDAD MERLOT.....	15
5.3. EFECTO DE LA CEPA DE LEVADURA 22H Y DE LAS COINOCULACIONES 49C-22H, 42D- 22H Y 58E-22H EN LOS PARÁMETROS CONVENCIONALES Y POLIFENÓLICOS DE LOS VINOS ELABORADOS CON LA VARIEDAD GARNACHA.....	18
5.4. EFECTO DE LA CEPA DE LEVADURA 22H Y DE LAS COINOCULACIONES 49C-22H, 42D- 22H Y 58E-22H EN LOS PARÁMETROS CONVENCIONALES Y POLIFENÓLICOS DE LOS VINOS ELABORADOS CON LA VARIEDAD CABERNET SAUVIGNON.....	20
6. CONCLUSIONES.....	21
7. BIBLIOGRAFÍA.....	22

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Diagrama del proceso de elaboración.....	9
Figura 2. Evolución de la densidad en las vinificaciones realizadas con la combinación 42D-22H con relación a las realizadas con la cepa 22H.....	13
Figura 3. Evolución de la densidad en las vinificaciones realizadas con la combinación 58E-22H con relación a las realizadas con la cepa 22H.....	14
Figura 4. Evolución de la densidad en las vinificaciones realizadas con la combinación 49C-22H con relación a las realizadas con la cepa 22H.....	14
Figura 5. Evolución del poder fermentativo de la cepa <i>Saccharomyces</i> 22H.....	15
Tabla 1. Medias, desviación estándar y ANOVA de los parámetros convencionales de los vinos Merlot elaborados con las cepas de levadura seleccionadas.....	16
Tabla 2. Medias, desviación estándar y ANOVA de los parámetros polifenólicos de los vinos Merlot elaborados con las cepas de levadura seleccionadas.....	17
Tabla 3. Medias, desviación estándar y ANOVA de los parámetros convencionales de los vinos Garnacha elaborados con las cepas de levadura seleccionadas.....	18
Tabla 4. Medias, desviación estándar y ANOVA de los parámetros polifenólicos de los vinos Garnacha elaborados con las cepas de levadura seleccionadas.....	19
Tabla 5. Medias, desviación estándar y ANOVA de los parámetros convencionales de los vinos Cabernet Sauvignon elaborados con las cepas de levadura seleccionadas.....	20
Tabla 6. Medias, desviación estándar y ANOVA de los parámetros polifenólicos de los vinos Cabernet Sauvignon elaborados con las cepas de levadura seleccionadas.....	21

1. INTRODUCCIÓN

El vino se puede definir como una bebida alcohólica obtenida gracias a la fermentación alcohólica, completa o parcial, de la uva o su mosto. Es un producto que varía dependiendo de la uva, los agentes de la fermentación y del proceso tecnológico de elaboración.

Actualmente son muchos los vinos que han adquirido importancia en el mercado y esto se debe a la mejora de la calidad de la uva y al riguroso control de las distintas etapas de la elaboración. El amplio y exigente mercado que se puede encontrar hoy en día es uno de los principales factores que ha provocado que se esté investigando más para seguir mejorar la calidad de los vinos.

1.1. EL CULTIVO DE LA VID

Posiblemente el vino sea la bebida alcohólica más antigua conocida. Se ha encontrado viñedos con 7000 años de antigüedad en la región del Cáucaso. En el Egipto antiguo la calidad del vino ya era muy importante, ya que se han encontrado vasijas de vino donde se observa inscrito el nombre del productor, viñedo y el año de la producción (Johnson, 2005).

El vino forma parte de la cultura alimentaria de la Europa mediterránea, desde donde se ha difundido su consumo hacia otras muchas regiones del mundo (Unwin, 2001). España ocupa una posición muy relevante en lo que respecta a la economía internacional del vino, ya que se trata del país con mayor superficie de viñedo (1032 millones de hectáreas) y tercer productor mundial de vino (33.4 millones de hectolitros). Además, se considera a España como el segundo exportador a nivel mundial, ya que se vende más vino del que se consume nacionalmente (Castillo y Compés, 2014).

El consumo de vino en nuestro país, desde años atrás hasta 2006, se redujo en el hogar familiar debido a los cambios alimentarios de la sociedad, pero aún se seguían consumiendo vinos de mayor calidad en restauración. Sin embargo, desde 2006 hasta 2011, la crisis económica provocó un descenso del consumo en restauración (Del Rey, 2011).

La caída del consumo de vino en nuestro país ha afectado de forma diferente según la época, años atrás y hasta 2006 se redujo el consumo en el hogar debido a los cambios de hábitos alimentarios, pero se seguían consumiendo vinos de elevada calidad. Sin embargo, desde ese momento hasta 2011 descendió el consumo en restauración, cuya causa principal era la crisis económica (Del Rey, 2011).

1.2. DIFERENCIA ENTRE LEVADURAS INDÍGENAS Y COMERCIALES

Para entender la fermentación del mosto, hemos de verlo como un proceso bioquímico complejo, en la cual intervienen levaduras, bacterias y otros microorganismos. Para la conversión del mosto en vino, se tiene que llevar a cabo la fermentación alcohólica, cuyos responsables son las levaduras (Torija, 2002).

Se pueden utilizar dos tipos de levaduras para llevar a cabo la vinificación, las levaduras autóctonas (procedentes de la uva o material de la bodega) o las levaduras comerciales (levaduras secas activas, LSA) (Bermejo, 2014).

Las levaduras comerciales se usan ya que permiten reducir los problemas ocasionados por la fermentación y tener un mayor control microbiológico. Esta técnica permite la obtención de vinos uniformes y con una calidad excelente, sin embargo, reduce la tipicidad de los vinos. Aseguran una buena cinética fermentativa y la producción de compuestos beneficiosos para la calidad del vino, pero aportan demasiada homogeneidad a los vinos (Álvarez-Pérez et al., 2012). Las levaduras autóctonas se caracterizan por ser específicas de cada área, están adaptadas a su clima y a la materia prima, además de que proporcionan características únicas del vino (Torija, 2002). Pasteur decía que “las cualidades del vino dependen en gran parte de la naturaleza específica de las levaduras que se desarrollan durante la fermentación de los mostos”, por tanto, sería más específico el uso de levaduras autóctonas. Además, usando levaduras indígenas para una fermentación espontánea del mosto, obtenemos vinos con un mayor contenido en algunos compuestos que influyen positivamente en el aroma (Flanzy, 2003).

A pesar de que la calidad del vino va asociada a la variedad de la uva también influye la levadura empleada, por tanto, hay que seleccionarla correctamente para garantizar la adecuada fermentación y obtener un vino excelente.

1.3. LEVADURA SACCHAROMYCES

En vinificación, las levaduras *Saccharomyces*, más concretamente las *S. cerevisiae*, son las encargadas de terminar la fermentación alcohólica, y por tanto siempre han sido las más utilizadas. Estas levaduras son adecuadas ya que toleran concentraciones altas de etanol y también las altas temperaturas mucho mejor que otras levaduras. Cuando se trata de fermentación anaerobia, se genera una gran cantidad de energía y ésta se pierde en forma de calor.

La especie de levadura *S. cerevisiae* es producto de la domesticación, y es muy favorable para la vinificación ya que metaboliza glucosa y fructosa, en condiciones anaerobias y aerobias (González et al., 2007). También sabemos que tiene una capacidad idónea de crecimiento en mostos de uva con bajo contenido en sustancias nitrogenadas (Tiago et al., 2012).

1.4. LEVADURA NO SACCHAROMYCES

Las levaduras *No Saccharomyces* son metabólicamente activas durante las fermentaciones espontáneas e inoculadas, y además producen una gran cantidad de subproductos, que pueden contribuir a la definición del aroma del vino. Por lo tanto, el uso de levaduras *Saccharomyces* y *No Saccharomyces* como cultivos iniciadores mixtos en las fermentaciones de vinos es de interés para mejorar la calidad y complejidad de los vinos. Las levaduras *No Saccharomyces* representan un sumidero de biodiversidad inexplorada para la industria vitivinícola.

El uso de levaduras de vino que son *No Saccharomyces* como iniciadores de la fermentación ha demostrado que tienen algunas características beneficiosas y otras negativas. Entre las negativas, se encuentra la producción de ácido acético, acetato de etilo, acetaldehído y acetoína en altas concentraciones, lo que generalmente evita el uso de tales cepas como cultivos iniciadores de la fermentación. Cabe añadir que la mayoría de las especies que no pertenecen al género *Saccharomyces* y que provienen de ambientes relaciones con el vino, tienen un potencial de fermentación limitado, así como una baja resistencia al SO₂.

Sin embargo, durante la última década, varios estudios han estado revaluando la participación de las levaduras *No Saccharomyces* durante la fermentación alcohólica y su papel en el impacto metabólico y la complejidad del aroma del producto final.

En enología, el término *No Saccharomyces* engloba a todas aquellas levaduras de diferentes géneros que están presentes en el mosto durante las primeras fases de la fermentación, antes de que *Saccharomyces cerevisiae* las desplace, siendo esta última especie la que se encuentra mayoritariamente al final de la fermentación. El término *No Saccharomyces* ha pasado de emplearse casi exclusivamente para levaduras que se consideraban como alterantes de la calidad, a estar cada vez más ligado a un grupo de levaduras que pueden contribuir positivamente, al aportar variabilidad y tipicidad, y que constituyen una fuente de innovación enológica.

Actualmente, para el uso de estas levaduras como cultivos iniciadores se sigue un procedimiento secuencial, de modo que tras la adición de la *No Saccharomyces* se deja fermentar unos días y se inocula *S. cerevisiae*, que será la encargada de terminar la fermentación, desplazando casi por completo a las levaduras anteriores. En la inoculación secuencial, es necesario agregar nuevas fuentes de nitrógeno en la segunda inoculación para asegurar un correcto crecimiento de *S. cerevisiae*. Cuando no se realiza esta corrección se suelen observar problemas de imposición para *S. cerevisiae*, ocasionando paradas o ralentización de la fermentación.

Tal como hemos dicho anteriormente, dentro del término *No Saccharomyces* se incluye a un gran número de diferentes géneros y especies de levadura, cada cual, con características metabólicas particulares, capaces de aportar su impronta al vino. Es precisamente esta diversidad la que ha permitido usar levaduras *No Saccharomyces* como herramientas con las que mejorar la fermentación vínica, proporcionando la posibilidad de crear productos más complejos, que recuperen parte de la originalidad de las fermentaciones espontáneas (cuando éstas acaban bien) y que algunos echan en falta en los vinos fermentados con cepas iniciadoras de *S. cerevisiae*.

El uso de cultivos iniciadores, que combinen cepas de *No Saccharomyces* con cepas de *S. cerevisiae*, o su uso en inoculación secuencial, se postula como una alternativa a la recuperación de la variabilidad que existe en los cultivos “naturales” durante fermentaciones espontáneas, pero sin los problemas que pueden aparecer en éstos, como pueden ser las paradas de fermentación o la aparición de defectos sensoriales. Se busca imitar en cierta forma una fermentación espontánea, se trata de una tendencia que el consumidor final del vino también puede encontrar atractiva, ya que combina la innovación con el respeto a la tradición.

El empleo de las *No Saccharomyces* se está extendiendo, en parte gracias a que responde a una de las demandas del mercado: la de disponer de productos con un perfil y una imagen más “natural” o tradicional y más parecidos a los derivados de fermentaciones espontáneas. Además, el empleo de estas *No Saccharomyces* abre todo un abanico de posibilidades de mejora del vino, tanto en los aspectos mencionados aquí (aroma, acidez, glicerol, manoproteínas, color o grado alcohólico), como en otros que revelen en el futuro, ya que, debido a su potencial, son muchos los grupos de investigación trabajando con estas levaduras (Ciani et. Al., 2016).

1.5. COMPOSICIÓN POLIFENÓLICA

Los compuestos fenólicos son el grupo más extenso de sustancias no energéticas presentes en los alimentos de origen vegetal. En los últimos años se ha demostrado que una dieta rica en polifenoles vegetales puede mejorar la salud y disminuir la incidencia de enfermedades cardiovasculares (artículo 4).

Los compuestos fenólicos del vino son muy importantes para la calidad del vino, ya que proporcionan astringencia, color y estructura a los vinos. Estos compuestos están presentes en la uva y pasan al vino en mayor o menor grado según las técnicas de vinificación empleadas, extrayéndose durante el proceso de maceración de hollejos y pepitas con el mosto (Peidro, 2015). Estos compuestos son característicos por tener un anillo bencénico con uno o varios grupos hidroxilo, y los clasificamos en flavonoides y no flavonoides. La cantidad de estos compuestos en el vino es función del rendimiento de la cosecha, tipo de uva y de las condiciones edafoclimáticas (Casp y abril, 1999).

En los últimos años numerosos estudios han avalado los efectos beneficiosos de la ingesta de polifenoles sobre la salud, especialmente sobre el sistema cardiovascular. Los efectos de los polifenoles son fundamentalmente consecuencia de sus propiedades antioxidantes. Estos compuestos presentan efectos vasodilatadores, son capaces además de mejorar el perfil lipídico y atenúan la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad. Presentan claros efectos antiinflamatorios y estos compuestos son a su vez capaces de modular los procesos de apoptosis en el endotelio vascular.

1.5.1. Clasificación de los compuestos polifenólicos

1.5.1.1. Antocianos

Los antocianos son los compuestos fenólicos, presentes normalmente sólo en el hollejo de las uvas, responsables del color de los vinos tintos. Sin embargo, la cantidad de antocianos acumulados en las uvas está fuertemente influenciada por factores climáticos y agronómicos, por lo que el contenido en antocianos de las uvas de una determinada variedad puede variar mucho de una vendimia a otra, e incluso en una misma vendimia de una parcela a otra.

Se ha observado que cuando se elaboran vinos con una única variedad de uva tinta, estos presentan una composición de antocianos característica y que con el paso de 3-4 años en botella o bodega se pierde debido a la aparición de reacciones de condensación dando lugar a nuevos pigmentos oligoméricos y poliméricos con estructuras más estables, lo cual transforma el rojo en un color más anaranjado (Gutierrez et al., 2004).

Los antocianos son los compuestos fenólicos más influenciados por la cepa de levadura utilizada. Tanto la cantidad de antocianos extraídos durante la maceración y fermentación como su posterior degradación produciendo la pérdida de color, dependen de la levadura utilizada (Monagas et al., 2007).

Desde el punto de vista químico, los antocianos son heterósidos que se forman de la unión de un aglicón y un azúcar, que suele ser la glucosa, por medio de un enlace β -glucosídico (Valls et al., 2000). Las levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* presentan actividad β -glucosidasa, la cual ejerce un efecto positivo en el aroma del vino pero influye de forma negativa en el color. Esto es debido a que la antocianina del enlace glucosídico, cuando pierde el azúcar y se queda en forma de aglicona, tiene más facilidad de ser decolorado por reacción con el sulfuroso y por oxidación.

1.5.1.2. Taninos

Los taninos son compuestos fenólicos, que se encuentra en plantas, semillas, corteza, madera, hojas y pieles de frutas. Como una característica del vino, el tanino añade tanto amargor como astringencia, así como complejidad al sabor. Los taninos en el vino provienen de dos lugares posibles: las uvas del vino y la madera. Por tanto, los dividimos en dos grupos, los hidrolizables y los condensados.

Los taninos hidrolizables suelen proceder de la madera de roble de las barricas, y, por tanto, aparecen en el vino durante su envejecimiento, por esto los vinos blancos poseen taninos debido a su crianza en barricas. Por otro lado, los condensados sí son propios de los vinos tintos y se encuentran en las uvas (hollejo, raspón o pepitas).

La formación de complejos entre los taninos y las proteínas es de la cual deriva la sensación astringente (se percibe al reaccionar los taninos del vino con las proteínas que se encuentran en la mucosa de la boca). Los taninos condensados son los responsables de esta sensación. La astringencia es la sensación de sequedad y arrugamiento en boca característica de los vinos (Rinaldi *et al.*, 2016) y que depende del número de OH de los taninos que reacciona con las proteínas, siendo mayor en las pepitas que en los hollejos, puesto que se incrementa con el grado de polimerización (Peidro, 2015). Para que exista una astringencia adecuada tiene que haber un correcto balance de estos polisacáridos y el alcohol.

1.5.2. Reacciones de interacción entre compuestos fenólicos

En los procesos de elaboración y conservación del vino, se dan lugar diversas reacciones e interacciones entre los compuestos fenólicos. Éstas son las responsables de los cambios estructurales que afectan al color e influyen en las características organolépticas.

1.5.2.1. Condensación Tanino- Antociano

Los taninos condensados, en medio ácido como lo es el vino, se hidrolizan formando un carbocatión. Este reacciona con los antocianos dando lugar a un complejo incoloro que, después de su deshidratación, se queda rojo anaranjado. Este procedimiento se ve favorecido en ausencia de oxígeno y con temperatura alta. Además, depende de la concentración de antocianos y el propio color que se forma varía en función del carbocatión y del grado de polimerización. El compuesto es vulnerable a la decoloración por SO₂ y la hidratación.

Al formarse el carbocatión aparecen nuevos taninos condensados que permiten disminuir la astringencia del vino debido a que se aumenta el grado de polimerización del mismo (Zamora, 2003).

Por tanto, se llevan a cabo las interacciones entre los taninos y antocianos libres para obtener compuestos más estables. Los compuestos que se obtienen presentan un color parecido al de los antocianos. Cuando la unión es entre antociano y tanino el color es resistente a la acción del SO₂, mientras que entre tanino-antociano no lo sería (Peidro, 2015).

1.5.2.2. Polimerización por medio de la unión con acetaldehído

El acetaldehído se trata de un compuesto volátil muy importante en el vino que se puede formar químicamente (por la oxidación del etanol) o biológicamente (por la actividad de las levaduras, bacterias u oxidación de compuestos fenólicos) (Liu y Pilone, 2000). Los antocianos y

taninos pueden unirse mediante el acetaldehído dando lugar a diferentes compuestos con puentes de etilo, como puede ser tanino-etil-tanino o antociano-etil-antociano, con un tamaño variable. Estos productos son de color púrpura y menos sensible a la pérdida de color por hidratación y SO₂ que los antocianos libres.

La unión que se produce entre los taninos y el acetaldehído puede provocar una disminución de la astringencia debido a que precipitan, también puede acentuarse el desarrollo del color (Casp y Abril, 1999).

2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es escoger la levadura *No Saccharomyces*, de entre las 3 propuestas seleccionadas previamente en microvinificaciones, que presente las mejores características para una coinoculación con levadura *Saccharomyces*. Realizamos el trabajo con tres variedades distintas de vino con el objetivo de observar las diferencias según la variedad de la uva.

La levadura seleccionada debe cumplir con los siguientes objetivos:

1. Permitir una composición polifenólica adecuada en los vinos.
2. Producir vinos muy estables y con un carácter organoléptico adecuado.
3. Consumir todos los azúcares del mosto.
4. Obtener los mejores valores en los parámetros convencionales (acidez volátil, grado alcohólico y acidez total).

3. PLAN DE TRABAJO

Para obtener los objetivos anteriormente mencionados se implantó este Plan de trabajo:

1. Vendimiarse en el momento óptimo las uvas de las variedades Merlot, Garnacha y Cabernet Sauvignon.
2. Realizar las vinificaciones de las variedades de uva por separado. Las vinificaciones se realizaron por triplicado en depósitos de 50 L para cada una de las levaduras *No Saccharomyces*.
3. Hacer seguimiento de la fermentación alcohólica tomando densidades y temperatura diariamente y homogenizando mediante la técnica de bazuqueo para extraer compuestos polifenólicos.
4. A los diez días de maceración, se procedió al prensado de los depósitos y se esperó a que terminara la fermentación alcohólica.
5. Una vez terminada la fermentación alcohólica, se procedió a Inocular bacterias lácticas para realizar la fermentación maloláctica.
6. Al terminar la fermentación maloláctica, se embotellaron los vinos corrigiendo el SO₂.
7. Analizar los parámetros generales y los compuestos polifenólicos de cada uno de los vinos, una vez pasados tres meses del embotellado.
8. Comparar los resultados entre los vinos y las levaduras para observar cual da mejores resultados.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo consiste en la coinoculación secuencial de tres cepas de levadura *No Saccharomyces* con una cepa de levadura *Saccharomyces*. Las levaduras *No Saccharomyces* son 42D (*Hanseniaspora uvarum*), 49C (*Hanseniaspora uvarum*) y 58E (*Torulaspota delbrueckii*), todas ellas proceden de un trabajo de selección que se hizo previamente con 30 levaduras *No Saccharomyces* aisladas de los depósitos de vinificación de Merlot, Garnacha y Cabernet Sauvignon de la bodega Chozas Carrascal (“Selección de levaduras *No Saccharomyces* de las uvas Merlot y Cabernet Sauvignon en función de su perfil polifenólico”). La levadura *Saccharomyces*, también fue aislada y elegida en un trabajo previo (“Comportamiento de tres cepas de levaduras seleccionadas sobre la composición polifenólica de las variedades Merlot, Garnacha y Cabernet Sauvignon” y “Efecto de levaduras seleccionadas sobre la composición polifenólica de vinos de variedades Merlot, Cabernet Sauvignon y Garnacha de D.O. Utiel-Requena”), por sus características organolépticas y composición de los vinos resultantes.

Se estudiará el resultado de la coinoculación en las tres variedades de uva: Merlot, Garnacha y Cabernet Sauvignon, que fueron vendimiadas en su momento óptimo. Para evaluar combinación de levaduras, que tiene mejor comportamiento, nos centraremos en los componentes generales de los vinos y en los compuestos polifenólicos del vino.

Los ensayos de cada coinoculación se realizaron por triplicado, por lo tanto, se vinificaron nueve depósitos con 40 kg de cada variedad de uva, haciendo un total de 36 depósitos en el estudio.

4.1. VARIEDADES DE UVA

4.1.1. Merlot

La variedad de uva Merlot tiene su origen en el sudoeste de Francia, más concretamente de la región de Burdeos, aunque actualmente su producción se ha expandido hacia países como Argentina, Europa del este, Italia, China y España. En nuestro país las principales zonas donde se encuentra son La Mancha, Huesca, Cataluña y Navarra. Tras la Cabernet Sauvignon es la variedad más cultivada a nivel mundial. Es una variedad de tamaño medio a pequeño, con una maduración temprana, cosa que la hace ideal para vinos jóvenes.

Es una uva tinta, de racimo cónico, de tamaño pequeño y de escasa densidad. El grano es pequeño y uniforme en todo el racimo. La pulpa no está pigmentada y se caracteriza por su sabor dulce. Hollejo grueso y de color azul-negro.

Una de las características más importantes, es que dependiendo del terreno en que se desarrolle, dará diferentes personalidades de vino. Cabría destacar la menor presencia de taninos, característica que dará lugar a vinos más ligeros, finos y suaves, que con su maduración obtendrán mayor complejidad. Los vinos de Merlot maduran antes que Cabernet Sauvignon y por tanto se suelen consumir como vinos jóvenes permaneciendo poco tiempo en bodega (Vitivinicultura, 2012).

Su grado alcohólico se encuentra comprendido dentro de los vinos moderados ya que suele estar entre 11 y 13. El vino obtenido con esta variedad tiene como principal característica que envejece a gran velocidad sin perder calidad.

4.1.2. Garnacha

El origen de la variedad de uva Garnacha es Aragón, en el Este de España, pero posteriormente se extendió por diversos países como Italia, Australia o Canadá gracias a su capacidad de adaptación y resistencia a sequías, heladas o enfermedades. Ha sido la variedad más cultivada en España durante muchos años. Existen varios tipos de garnachas, como la Tintorera y la peluda. Esta variedad presenta un racimo de tamaño medio a grande, muy compactos y de bayas bastante uniformes, con pedúnculo corto.

Las bayas son de tamaño mediano, de sección esférica, con epidermis de color rojo violeta oscura, de difícil desprendimiento de su pedicelo, y con una pulpa de consistencia blanda, muy jugosa y sin pigmentación.

La garnacha es una variedad muy adecuada para vinos de alta graduación y color muy intenso, rojo dorado. Presentan una acidez media-alta y aromas ligeros. Presenta características diversas ya que se suele mezclar junto con otras variedades, puesto que su contenido en taninos es bajo. Se trata de una uva muy versátil, dando lugar desde vinos jóvenes a vinos de guarda (El País, 2017)

4.1.3. Cabernet Sauvignon

Se trata de una variedad de vino tinta originaria de la zona de Burdeos (Francia) y cuyo origen se considera que procede del cruce entre dos variedades (el Sauvignon Blanc y del Cabernet Franc). Es una de las variedades más conocidas en el mundo. Se cultiva en Francia, España, Italia, Chile, California, Australia y Argentina principalmente.

Presenta racimos muy pequeños de forma cónica, de compacidad media y con tamaño de bayas muy uniforme, en general pequeño y con epidermis azulada, muy oscura. Poseen un hollejo muy duro, lo cual da carácter tánico al vino y astringencia en la boca. Su pulpa está ligeramente coloreada en la maduración y son bayas duras y jugosas, con sabor herbáceo intenso.

Al tener un hollejo grueso se extraen en el proceso muchos taninos, cosa que permite un largo envejecimiento. Esto permite obtener un vino de crianza con colores rojo rubí-teja, con un aroma particular, mezcla de olor a violeta, pimienta verde y otros compuestos químicos (Cocineando, 2017).

4.2. PROCESO DE ELABORACIÓN

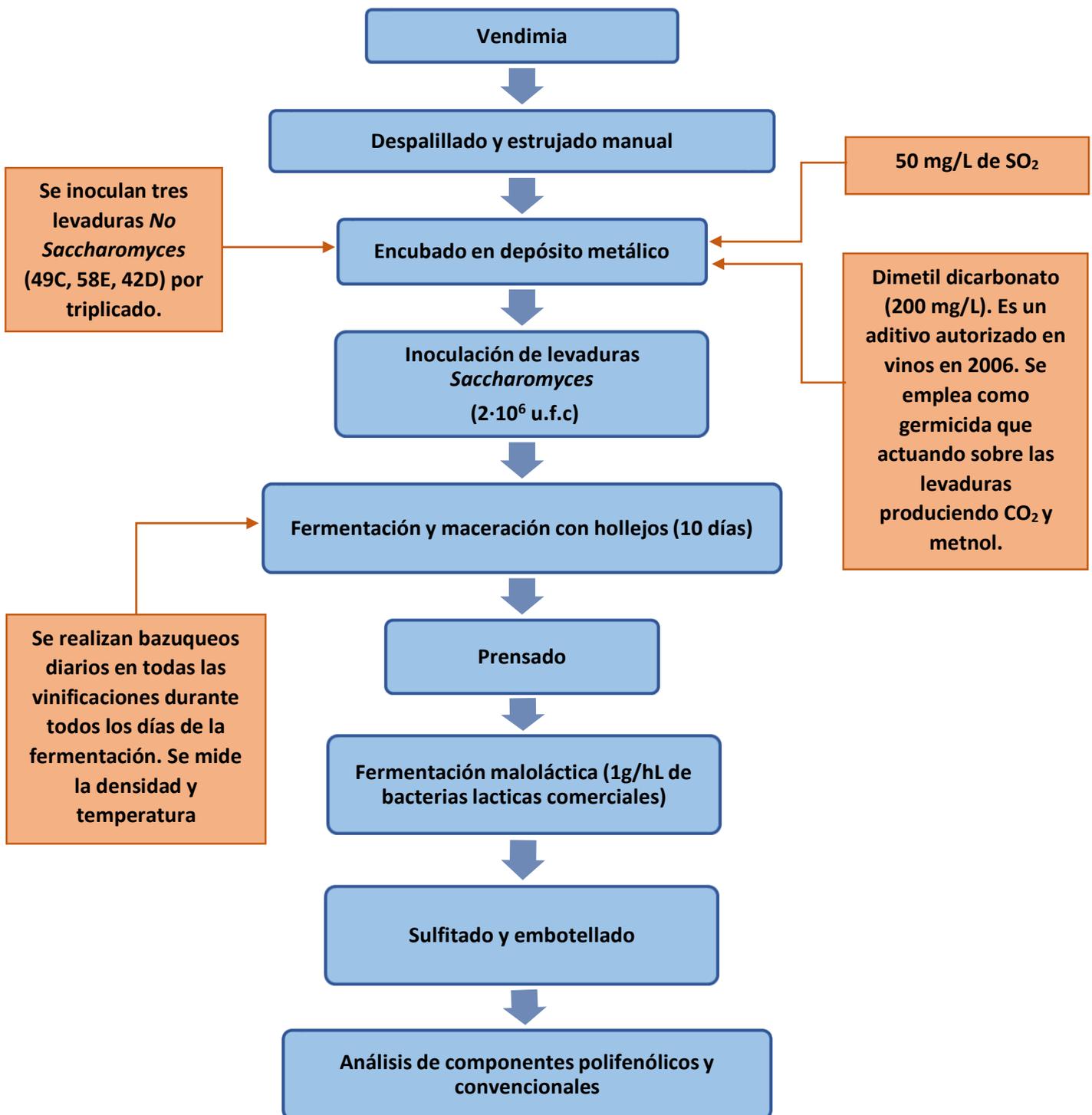


Figura 1. Diagrama de proceso de elaboración.

4.3. MÉTODOS ANALÍTICOS

4.3.1. Parámetros generales

Se realiza la determinación de los parámetros convencionales, tales como **°Brix** (determinación de los sólidos solubles totales), **Índice de Coloración**, **Ácido Volátil** (expresada en gramos de ácido acético por litro de vino), **Ácido Total** (suma de ácidos que se valoran cuando el vino se lleva a pH 7), **pH** (que mide su acidez real) y **Grado Alcohólico** (que expresa la cantidad de etanol que contiene 100 litros de vino).

4.3.2. Determinación de compuestos polifenólicos

4.3.2.1. Compuestos coloreados

- **Intensidad colorante y Matiz (Glories, 1978)**: El color del vino es uno de los atributos fundamentales para su caracterización, apreciación y calidad. Es el primer atributo que observamos al degustar un vino. Desde el punto de vista de la calidad, el color del vino se basa en principios acumulativos tanto de antocianos como de taninos (Ruiz, 1999). El color depende de la concentración en antocianos libres, de las combinaciones tanino-antocianos, de los taninos y varía también en función del pH, de la tasa de SO₂ libre, de la temperatura y de las aireaciones.

El color puede ser cuantificado por la suma de las densidades ópticas a 420 (amarillo), 520 (rojo) y 620 (azul) nm medidos en cubetas de 1 mm de recorrido óptico con relación al agua destilada; después de ser centrifugada la muestra. De esta forma se indica la intensidad del color. El resultado se multiplica por 10 para referirlo a la cubeta estándar de 10 mm de camino óptico.

$$IC = A_{420} + A_{520} + A_{620}$$

- **Tonalidad o Matiz (Glories, 1978)**: La tonalidad o matiz (Reglamento UE 2676/90), permite conocer la relación existente entre el color amarillo y el rojo, siendo el cociente siguiente:

$$A_{420} \text{ y } A_{520} \text{ (Tono} = A_{420}/A_{520})$$

- **Índice de PVPP, fijación sobre polivinilpirrolidona (Blouin, 1977)**: Indica el porcentaje de antocianos combinados con los taninos. La mayor concentración de combinaciones antocianos-taninos justifica la mayor contribución de los antocianos al color, y sobre toda la estabilidad del color.

Este método consiste en coger 1 mL de vino diluido 1/5, con agua destilada, en un tubo de ensayo a 0°C y añadir 1 mL de PVPP. Tras agitar y dejar reposar 10 minutos se añaden 3 mL de TCA al 20% y se deja reposar otros 10 minutos. Se centrifuga a 4000 rpm durante 8 minutos y se lee su absorbancia a 280 nm con cubeta de 10 mm haciendo referencia al TCA al 6% como blanco. Para obtener el índice de PVPP se emplea la siguiente fórmula:

$$I.PVPP(\%) = \left[\frac{(DO_0 - DO_1)}{DO_0} \right] * 100$$

- **Antocianos Totales (Blouin, 1992):** Para la determinación de los antocianos totales se utiliza el método CIH simplificado Para de Puissant-León. Se toman 0.2 mL de vino y se le añade 3,8 mL de HCL 1M, se agita y se deja reposar 3 horas. Se mide la absorbancia en una cubeta de 10 mm a 520 nm, empleando como blanco HCL 1M.

$$\text{Antocianos (mg/L)} = A_{520} \times 20 \times 20(\text{dilución})$$

- **Antocianos no decolorables por el sulfuroso (Ribéreau-Gayon y Stonestreet, 1965; Ribéreau-Gayon, 1979):** Gracias a esta determinación, obtenemos una estimación de la cantidad total de antocianos presentes en el vino. Se obtienen resultados midiendo absorbancia a 520 nm de dos tipos de tubos con muestra de vino, en uno se añade bisulfito sódico (que decolora los antocianos) y en el otro H₂O. Así, para obtener la cantidad de antocianos expresada en mg/L se multiplica la diferencia de ambos resultados por 875, coeficiente de extinción molar de la malvidina.

4.3.2.2. Compuestos astringentes

- **Índice de Polifenoles Totales (Ribereau-Gayón 1974):** Con este índice, valoramos el contenido total de los compuestos polifenólicos. Se efectúa diluyendo el vino con un factor de 100 y midiendo la densidad óptica a 280 nm en una cubeta de 10 mm, cogiendo de referencia el agua. Si se desea expresar los polifenoles totales en concentración, se multiplica el IPT por 0,08 o 0,8, que es el factor de corrección para expresar los resultados en g/L o mg/L de ácido gálico.

- **Índice DMACH (Vivas, 1994):** El proceso se basa en la estimación del grado de polimerización de los taninos de la uva y del vino, utilizando un aldehído específico de estructuras fenólicas: el p-dimetilaminoacetaldehído (D.M.A.C.H.). Para la realización de este método, se procedió a introducir en un aforado 100 mg de DMACH, 10 mL de HCL 12N y enrasar a 100 mL con metanol. Por otro lado, se diluye el vino con metanol a 1/20. Se introduce en un tubo de ensayo 1 mL de vino diluido con 5 mL de DMACH, agitamos, esperamos 10 minutos y leemos la absorbancia a 640 nm, esta lectura será A_m. Para el testigo, se introduce en un tubo de ensayo 1 mL de vino diluido con 5 mL de metanol, agitamos y leemos la absorbancia a 640 nm, esta lectura será A_t. A partir del valor de los taninos condensados calcularemos el Índice de Polimerización o DMACH:

$$\text{Índice de DMACH} = \frac{(A_m - A_t)}{[\text{taninos}]} \times 100$$

- **Taninos condensados totales (Ribéreau-Gayon y Stonestreet, 1966), (Ribéreau-Gayon, 1979):** Llamamos taninos a diversos compuestos fenólicos que tienen como característica común que precipitan con las proteínas en solución, y que ralentizan o inhiben las acciones enzimáticas por combinación directa con su fracción proteínica. Este método consiste en la propiedad que presentan las proantocianidinas de ser transformadas parcialmente en antocianidinas rojas al calentarse en medio ácido.

Se mezcla 1 mL de vino previamente diluido con 5 mL de agua destilada y 3 mL de HCL 12 N. El tubo 1 se introduce en el baño durante 30 minutos tapado herméticamente y el tubo 2 a temperatura ambiente. Pasado el tiempo, el tubo 1 se refrigera y a ambos se le añade 0,5 mL de etanol al 96%, se agitan y se lee la absorbancia a 550 nm.

$$\text{Taninos Condensados Totales (g/L)} = (A_1 - A_2) \times 19,33$$

- A_1 : la absorbancia de la mezcla del tubo 1.

- A_2 : la absorbancia de la mezcla del tubo 2.

- **Índice de etanol (Glories, 1984):** Los taninos cuando se combinan con las sales inorgánicas, péptidos y polisacáridos precipitan fácilmente con el etanol. Para determinar el índice de etanol hay que diluir el vino con etanol al 96% y dejar reposar 24 horas a temperatura ambiente. Pasado un día se centrifuga y diluye el sobrenadante (0,5 mL de sobrenadante y 4,5 mL de agua destilada) y se mide la absorbancia a 280 nm en cubeta de 10 mm. Por otro lado, se realiza el mismo proceso con el vino original centrifugado y diluido (0,25 mL de vino sin diluir y 25 mL de agua destilada).

$$\text{etanol (\%)} = ((A_1 - A_2) / A_1) \times 100$$

- A_1 : la absorbancia a 280 nm de la dilución de vino con etanol.

- A_2 : la absorbancia a 280 nm del vino original.

4.4. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Los resultados que se han obtenido de forma experimental en el laboratorio se representan realizando un resumen estadístico en forma de tabla. En estas tablas se expresan la media, desviación típica y los valores de F-Ratio y P-Value que nos permiten conocer si los datos son significativos o no. Mediante un análisis de varianza simple (ANOVA) se ha analizado la influencia, en las tres variedades de uva, de la utilización de solo la levadura *Saccharomyces* 22H a modo de control y de las tres coinoculaciones de las levaduras *No Saccharomyces* (49C, 42D y 58E) con las *Saccharomyces* (22H).

Esto nos permite conocer el grado de significación de los datos mediante un contraste de hipótesis para un nivel de confianza del 95%. Para ello se ha utilizado el paquete Statgraphics centurión XVII-X64.

Se obtiene el valor de F-Ratio que mide la variación que existe entre los datos correspondientes a cada uno de los grupos y P-Value que siendo menor de 0,05 indica que hay diferencias significativas entre sus medias al 95% del nivel de significación.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo, se presentan los resultados obtenidos según el comportamiento e influencia de la levadura *Saccharomyces* 22H y de las coinoculaciones de la levadura *Saccharomyces* 22H con las levaduras *No Saccharomyces* 49C, 42D y 58E, en las tres variedades de vinos sobre los compuestos polifenólicos y convencionales. Esto se realiza con el objetivo de escoger la levadura *No Saccharomyces*, de entre las 3 propuestas, que presente las mejores características para una coinoculación con levadura *Saccharomyces* para cada variedad de vino.

5.1. EVOLUCIÓN DE LOS MOSTOS DURANTE EL SEGUIMIENTO DE LAS MICROVINIFICACIONES.

Se realizó el seguimiento diario de temperatura y densidad, así como un bazuqueo diario para facilitar la extracción de compuestos a partir de la pasta. La fermentación alcohólica discurrió paralelamente en todas las vinificaciones, concluyendo en 8-9 días con una densidad próxima a 990 y sin presencia de azúcares residuales, excepto para las vinificaciones testigo de Cabernet Sauvignon, que se paralizaron a una densidad de 1003-1005.

En las figuras 2, 3 y 4 se observa la evolución de la densidad en las vinificaciones realizadas. La figura 2 corresponde a las vinificaciones realizadas con la combinación 42D-22H con relación a la evolución de la densidad cuando se fermenta exclusivamente con la cepa 22H. La figura 3 corresponde a las vinificaciones realizadas con la combinación 58E-22H en relación a la evolución de la densidad cuando se fermenta exclusivamente con la cepa 22H, y la figura 4 a las vinificaciones realizadas con la combinación 49C en relación a la evolución de la densidad cuando se fermenta exclusivamente con la cepa 22H.

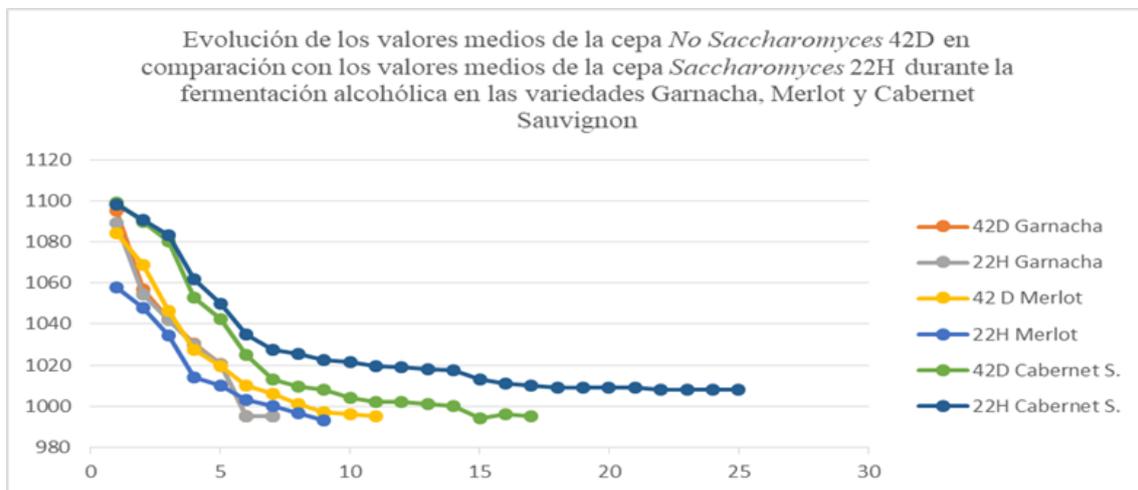


Figura 2. Evolución de la densidad en las vinificaciones realizadas con la combinación 42D-22H con relación a las realizadas con la cepa 22H.

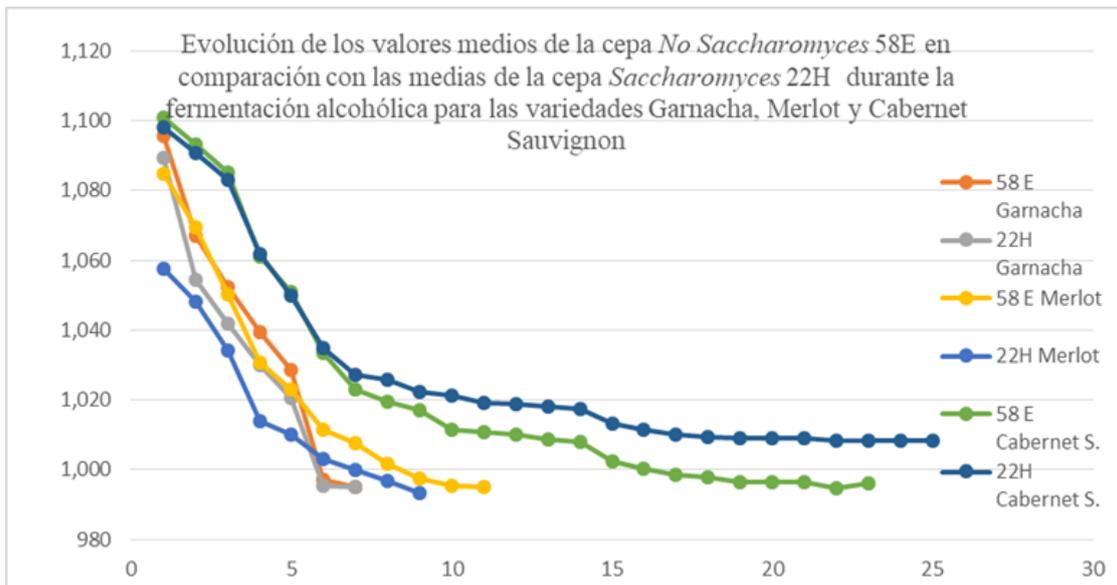


Figura 3. Evolución de la densidad en las vinificaciones realizadas con la combinación 58E-22H con relación a las realizadas con la cepa 22H.

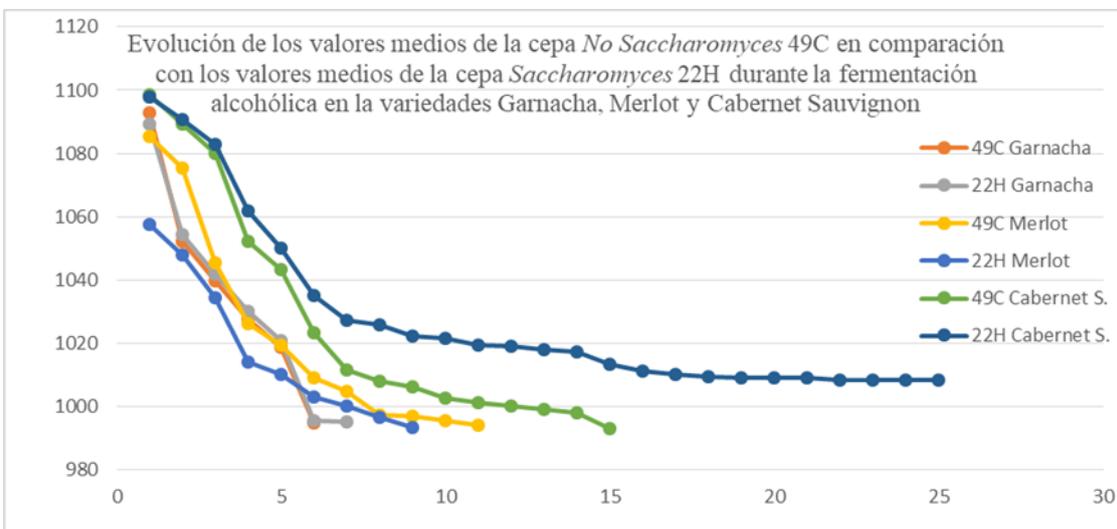


Figura 4. Evolución de la densidad en las vinificaciones realizadas con la combinación 49 C-22H con relación a las realizadas con la cepa 22H.

Como podemos observar en las Figuras 2, 3, y 4, las fermentaciones son más lentas en Cabernet Sauvignon, ya que la uva presentaba un mayor grado de madurez que las otras uvas, y por tanto una mayor concentración de azúcares. Es de destacar la mayor velocidad fermentativa de las combinaciones 42D-22H y 49C-22H con respecto a la combinación 58E-22H.

La mayor cinética fermentativa la observamos con la cepa 22H en las uvas de Garnacha y Merlot; en cambio, la cepa 22H no es capaz de concluir la fermentación de las uvas de la variedad Cabernet. En cambio, cuando utilizamos inoculación secuencial de las cepas “no-*Saccharomyces*” seguido de la 22H, la fermentación es lenta, pero concluye en unos 15 días para las combinaciones 42D-22H y 49C-22H, precisando de unos 23 para que termine la fermentación la combinación 58E-22H.

Para establecer si la cepa 22H tiene dificultades para fermentar cantidades elevadas de azúcar, se realizaron vinificaciones a tres grados Brix diferentes (22H1: 24,7; 22H2: 25 y 22H3: 25,7), encontrándose que con altas concentraciones de azúcar la cepa 22H realiza una lenta fermentación, pero es capaz de agotar los azúcares presentes en el mosto (Figura 5).

La dificultad de esta cepa 22H para fermentar los vinos los vinos de Cabernet Sauvignon, puede ser debida, además de su alta concentración azucarada, a su gran riqueza polifenólica.

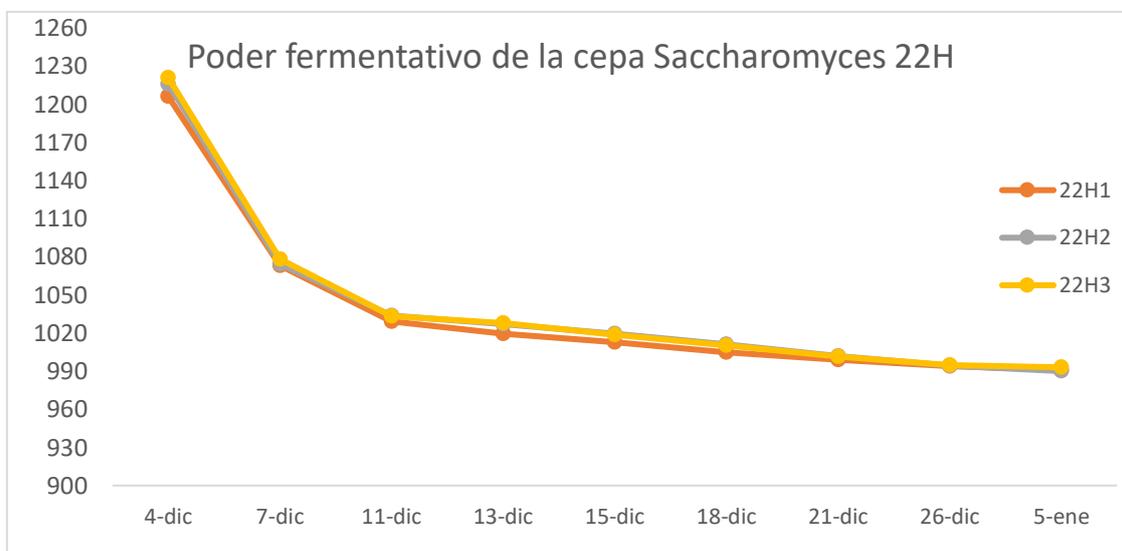


Figura 5. Evolución de la densidad en las vinificaciones realizadas con la combinación 49 C-22H con relación a las realizadas con la cepa 22H.

5.2. EFECTO DE LA CEPA DE LEVADURA 22H Y DE LAS COINOCULACIONES 49C-22H, 42D-22H Y 58E-22H EN LOS PARÁMETROS CONVENCIONALES Y POLIFENÓLICOS DE LOS VINOS ELABORADOS CON LA VARIEDAD MERLOT.

A continuación, se muestran los valores de IC, Acidez Volátil, Acidez Total, pH, Grado Alcohólico y Tono, todos ellos considerados como parámetros generales del vino Merlot obtenidos tras realizar el estudio estadístico ANOVA (Tabla 1). Como se puede observar, no hay diferencias significativas, excepto dos pequeñas variaciones en la Acidez Volátil y en el pH ($P < 0,05$), ya que todos los otros valores de P-Value son superiores a 0,05.

Tabla 1: Medias, desviación estándar y ANOVA de los parámetros convencionales de los vinos Merlot elaborados con las cepas de levadura seleccionadas.

CEPA DE LEVADURA	IC	ACIDEZ VOLÁTIL	ACIDEZ TOTAL	pH	G. ALCOHÓLICO	TONO
22H	4,95 ± 0,6 _a	0,34 ± 0,02 _a	4,91 ± 0,4 _a	3,68 ± 0,04 _a	13,27 ± 0,53 _a	81,08 ± 2,65 _a
49C/22H	5,04 ± 0,44 _a	0,34 ± 0,02 _a	4,91 ± 0,26 _a	3,74 ± 0,04 _b	13,55 ± 0,19 _a	81,94 ± 4,03 _a
42D/22H	5,05 ± 0,74 _a	0,33 ± 0,04 _a	5,06 ± 0,17 _a	3,69 ± 0,03 _a	13,55 ± 0,39 _a	79,44 ± 0,93 _a
58E/22H	5,07 ± 0,4 _a	0,4 ± 0,0 _b	4,92 ± 0,24 _a	3,78 ± 0,03 _a	13,58 ± 0,20 _a	79,76 ± 2,91 _a
F-Ratio	0,05	9,27	0,43	10,07	1,1	0,99
P-Value	0,9831	0,0005	0,7357	0,0003	0,372	0,4157

IC: Intensidad Colorante

Letras distintas en la misma columna y en cada grupo de datos indican diferencias significativas al 95% para cada parámetro analizado.

La acidez volátil que presentan los vinos elaborados de la variedad Merlot con las tres levaduras *No Saccharomyces*, es aceptable, ya que sus valores se encuentran próximos a 0,40 g/L y están alejados del valor de 1g/L de ácido acético, marcado como límite máximo en los vinos (D.O.C.V., 4/2011) y debido a esto no habría que desechar ninguna de las cepas analizadas. Se puede añadir que los vinos fermentados con la coinoculación de 58E/22H obtienen una acidez volátil más baja que los otros.

Si observamos los valores de pH obtenido, se encuentran un poco por encima de 3,5 y la acidez total está por debajo de los valores deseados en bodega, lo cual nos indica que habría que corregir este parámetro con ácido tartárico. El grado alcohólico es elevado, lo cual está relacionado con esta variedad de uva en la zona Utiel-Requena, las levaduras *No Saccharomyces* han conseguido transformar los azúcares en alcohol, al coincidir los valores obtenidos con el valor de grado alcohólico probable determinado en los depósitos inicialmente.

La Intensidad Colorante es un parámetro muy apreciado en el vino, ya que indica la carga de color. En los vinos elaborados con la variedad Merlot, no se aprecian diferencias significativas atribuibles a la cepa de *No Saccharomyces* empleada. Por lo que la fermentación con levaduras *No Saccharomyces*, no provoca pérdida de color en relación a la vinificación con únicamente la levadura *Saccharomyces* (22H).

El tono o matiz es el parámetro que indica la importancia del color amarillo frente al rojo (Glories, 1978). Cabe destacar que, a mayores valores de tono, mayores posibilidades existen que el vino se encuentre alterado u oxidado. La cepa de levadura *No Saccharomyces*, no provoca diferencias significativas en estas variables, en los vinos elaborados con la variedad Merlot.

Tabla 2: Medias, desviación estándar y ANOVA de los parámetros polifenólicos de los vinos Merlot elaborados con las cepas de levadura seleccionadas.

CEPA DE LEVADURA	ANT TOT (mg/L)	TAN CON (mg/L)	IPT	I. DMACH (%)	I. ETANOL (%)	I. PVPP (%)
22H	573,93 ± 34,70 _a	1,15 ± 0,10 _b	15,15 ± 0,70 _b	88,29 ± 5,34 _a	56,62 ± 1,67 _b	52,49 ± 2,62 _b
49C/22H	647,88 ± 41,35 _c	1,10 ± 0,11 _{ab}	15,99 ± 0,60 _c	88,33 ± 9,81 _a	53,54 ± 2,74 _a	49,13 ± 2,60 _a
42D/22H	610,88 ± 46,53 _b	1,05 ± 0,10 _a	14,40 ± 0,87 _a	93,09 ± 10,33 _a	56,68 ± 2,67 _b	47,87 ± 3,58 _a
58E/22H	630,65 ± 19,62 _{bc}	1,09 ± 0,11 _{ab}	14,37 ± 0,77 _a	88,37 ± 10,02 _a	56,81 ± 2,62 _b	48,17 ± 3,44 _a
F-Ratio	6,65	1,49	9,55	0,62	3,71	4,23
P-Value	0,0013	0,2371	0,0001	0,6102	0,0214	0,0126

ANT TOT: Antocianos Totales; TAN CON: Taninos Condensados; IPT: Índice de Polifenoles Totales; I. DMACH%: Porcentaje del índice de DMACH; I. ETANOL%: Porcentaje del índice de Etanol; I. PVPP%: Porcentaje de fijación sobre polivinilpirrolidona.

Letras distintas en la misma columna y en cada grupo de datos indican diferencias significativas al 95% para cada parámetro analizado.

En la Tabla 2, aparecen los valores relacionados con los parámetros polifenólicos de los vinos, antocianos totales, taninos condensados, IPT y los parámetros relacionados con la calidad de los taninos (I. DMACH, I. Etanol y I. PVPP). Como se puede observar en los resultados obtenidos en un análisis estadístico ANOVA, aparecen valores muy distintos según el tipo de cepa de levadura utilizada en todos los parámetros, salvo en I. DMACH (%) que no presentan diferencias significativas, este parámetro indica el grado de polimerización de los taninos.

Como ya se comentó anteriormente, el color de los vinos está relacionado no sólo con la concentración de antocianos, sino que también depende del estado de estabilidad en que se encuentren los antocianos. Para conseguir mantener una buena estabilidad de color en el tiempo, es necesario tener una buena concentración de antocianos. La combinación de levaduras que mejor cumplen los requisitos planteados es la combinación de levaduras no-*Saccharomyces* 49C y 58E con la levadura *Saccharomyces* 22H. La combinación de levaduras *Saccharomyces* y No *Saccharomyces* ayuda a mantener y estabilizar el color mejor que el uso de la levadura *Saccharomyces* 22H.

Aparecen diferencias significativas en la concentración de taninos e IPT, aunque no afecta al grado de polimerización de los taninos, (I. DMACH), dichos valores, indican que el tanino no está muy polimerizado, y que precisa de más tiempo para conseguir la estabilidad. Con respecto a la proporción de taninos unidos a polisacáridos (I. Etanol), las combinaciones que más contribuyen a su unión son las compuestas por 42D/22H y 58E/22H, lo vinos, serán menos astringentes, manteniendo una buena estructura, gracias a la concentración de taninos condensados. Sin embargo, en la que aparece una mayor proporción de antocianos unidos a taninos es la vinificación realizada con la levadura *Saccharomyces* sola (22H), por lo que proporcionará una mayor estabilidad de color, aunque puede no estar únicamente causado por la levadura, ya que coincide con los vinos con mayores valores de IPT y taninos condensados y totales, relacionado con la materia prima. Destacan los ensayos en los que se produce una mayor unión de antocianos con los polisacáridos (I. Etanol), aun teniendo menor concentración de taninos. La combinación 58E/22H además tiene una mayor concentración de antocianos, lo cual contribuye a esta estabilización.

5.3. EFECTO DE LA CEPA DE LEVADURA 22H Y DE LAS COINOCULACIONES 49C-22H, 42D-22H Y 58E-22H EN LOS PARÁMETROS CONVENCIONALES Y POLIFENÓLICOS DE LOS VINOS ELABORADOS CON LA VARIEDAD GARNACHA.

En la Tabla 3, se muestran los valores de IC, Acidez Volátil, Acidez Total, pH, Grado Alcohólico y Tono, todos ellos considerados como parámetros generales del vino Garnacha, que han sido obtenidos tras el estudio estadístico ANOVA. Como se puede observar, solo los parámetros de pH y Grado Alcohólico muestran diferencias significativas.

Tabla 3: Medias, desviación estándar y ANOVA de los parámetros convencionales de los vinos Garnacha elaborados con las cepas de levadura seleccionadas.

CEPA DE LEVADURA	IC	ACIDEZ VOLÁTIL	ACIDEZ TOTAL	pH	G. ALCOHÓLICO	TONO
22H	10,74 ± 0,58 _a	0,49 ± 0,04 _a	6,21 ± 0,06 _a	3,44 ± 0,02 _a	14,45 ± 0,09 _b	53,76 ± 2,13 _a
49C/22H	11,03 ± 0,71 _a	0,45 ± 0,0 _a	5,91 ± 0,32 _a	3,53 ± 0,09 _b	14,42 ± 0,37 _b	56,94 ± 3,42 _a
42D/22H	10,82 ± 0,37 _a	0,45 ± 0,02 _a	6,22 ± 0,23 _a	3,43 ± 0,07 _a	14,30 ± 0,26 _b	55,54 ± 4,08 _a
58E/22H	11,74 ± 1,01 _a	0,49 ± 0,07 _a	6,00 ± 0,21 _a	3,41 ± 0,06 _a	13,87 ± 0,51 _a	52,05 ± 4,05 _a
F-Ratio	2,52	1,64	2,79	3,76	3,66	2,12
P-Value	0,0872	0,2116	0,0671	0,0274	0,03	0,1296

IC Intensidad Colorante

Letras distintas en la misma columna y en cada grupo de datos indican diferencias significativas al 95% para cada parámetro analizado.

Con respecto a los valores obtenidos de la acidez volátil que presentan los vinos elaborados con la variedad Garnacha con las tres levaduras *No Saccharomyces* se puede observar valores aceptables, ya que se encuentran próximos a 0,40 g/L y están alejados del valor de 1 g/L de ácido acético, no observándose diferencias significativas entre las vinificaciones con levaduras *No Saccharomyces* y el testigo *Saccharomyces* (22H).

Los valores de pH obtenidos se encuentran alrededor de 3,5 y la acidez total se encuentra en valores deseados, aunque este resultado tiene más que ver con las características de la materia prima que con el desarrollo de las levaduras. En cuanto al grado alcohólico es elevado, lo cual nos indica que tanto levaduras *No Saccharomyces* en consorcio con *Saccharomyces*, como la levadura *Saccharomyces* sola, han conseguido transformar todos los azúcares en alcohol.

La intensidad de colorante nos indica la carga de color y en los vinos elaborados con la variedad Garnacha no encontrándose diferencias significativas entre los vinos obtenidos. Así, se puede afirmar que la fermentación con las levaduras *No Saccharomyces* utilizadas no provoca pérdida de color en relación a la vinificación con únicamente levadura *Saccharomyces* 22H.

Por último, sobre el parámetro de Tono, no se observan diferencias significativas entre los distintos vinos elaborados con la variedad Garnacha, lo cual indica que no hay oxidación.

Tabla 4: Medias, desviación estándar y ANOVA de los parámetros polifenólicos de los vinos Garnacha elaborados con las cepas de levadura seleccionadas.

CEPA DE LEVADURA	ANT TOT (mg/L)	TAN CON (mg/L)	IPT	I. DMACH (%)	I. ETANOL (%)	I. PVPP (%)
22H	361,13 ± 20,08 _a	1,64 ± 0,19 _a	21,08 ± 0,70 _a	55,27 ± 6,75 _a	56,54 ± 1,90 _a	62,40 ± 6,00 _a
49C/22H	371,13 ± 30,64 _a	1,65 ± 0,08 _a	21,68 ± 0,60 _{ab}	62,02 ± 3,84 _b	55,48 ± 3,70 _a	64,82 ± 6,33 _a
42D/22H	382,05 ± 24,16 _{ab}	1,68 ± 0,17 _a	22,21 ± 0,87 _b	53,27 ± 8,09 _a	57,51 ± 4,20 _a	60,70 ± 3,65 _a
58E/22H	398,04 ± 12,16 _b	1,77 ± 0,11 _a	21,66 ± 0,71 _{ab}	57,04 ± 6,00 _{ab}	56,05 ± 3,44 _a	64,45 ± 4,61 _a
F-Ratio	4,34	1,53	4,45	3,12	0,57	1,2
P-Value	0,0113	0,2268	0,0101	0,0396	0,6391	0,3256

ANT TOT: Antocianos Totales; TAN CON: Taninos Condensados; IPT: Índice de Polifenoles Totales; I. DMACH%: Porcentaje del índice de DMACH; I. ETANOL%: Porcentaje del índice de Etanol; I. PVPP%: Porcentaje de fijación sobre polivinilpirrolidona.

Letras distintas en la misma columna y en cada grupo de datos indican diferencias significativas al 95% para cada parámetro analizado

Tal y como se observa en la Tabla 4, se recogen las determinaciones analíticas relacionadas con la concentración y el estado de los polifenoles relacionados con la astringencia de los vinos. Al contrario de lo que ocurría con los ensayos realizados con las variedades Merlot, en los ensayos de Garnacha no aparecen diferencias significativas en la concentración de taninos, ni en las moléculas de unión de taninos con polisacáridos (I. ETANOL) ni en las de unión con antocianos (I PVPP). Las diferencias entre los vinos, que se han encontrado en los valores de IPT, son relacionados principalmente con la materia prima. Aunque aún no se han detectado reacciones entre los taninos con polisacáridos y antocianos, en los vinos de la variedad Garnacha, cuyo efecto se verá a más largo plazo, sí aparecen reacciones de polimerización de taninos coincidiendo con los valores más bajos I. DMACH que corresponde a las combinaciones 42D/22H y 58E/22H. Al no hallarse diferencias significativas en la concentración de taninos, las reacciones entre ellos parecen estar relacionadas no sólo con la composición sino también con el efecto de las levaduras, por la síntesis de acetaldehído y la cesión de manoproteínas. En la reacción de polimerización donde se unen antocianos y taninos también interviene el acetaldehído. Éste actúa como puente de condensación (puente de etilo) y crea diferentes conjuntos dependiendo de qué tipo de moléculas se unen. Los productos enlazados que se crean son: entre taninos (Tan-etil-Tan), uniendo antocianos entre sí (Anto-etil-Anto) y entre ambos (Tan-etil-Anto). Los pigmentos Anto-etil-Anto y Tan-etil-Anto tienen un color púrpura y son más resistentes a la decoloración por SO₂ y a la hidratación, que los antocianos libres. Cabe destacar que la mejor reacción de polimerización entre los propios antocianos es la Anto-etil-AOH (forma hemiacetalica). Esto demuestra que en la condensación de antocianos mediante puentes de etilo no sólo se produce un cambio de rojo a púrpura, sino que también se produce un aumento en la intensidad del color (Atanasova et al., 2012).

5.4. EFECTO DE LA CEPA DE LEVADURA 22H Y DE LAS COINOCULACIONES 49C-22H, 42D-22H Y 58E-22H EN LOS PARÁMETROS CONVENCIONALES Y POLIFENÓLICOS DE LOS VINOS ELABORADOS CON LA VARIEDAD CABERNET SAUVIGNON.

En la Tabla 5, se muestran los valores de IC, Acidez Volátil, Acidez Total, pH, Grado Alcohólico y Tono, todos ellos considerados como parámetros generales del vino Cabernet Sauvignon, que han sido obtenidos tras el estudio estadístico ANOVA. Como se puede observar, solo los parámetros de IC, Acidez Volátil y pH muestran diferencias significativas.

Tabla 5: Medias, desviación estándar y ANOVA de los parámetros convencionales de los vinos Cabernet Sauvignon elaborados con las cepas de levadura seleccionadas.

CEPA DE LEVADURA	IC	ACIDEZ VOLÁTIL	ACIDEZ TOTAL	pH	G. ALCOHÓLICO	TONO
22H	14,75 ± 1,08 _a	0,97 ± 0,32 _b	6,70 ± 0,61 _a	3,70 ± 0,16 _b	15,12 ± 0,17 _a	64,05 ± 5,53 _a
49C/22H	15,32 ± 1,09 _a	0,66 ± 0,03 _a	6,13 ± 0,16 _a	3,58 ± 0,04 _a	15,22 ± 0,08 _a	61,40 ± 1,90 _a
42D/22H	15,20 ± 0,68 _a	0,64 ± 0,01 _a	6,70 ± 0,05 _a	3,56 ± 0,05 _a	15,23 ± 0,15 _a	65,36 ± 5,97 _a
58E/22H	16,88 ± 0,74 _b	0,61 ± 0,03 _a	6,46 ± 0,42 _a	3,62 ± 0,03 _a	15,35 ± 0,24 _a	63,10 ± 4,01 _a
F-Ratio	6,15	6,41	3,04	3,45	1,85	0,78
P-Value	0,0039	0,0032	0,0527	0,0362	0,17	0,52

IC: Intensidad Colorante

Letras distintas en la misma columna y en cada grupo de datos indican diferencias significativas al 95% para cada parámetro analizado.

La acidez volátil que presentan los vinos elaborados con la variedad Cabernet Sauvignon con las tres cepas de levaduras *No Saccharomyces* es alta, ya que sus valores se encuentran lejos del 0,40 g/L y están cerca del valor de 1 g/L de ácido acético, sobre todo los vinos elaborados solos con la variedad *Saccharomyces* 22H sin combinación con las *No Saccharomyces*, que dan valores más bajos. Ese aumento de acidez volátil ha sido provocado por que la fermentación tardó mucho tiempo en concluirse, pudiéndose atribuir a una contaminación, al no estar el vino protegido con SO₂.

Los valores de pH obtenidos se encuentran un poco por encima de 3,5 y la acidez total se encuentra en valores deseados, aunque hay poca variación entre la utilización de unas levaduras u otras. Si observamos los valores de grado alcohólico, son bastante elevados, lo que nos indica que tanto la levadura *Saccharomyces* como las *No Saccharomyces* han conseguido transformar todos los azúcares en alcohol, aunque la cinética de fermentación fue muy lenta.

Aunque para los vinos elaborados con las variedades Merlot y Garnacha, no se encontraron diferencias significativas, en la Intensidad Colorante ni en el Tono, sí parecen dichas diferencias para los vinos de Cabernet Sauvignon (tabla 5). La participación de la levadura *no-Saccharomyces*, parece proteger al color de los vinos, siendo la combinación 58E/22H la que mejor mantiene la Intensidad Colorante. Sin embargo, la que peor protege de la oxidación de los vinos, (valor superior de Tono) es la levadura *No Saccharomyces* 42D en consorcio con la 22 H y la que mejor la levadura *No Saccharomyces* 49C. Por lo tanto, la combinación más interesante es la 58E/22H, que mantiene una buena intensidad colorante y bajo nivel de

oxidación en los vinos, pero hay que tener en cuenta el incremento que provocaba en la acidez volátil, aunque sólo en esta variedad que tenía un grado alcohólico significativamente mayor.

Tabla 6: Medias, desviación estándar y ANOVA de los parámetros polifenólicos de los vinos Cabernet Sauvignon elaborados con las cepas de levadura seleccionadas.

CEPA DE LEVADURA	ANT TOT (mg/L)	TAN CON (mg/L)	IPT	I. DMACH (%)	I. ETANOL (%)	I. PVPP (%)
22H	361,13 ± 22,86 _a	1,64 ± 0,19 _a	42,28 ± 0,79 _a	43,96 ± 7,89 _b	46,23 ± 4,46 _a	81,57 ± 4,77 _c
49C/22H	647,88 ± 41,35 _c	1,64 ± 0,26 _a	47,69 ± 1,56 _b	47,06 ± 7,97 _b	53,02 ± 2,59 _b	62,82 ± 7,56 _a
42D/22H	610,88 ± 46,53 _b	1,82 ± 0,32 _a	47,18 ± 0,58 _b	45,25 ± 8,20 _b	55,06 ± 4,97 _b	73,65 ± 6,30 _b
58E/22H	630,65 ± 19,62 _{bc}	2,31 ± 0,37 _b	47,13 ± 0,86 _b	33,22 ± 4,34 _a	52,53 ± 4,47 _b	70,12 ± 5,45 _b
F-Ratio	137,58	10,58	56,34	6,61	7,35	14,64
P-Value	0	0,0001	0	0,0013	0,0007	0

ANT TOT: Antocianos Totales; TAN CON: Taninos Condensados; IPT: Índice de Polifenoles Totales; I. DMACH%: Porcentaje del índice de DMACH; I. ETANOL%: Porcentaje del índice de Etanol; I. PVPP%: Porcentaje de fijación sobre polivinilpirrolidona.

Letras distintas en la misma columna y en cada grupo de datos indican diferencias significativas al 95% para cada parámetro analizado

En la tabla 6, se recogen los resultados obtenidos para la variedad Cabernet Sauvignon, de los parámetros relacionados con el color de los vinos. Así pues, del mismo modo que sucedía con la variedad Merlot, la fermentación con la levadura *Saccharomyces* 22H sin combinación con levadura *No Saccharomyces*, es la que consigue los vinos con la concentración de antocianos más baja y menos estabilizados. La participación de la levadura *No Saccharomyces*, es la que permite obtener vinos con mejor estabilidad de color y de ellas destaca la 49C.

En la Tabla 6, aparecen los valores relacionados con los parámetros polifenólicos de los vinos, antocianos totales, taninos condensados, IPT y los parámetros relacionados con la calidad de los taninos (I. DMACH, I. Etanol y I. PVPP). Al contrario que en los ensayos de la variedad Merlot, los ensayos realizados únicamente con la levadura *Saccharomyces* 22H, corresponden a la menor concentración de taninos condensados e IPT, que puede estar más relacionado con la materia prima del ensayo que con la levadura. Ya se comentó que dicho ensayo había dado lugar a los vinos con menos concentración de antocianos. La levadura *No Saccharomyces* que más contribuye a la polimerización de los taninos entre sí (bajos valores de I. DMACH) y a la unión de los taninos con polisacáridos es la 58E/22H, lo cual resulta muy interesante para mantener la estructura de los vinos con menores valores de astringencia. Sin embargo, en la que se observa una mejor estabilidad del color es en la combinación 42D/22H.

6. CONCLUSIONES

Una vez terminado el análisis de todos los parámetros en los distintos vinos, podemos establecer diferentes conclusiones sobre los efectos de la coinoculación de levaduras *No Saccharomyces* con *Saccharomyces* sobre la composición convencional y polifenólica de los vinos tintos de Merlot, Garnacha y Cabernet Sauvignon:

1. Las cepas de levadura ensayadas 22H, 49C-22H, 42D-22H y 58E-22H concluyen la fermentación completamente en las variedades de Merlot y Garnacha a buen ritmo,

mientras que en Cabernet cuesta más, debido a que presentaba un mayor grado de madurez que las otras, y por tanto una mayor concentración de azúcares.

2. La levadura 22H no sería una levadura apta para vinificar en años muy calurosos. Es de destacar la mayor velocidad fermentativa de las combinaciones 42D-22H y 49C-22H con respecto a la combinación 58E-22H.
3. Las cepas de levadura *No Saccharomyces* combinadas con *Saccharomyces* 22H no perjudican la calidad de los vinos obtenidos. Hay que destacar su buen comportamiento enológico y su buena adecuación para la elaboración de vinos.
4. Las cepas 58E, cuyo perfil se corresponde con *Torulospora delbrueckii*, es la que mejor resultados ha obtenido para los vinos Merlot. A diferencia de las otras cepas, presenta mayor color y con una mayor estabilidad. Podrá realizar una óptima conservación, gracias a su concentración fenólica y un óptimo estado de polimerización. Así que es la cepa mejor posicionada para intervenir en el cultivo secuencial mixto *No Saccharomyces – Saccharomyces* 22H de los vinos de la variedad Merlot.
5. Las cepas 42D, que corresponde a *Hanseniaspora uvarum*, y 58E, que corresponde con *Torulospora delbrueckii*, son las que presentan mejores condiciones de fermentación en los vinos de la variedad Garnacha y Cabernet Sauvignon.

7. BIBLIOGRAFÍA

Johnson, H. (2005). Historia del vino. Barcelona: Blume, pp. 89-120.

Castillo, J.S.; COMPÉS, R. (2014). La economía del vino en España y en el mundo. Ed. Cajamar Caja Rural 737 pp.

DEL REY, R (2011). La distribución del vino en España. Distribución y consumo. P 60-68.

TORIJA MARTÍNEZ, M^a. J. (2002). Ecología de levaduras: Selección y adaptación a fermentaciones vínicas, Tesis doctoral en Bioquímica. Universidad Rovira i Virgili. 260 pp.

BERMEJO FUIDIO, E. (2013-2014). Efecto de la inoculación con levaduras secas activas en la elaboración de vinos con distintas variedades de uva tinta, Trabajo fin de Grado. Universidad de la Rioja. 44 pp.

FLANZY, C. (2003). Enología: fundamentos científicos y tecnológicos. Segunda edición. A. Madrid Vicente Ediciones. 797 pp.

GONZÁLEZ, R; BARCENILLA, J.M.; TABERA, L. (2007). Cepas vínicas de *S. cerevisiae* con bajo rendimiento en etanol. Instituto de Fermentaciones Industriales, CSIC. ACE Revista de Enología.

TIAGO, V.; LOUREIRO-DIAS, M; LOUREIRO, V; PRISTA, C. (2012). Homeostasis of *Saccharomyces cerevisiae* during the Late Satges of Wine Fermentation. Applied and Enronmental Microbiology 2012.

CIANI, M.; COMITINI, F.; MORALES, P.; TRONCHONI, J.; CANONICO, L.; CURIEL, J.A.; ORO, L.; RODRIGUES, A.J.; GONZALES, R (2016). Non-conventional yeast species for lowering etanol content of wines. Front. Microbiol. 7.

PEIDRO MONTANER, M^a. J. (2015). Estudio de la composición de vinos de tempranillo y Cabernet Sauvignon fermentados y conservados en hormigón, acero inoxidable y barricas, Tesis doctoral en Enología. Universidad Politècnica de Valencia 274 pp.

CASP, A.; ABRIL, I. (1999). Los compuestos fenólicos del vino. Alimentación, Equipos y Tecnología, 97-103.

GUTIÉRREZ, I.H.; GARCÍA-ROMERO, E.; DE CALATRAVA, R. (2004). Antociano de variedades tintas cultivadas en La Mancha; perfiles varietales característicos de la uva y de los vinos monovarietales y evolución durante la maduración de la baya. Alimentaria, 127-140 pp.

MONAGAS, M.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B. (2007). Evaluation of different *Saccharomyces cerevisiae* strains for red winemaking. Influence on the anthocyanin, pyranoanthocyanin and non-anthocyanin phenolic content and color characteristics of wines. Food chemistry, vol. 104, nº 2, 814-823 pp.

RINALDI, A.; BLAIOTTA, G.; APONTE, M.; MOIO, L. (2016). Effect of yeast strain and some nutritional factor son tannin composition and potential astringency of model wines. Food microbiolgy, 53, 128-134 pp.

ZAMORA, F. (2013). Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos. Editorial Mundi-Prensa. Madrid. 225 pp.

GLORIES, Y. (1978). Reserches sur la matière colorante des vins rouges. Thèse a L'Université de Bordeaux II.

ATANASOVA, V.; FULCRAND, H.; LE GUERNEVÉ, C.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M. (2002). Structure of a new dimeric acetaldehyde malvidin 3-glucoside condensation product. Tetrahedron Letters, 43:6151-6153.

VITIVINICULTURA, 2012. Uvas de vino tintas: Variedad de Vid: Merlot. <http://www.vitivinicultura.net/uvas-de-vino-tintas-merlot.html>

EL PAÍS, 2015. La Garnacha: de Aragón al mundo. http://elpais.com/elpais/2015/04/09/estilo/1428601995_058633.html

COCINEANDO, Cabernet Sauvignon, Características de sus uvas y de sus vinos. <http://www.cocineando.com/ZONA%20VINOS/tipos-de-vinos/uvas/cabernet-sauvignon.html>