



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

IMPACTO DE LA COINOCULACIÓN DE LEVADURAS Y BACTERIAS LÁCTICAS Y EL APORTE DE NITROGENO EN EL PERFIL AROMÁTICO DEL VINO

TRABAJO FINAL DE MÁSTER EN ENOLOGÍA

ALUMNO:
JESÚS NAVARRO FONTCUBERTA

TUTORA:
M^a JOSÉ GARCÍA ESPARZA

Curso académico: 2020-2021

Valencia, julio de 2021

IMPACTO DE LA COINOCULACIÓN DE LEVADURAS Y BACTERIAS LÁCTICAS Y EL APORTE DE NITROGENO EN EL PERFIL AROMÁTICO DEL VINO

Resumen:

El trabajo se centra en el estudio de los efectos sobre la composición aromática del vino de la realización de la fermentación maloláctica mediante la técnica de co-inoculación. Para ello, se ha utilizado una levadura *saccharomyces cerevisiae* y tres bacterias lácticas, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus plantarum*. Además, se ha ensayado el aporte de nitrógeno al mosto con el objetivo de ver cómo afecta al perfil aromático del vino elaborado, ya que son varios los estudios que destacan un impacto en las características aromáticas del vino final.

Se han realizado diferentes microvinificaciones a partir de uva de la variedad Macabeo y se han elaborado vinos base para cava. La siembra de las bacterias lácticas se ha realizado de forma secuencial (una vez concluida la fermentación alcohólica) y mediante co-inoculación, (24 horas después de la siembra de las levaduras), dejando un testigo sin realización de fermentación maloláctica.

Se han analizado los compuestos volátiles de todos los vinos elaborados mediante cromatografía de gases. Los datos obtenidos se trabajan con tratamiento estadístico con un análisis de varianza (ANOVA) de cada compuesto aromático por cada factor; además de un PCA para buscar las diferencias entre bacterias lácticas, momento de inoculación y nutrición con nitrógeno

Los resultados ponen de manifiesto las diferencias en el perfil aromático de los vinos debido a la FML, por el aumento de la concentración de ésteres. También el momento de inoculación, la bacteria y el nitrógeno afectan significativamente a las concentraciones de los diferentes compuestos. Los alcoholes, aumentan con la inoculación secuencial, los aldehídos mediante la inoculación secuencial con nitrógeno y los ácidos con los aportes de nitrógeno.

Palabras clave: co-inoculación, composición aromática, fermentación maloláctica, bacterias lácticas, nitrógeno.

IMPACT OF THE COINOCULATION OF YEAST AND LACTIC BACTERIA AND THE CONTRIBUTION OF NITROGEN IN THE AROMATIC PROFILE OF WINE

Abstract:

The work focuses on the study of the effects on the aromatic composition of the wine of the performance of the malolactic fermentation by means of the co-inoculation technique. For this, a *saccharomyces cerevisiae* yeast and three lactic bacteria, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*, have been used. In addition, the nitrogen contribution to the must has been tested in order to see how it affects the aromatic profile of the wine made, since there are several studies that highlight an impact on the aromatic characteristics of the final wine.

Different microvinifications have been carried out from grapes of the Macabeo variety and base wines have been made for cava. The lactic acid bacteria were planted sequentially (once the alcoholic fermentation had been completed) and by co-inoculation (24 hours after the yeast seeding), leaving a control without malolactic fermentation.

The volatile compounds of all the wines made have been analyzed by gas chromatography. The data obtained are worked with statistical treatment with an analysis of variance (ANOVA) of each aromatic compound for each factor; in addition to a PCA to look for the differences between lactic bacteria, inoculation moment and nitrogen nutrition

The results show the differences in the aromatic profile of the wines due to MLF, due to the increase in the concentration of esters. Also the moment of inoculation, bacteria and nitrogen significantly affect the concentrations of the different compounds. Alcohols increase with sequential inoculation, aldehydes through sequential inoculation with nitrogen, and acids with nitrogen contributions.

Key words: co-inoculation, aromatic composition, malolactic fermentation, lactic acid bacteria, nitrogen.

IMPACTE DE LA *COINOCULACIÓN DE LLEVATS I BACTERIS LÀCTICS I L'APORTACIÓ DE NITROGEN EN EL PERFIL AROMÀTIC DEL VI

Resum:

El treball se centra en l'estudi dels efectes sobre la composició aromàtica del vi de la realització de la fermentació malolàctica mitjançant la tècnica de co-inoculació. Per a això, s'ha utilitzat un llevat *saccharomyces cerevisiae* i tres bacteris làctics, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus casei* i *Lactobacillus plantarum*. A més, s'ha assajat l'aportació de nitrogen al most amb l'objectiu de veure com afecta al perfil aromàtic del vi elaborat, ja que són diversos els estudis que destaquen un impacte en les característiques aromàtiques del vi final.

S'han realitzat diferents microvinificacions a partir de raïm de la varietat Macabeu i s'han elaborat vins base per a cava. La sembra dels bacteris làctics s'ha realitzat de manera seqüencial (una vegada conclosa la fermentació alcohòlica) i mitjançant co-inoculació, (24 hores després de la sembra dels llevats), deixant un testimoni sense realització de fermentació malolàctica.

S'han analitzat els compostos volàtils de tots els vins elaborats mitjançant cromatografia de gasos. Les dades obtingudes es treballen amb tractament estadístic amb una anàlisi de variància (ANOVA) de cada compost aromàtic per cada factor; a més d'un PCA per a buscar les diferències entre bacteris làctics, moment d'inoculació i nutrició amb nitrogen

Els resultats posen de manifest les diferències en el perfil aromàtic dels vins a causa de la FML, per l'augment de la concentració d'esteres. També el moment d'inoculació, el bacteri i el nitrogen afecten significativament les concentracions dels diferents compostos. Els alcohols, augmenten amb la inoculació seqüencial, els aldehids mitjançant la inoculació seqüencial amb nitrogen i els àcids amb les aportacions de nitrogen.

Paraules clau: co-inoculació, composició aromàtica, fermentació malolàctica, bacteris làctics, nitrogen.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. AROMAS DEL VINO	2
1.1.1 Aroma fermentativo.....	2
1.2. CO-INOCULACIÓN.....	3
1.3. NUTRICIÓN CON NITRÓGENO	5
1.3.2 Influencia del nitrógeno en la fermentación. Efecto sobre la composición volátil del vino	6
2. OBJETIVOS	7
3. MATERIALES Y METODOS	8
3.1 Elaboración de los vinos base Macabeo	8
3.2 Análisis de los compuestos volátiles.....	12
3.3 Tratamiento estadístico	13
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
4.2 Efecto de la cepa de bacteria láctica, momento de inoculación y nutrición con nitrógeno sobre el perfil aromático del vino base de Macabeo	16
<i>Alcoholes</i>	16
<i>Ácidos</i>	18
<i>Ésteres</i>	20
<i>Aldehídos</i>	21
<i>Lactonas</i>	22
4.3 Análisis de componentes principales (PCA)	23
CONCLUSIONES	27
BIBLIOGRAFIA	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Nomenclatura y descripción de los distintos ensayos realizados.....	9
Tabla 2. Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos volátiles (mg/L) de los vinos elaborados con y sin fermentación maloláctica. (**nivel significación $P \leq 0,05$. ***nivel significación $P \leq 0,01$).	15
Tabla 3 Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos volátiles (mg/L) de los vinos elaborados. Efecto de la bacteria láctica utilizada para la realización de la FML, de la co-inoculación frente a la inoculación secuencial, y de la nutrición con nitrógeno. **nivel significación $P \leq 0,05$. ***nivel significación $P \leq 0,01$. Bacterias lácticas: DV16A, (Oenococcus oeni), DV7D (Lactobacillus casei),.....	17

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Balance químico de la fermentación alcohólica.....	1
Fig. 2 Balance químico de la fermentación maloláctica.....	1
Fig. 3 Etapas del proceso de preparación de los inóculos de las cepas ensayadas destinado a la siembra de depósitos de 40 L.....	9
Fig. 4 Esquema de la inoculación secuencial de bacterias que se realizó en las botellas procedentes de la lechera control de Macabeo (no inoculada previamente con bacterias lácticas) tras finalizar la fermentación alcohólica.....	10
Fig. 5 Esquema de trabajo en bodega de las pruebas piloto en lecheras.....	11
Fig. 6 Efecto de la fermentación maloláctica sobre la concentración de ácidos, alcoholes, aldehídos y ésteres en los vinos elaborados (mg/L).	11
Fig. 7 Efecto de la bacteria láctica utilizada para la realización de la FML, de la co-inoculación frente a la inoculación secuencial, y de la nutrición con nitrógeno sobre el contenido de alcoholes en los vinos.....	17
Fig. 8 Efecto de la bacteria láctica utilizada para la realización de la FML, de la co-ésteres contenido de ácidos en los vinos.	18
Fig. 9 Efecto de la bacteria láctica utilizada para la realización de la FML, de la co-inoculación frente a la inoculación secuencial, y de la nutrición con nitrógeno sobre el contenido de ésteres en los vinos.	19
Fig. 10 Efecto de la bacteria láctica utilizada para la realización de la FML, de la co-inoculación frente a la inoculación secuencial, y de la nutrición con nitrógeno sobre el contenido de aldehídos en los vinos.....	20
Fig. 11 Análisis de Componentes principales (Componente 1 frente a 2) realizado sobre los compuestos volátiles identificados en los vinos elaborados con y sin FML. a) gráfico de puntuaciones (scores), b) gráfico de cargas (loadings).....	24
Fig. 12 Análisis de Componentes principales (Componente 1 frente a 2) realizado sobre los compuestos volátiles identificados en los vinos elaborados con las bacterias lácticas Oenococcus oeni, (DV16A) y Lactobacillus casei, (DV7D). a) gráfico de puntuaciones	25
Fig. 13 Análisis de Componentes principales (Componente 1 frente a 2) realizado sobre los compuestos volátiles identificados en los vinos elaborados con inoculación secuencial y co-inoculación para la realización de la FML. a) gráfico de puntuaciones (scores),.....	26

1. INTRODUCCIÓN

El cava es un vino espumoso natural de calidad obtenido a partir de la segunda fermentación de un vino base y al que se le han añadido azúcares y levaduras.

La variedad de uva, las levaduras responsables de llevar a cabo la primera y segunda fermentación y el tiempo de envejecimiento son algunos de los factores que más influyen en el perfil aromático del cava (Bosch-Fusté et al., 2007).

La evolución constante en el mundo del vino exige al mercado cada vez más calidad, por ello el sector busca continuamente mejorar la calidad de la uva y del vino, con el estudio de la conservación, la distribución y sobre todo del proceso de elaboración.

Uno de los factores que más afecta a la calidad del vino es el perfil aromático (Englezos et al., 2018), por ello cada vez más bodegas ofrecen al mercado vinos con mayor complejidad y perfiles aromáticos más atractivos para el consumidor (Luan et al., 2018).

En la elaboración de vino la fermentación es el proceso clave (Varela, 2016), esta fermentación implica la transformación biológica del producto. Durante la elaboración del vino se producen dos fermentaciones, la más conocida y que se da en todos los vinos es la fermentación alcohólica, que consiste en la transformación del azúcar de las uvas en alcohol y dióxido de carbono, además de una serie de compuestos volátiles producto del metabolismo de las levaduras.

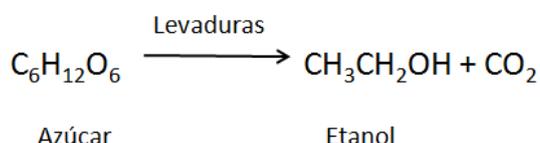


Fig. 1 Balance químico de la fermentación alcohólica

La segunda fermentación es la fermentación maloláctica (FML) que consiste en la degradación del ácido málico en ácido láctico, debido a la acción de las bacterias lácticas.

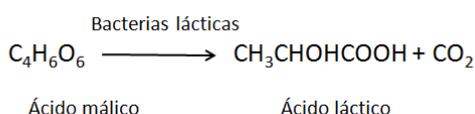


Fig. 2 Balance químico de la fermentación maloláctica.

La descarboxilación enzimática del ácido L-málico a ácido L-láctico implica una disminución de la acidez final del vino. Esta segunda fermentación tiene un impacto en el perfil organoléptico del vino (Englezos et al., 2018; Padilla et al., 2016; Swiegers et al., 2007). Algunos estudios aseguran que no solo cambia el perfil organoléptico, sino que implica una mejora en la calidad del vino (Ribéreau-Gayon et al., 1999) aportándole mayor untuosidad y volumen en boca.

En el caso del vino tinto, esta transformación puede ser beneficiosa para la calidad final del vino, pero en los vinos blancos, en especial los espumosos, la acidez es beneficiosa para la calidad organoléptica del vino. Sin embargo, en cava se suele realizar la fermentación maloláctica para evitar el riesgo de que esta fermentación se lleve a cabo tras el tiraje del vino, en la propia botella, provocando así problemas mayores de turbidez y acidez.

La fermentación maloláctica se realiza comúnmente después de la fermentación alcohólica, esta fermentación puede producirse de manera espontánea por acción de las bacterias presentes inicialmente en la uva, o por inoculación de un cultivo iniciador (Nielsen et al., 1996). La fermentación maloláctica en ocasiones puede generar problemas y compuestos no deseados en el vino, por ello la inoculación de un cultivo de bacterias lácticas seleccionadas puede mejorar su viabilidad y su control.

1.1. Aromas del vino

La calidad final del vino viene muy determinada por el aroma (Englezos et al., 2018), y depende de factores como la variedad de la uva, el clima, el suelo, los métodos de producción y otras muchas variables (Swiegers et al., 2008), como los microorganismos que realizan las fermentaciones (Luan et al., 2018).

Los aromas de los vinos se pueden clasificar en tres tipos, atendiendo al momento de su formación, y a su evolución en la uva y en el vino elaborado.

Aromas primarios, son los relacionados con la variedad de uva, son característicos y dependen del clima, suelo, zona, riego y todo el conjunto de prácticas culturales. Suelen ser aromas frutales, vegetales y florales.

Los aromas secundarios o fermentativos corresponden a los que se forman tras los procesos de la fermentación alcohólica y maloláctica.

Por último, **los aromas terciarios**, o también conocidos como “bouquet”, son los que se desarrollan durante la crianza del vino en la bodega y en su posterior maduración en botella. Son aromas muy complejos, y dependen de la bodega y de las condiciones de conservación

1.1.1 Aroma fermentativo

Los aromas secundarios aparecen durante las fermentaciones del mosto, por ello los aromas vienen muy determinados por las condiciones de la fermentación, la levadura, la temperatura de fermentación, la nutrición, la bacteria láctica, etc. (Santos, 2016).

Los compuestos volátiles que constituyen el aroma del vino son esencialmente, ácidos orgánicos, alcoholes superiores, ésteres y aldehídos.

Los compuestos volátiles se clasifican en función de su umbral de percepción, encontrando 2 grupos, los activos, aquellos que por su concentración habitual se suelen percibir en el vino, y los inactivos que no es posible percibir organolépticamente (Montalvá, 2017).

El grupo más relevante es el de los **alcoholes superiores**, ya que son los precursores de los ésteres. En bajas concentraciones los alcoholes proporcionan al vino complejidad

aromática, pero en concentraciones elevadas, enmascaran los aromas de los ésteres afectando negativamente a la calidad final del vino.

Además, los alcoholes superiores se consideran aromas desagradables, a excepción del 2-feniletanol, que es el alcohol aromático más significativo. Las cantidades en las que se encuentran estos alcoholes superiores no excede el umbral de percepción (Gamero *et al*, 2011).

Aunque los ácidos no afectan directamente al perfil aromático del vino, si tienen especial relevancia en la esterificación de los alcoholes. Siendo importante su presencia para mejorar la calidad aromática final. Los **ácidos** son desagradables en elevadas concentraciones, pero al igual que los alcoholes, estos no tienden a superar los umbrales de percepción (Alarcón *et al*, 2016).

Los **ésteres** que se encuentran en los vinos son variados y aportan aromas frescos y afrutados (Ivit *et al.*, 2018), contribuyendo de manera positiva al perfil aromático del vino, sin embargo, no se encuentran en concentraciones muy abundantes. Se pueden dividir en 2 tipos, ésteres de acetato y ésteres etílicos.

Los ésteres de acetato más abundantes son el acetato de etilo, que en grandes cantidades aporta aromas desagradables (disolvente) pero en concentraciones moderadas aporta aromas frutales, el acetato de isoamilo que aporta olor a plátano y que si se presenta en el vino con concentraciones altas tiende a enmascarar el resto de los aromas y el 2-feniletacetato que aporta aromas de flores.

Los ésteres etílicos están compuestos por etanol y un grupo acilo, dos ejemplos de ello son el octanoato y el hexanoato de etilo, que aportan aromas frutales (Alarcón, 2016)

Finalmente, los **aldehídos** confieren al vino olores propios de la manzana o incluso a frutos secos, en función de la estructura química. El más común es el acetaldehído llegando a ser un 90% del total de los aldehídos en el vino (Alarcón *et al*, 2016)

1.2. Co-inoculación

La técnica de inoculación de las bacterias lácticas se diferencia por el momento en el que se realiza en el mosto o vino. Existen dos alternativas, la inoculación tradicional o secuencial, que consiste en inocular las levaduras y las bacterias lácticas por separado, o la inoculación simultánea o co-inoculación en la que se siembran las levaduras y las bacterias juntas inicialmente en el mosto.

La técnica de co-inoculación tiene algunos beneficios claros, uno de ellos y el más diferencial es la mejor adaptación de las bacterias lácticas al medio (Jussier *et al.* 2006; Zapparoli y col. 2009). Por ello puede ser una alternativa en los casos en que se produce una inhibición de las bacterias lácticas como consecuencia de las altas concentraciones de etanol y por la falta de nutrientes en el medio (por ejemplo, aminoácidos esenciales, vitaminas o minerales) (Jussier *et al.* 2006; Zapparoli y col. 2009), ya que cuando se realiza una siembra de bacterias lácticas secuencial, después de la fermentación alcohólica, el medio es rico en etanol y pobre en nutrientes debido al desarrollo de las levaduras.

Otra de las ventajas de la co-inoculación, es el tiempo de elaboración, ya que se logran ambas fermentaciones en un menor tiempo (Rosi *et al.*, 2006; Jussier *et al.*, 2006) y el vino está

terminado antes para los posteriores tratamientos, trasiegos, filtraciones, etc. La reducción del tiempo de elaboración también tiene la ventaja de limitar el tiempo de exposición a microorganismos perjudiciales como *Bretanomyces* (Curtin et al., 2007), aumentando la estabilidad microbiológica del vino durante la vinificación (Jussier et al. 2006).

Además, se reduce el uso de la termorregulación en los tanques, disminuyendo los costos energéticos para la bodega, pues como se realizan las fermentaciones de manera simultánea el vino está preparado para las siguientes etapas con menor tiempo de elaboración evitando el uso de frío para controlar la FML.

Pese a todas las ventajas mencionadas, la técnica de co-inoculación no está muy extendida, esto es debido al temor a que la calidad del vino final se vea empeorada, ya que existe riesgo de que las bacterias lácticas en un mosto rico en azúcar produzcan ácido acético (Edwards et al., 1999), ya que tienen un metabolismo heterofermentativo.

No obstante, diferentes estudios han demostrado que tras la finalización de la fermentación maloláctica mediante la técnica de co-inoculación, los vinos no presentaban niveles adversos de acidez volátil (Krieger y Arnink, 2003; Jussier et al., 2006).

Es por ello por lo que, en climas más cálidos donde la concentración de alcohol en los vinos es superior, y existe riesgo de inhibición de las bacterias lácticas, es muy recomendable el uso de esta técnica de co-inoculación (Zapparoli et al., 2009).

1.2.1 Efecto de la co-inoculación sobre la composición volátil del vino

La fermentación mixta se ha convertido en un modo de producción comúnmente aceptado (Johnson, 2013), sin embargo, existen pocos estudios que se centren en la relación entre la co-inoculación y el perfil aromático del vino final.

Se demostró recientemente en dos trabajos, que la co-inoculación podía influir en la concentración de 30 compuestos aromáticos (Abrahamse & Bartowsky, 2011; Loma et al., 2011). Sin embargo, en este estudio los ensayos se realizaron a nivel de laboratorio, las fermentaciones se llevaron a cabo en envases de 1 o 2 litros, lo cual difiere de las condiciones reales que se dan en una bodega.

En estudios realizados por Massera et al. (2009), no se encontraron diferencias significativas en el perfil aromático del vino elaborado mediante la técnica de co-inoculación frente a la tradicional. La falta de diferencias significativas en el perfil aromático de los vinos pudo ser debido a que las elaboraciones se realizaron mediante microvinificaciones, además de las pocas combinaciones levadura-bacteria que se ensayaron.

Otros estudios mostraron que la realización de la fermentación maloláctica en los vinos mediante la técnica de co-inoculación, producía una disminución del compuesto volátil diacetil, y esto pudo ser debido a la presencia de levaduras activas durante la fermentación maloláctica (Krieger & Arnink, 2003). Esto provocaría que, en estos vinos, las notas lácticas serían menos patentes desde el punto de vista organoléptico.

En un estudio más reciente se determinó que la composición de ésteres de los vinos se ve disminuida con la co-inoculación de levaduras y bacterias, sin embargo, se producía un aumento de los aldehídos del vino (Liu et al., 2021). Los alcoholes y los ácidos no presentaron diferencias significativas entre la inoculación secuencial y la co-inoculación (Liu et al., 2021).

1.3. Nutrición con nitrógeno

Las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* pueden asimilar nitrógeno de diferentes fuentes, amonio, urea, alantoína o aminoácidos (Cooper et al, 1982). La concentración de nitrógeno total presente en el mosto se encuentra en cantidades muy variables, desde 60 mg/L a 2400 mg/L dependiendo de la variedad, las técnicas de cultivo, el clima y el suelo.

Los compuestos nitrogenados del mosto que predominan son la prolina, la arginina, el glutamato, la glutamina, la serina y la treonina (Boulton et al., 1996). La prolina junto con la arginina supone el 30-65% del contenido de aminoácidos (Pretorius, 2000).

El nitrógeno asimilable es uno de los factores que más afectan en las primeras etapas de crecimiento de las levaduras, aunque también intervienen factores como el pH, la concentración de etanol, la temperatura, el dióxido de carbono y la cantidad de oxígeno en el mosto (Henschke et al, 1993).

El amoniaco es la fuente de nitrógeno preferida por las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación, puesto que es de fácil asimilación (Bisson et al, 1991). Aunque el orden de utilización también varía en función de las cantidades presentes de las diferentes fuentes de nitrógeno en el medio.

1.3.1 Fermentaciones atascadas

En la vinificación, los factores externos influyen de manera muy significativa en la elaboración y en la calidad del vino obtenido. En el caso de la fermentación alcohólica, el mayor peligro es una parada de la fermentación, pues supone un mayor riesgo de inestabilidad microbiana por la presencia de azúcar en cantidades elevadas; ya que estos vinos son susceptibles de ataques por parte de otros microorganismos. También están más expuestos a la oxidación, ya que, al parar la fermentación de las levaduras, se genera menos dióxido de carbono que proteja al vino durante esta etapa de la elaboración.

Las paradas de fermentación se dan cuando las levaduras no pueden continuar asimilando el azúcar y cesan su actividad metabólica, dejando un azúcar residual superior a los 2g/L para vinos secos. Las fermentaciones lentas son aquellas en la que la fermentación no se da en el tiempo razonable, teniendo una tasa de consumo por las levaduras muy baja. Estas fermentaciones lentas, sin ser tan preocupantes como una parada, suponen un riesgo para la bodega y se le ha de prestar especial atención por las posibles pérdidas económicas que supone tener un vino fermentando más tiempo de lo habitual (Boulton et al., 1996).

Aunque hay numerosos estudios que investigan las causas de estas paradas fermentativas, siguen siendo un problema común en la vinificación.

Por lo general la uva ya contiene los nutrientes necesarios para vinificación. En la baya se encuentra el carbono y el nitrógeno que son importantes para el desarrollo de las levaduras, incluso las cantidades de carbono son superiores a las requeridas por la levadura. En cambio, el contenido en nitrógeno es muy variable y por ello es una práctica muy habitual la adición de nitrógeno al mosto en la bodega. Niveles bajos de nitrógeno generan fermentaciones lentas con bajas tasas de consumo de azúcar por parte de las levaduras (Mendes-Ferreira et al., 2004).

El crecimiento de las levaduras en función de la concentración de nitrógeno aumenta de forma logarítmica, siendo muy sensible con bajas cantidades de nitrógeno (menos de 300mg/L) y reduciendo su velocidad de crecimiento a altas cantidades de nitrógeno (Jiranek et al., 1990)

Inicialmente la velocidad de fermentación está muy ligada a la biomasa de levaduras presentes en el mosto, siendo este el factor más significativo para lograr arrancar la fermentación del mosto. Sin embargo, este factor pierde relevancia a medida que se suceden las diferentes etapas de la fermentación. En cambio, si hay una relación directa entre el contenido de azúcar, la velocidad y la duración de la fermentación y la cantidad de nitrógeno empleado por las levaduras. No obstante, la cantidad necesaria de nitrógeno que requiere la levadura no solo está influenciada por la cantidad de azúcar inicial sino también por la cepa de la levadura empleada (Jiranek et al., 1990)

1.3.2 Influencia del nitrógeno en la fermentación. Efecto sobre la composición volátil del vino

Uno de los momentos más críticos en la elaboración de un vino es la fermentación alcohólica. Son varios los factores que pueden dar lugar a problemas en la fermentación. Entre los diversos factores, la limitada cantidad de nitrógeno se ha asociado con fermentaciones lentas e incluso con la parada fermentativa. También pueden dar lugar a compuestos indeseados como el H₂S, entre otros, que dan lugar a aromas y gustos desagradables.

Muchos compuestos aromáticos excretados por las levaduras durante la fermentación son producidos directamente e influenciados por el metabolismo del nitrógeno, tales como alcoholes superiores, ésteres de acetato, ésteres etílicos y compuestos de azufre que participan en la complejidad organoléptica del vino (Gobert et al., 2017)

Concentraciones de nitrógeno moderadas dan como resultado vinos con una mayor concentración de alcohol, siendo inversamente proporcional cuando las cantidades de nitrógeno asimilable se encuentran en grandes cantidades (Carrau et al. 2008).

El nitrógeno tiene un papel importante en la velocidad de fermentación, disminuyendo el tiempo de fermentación para cantidades asimilables de nitrógeno a medida que se aumenta la adición de este (Torrea et al. 2011).

Los alcoholes superiores y ésteres etílicos disminuyen con un aumento de las concentraciones de nitrógeno (Torrea et al. 2011). Empero, se han dado casos en los que elevadas concentraciones de nitrógenos afectan de manera adversa a la producción de ésteres, ya que la variedad de la cepa y la composición química del mosto juegan un papel fundamental en las diferentes interacciones del nitrógeno con el vino (Jiménez-Martí et al. 2007). En el caso de los ésteres de acetato las concentraciones aumentan de manera proporcional al aumento de nitrógeno asimilable (Torrea et al. 2011).

2. OBJETIVOS

Cada día el mercado del vino es más exigente en la calidad, por ello, en su elaboración, se resaltan cada vez más, aspectos relacionados con técnicas de elaboración que logren una mayor calidad de los vinos.

El principal objetivo del presente trabajo es estudiar el efecto en el perfil aromático del vino, del momento de inoculación de las bacterias lácticas. Para ello se han utilizado diferentes cepas de bacterias lácticas y el aporte de nutrición en un vino base cava, elaborado a partir de uva Macabeo. Los objetivos específicos son:

1. Analizar el efecto de la realización de la FML sobre la composición volátil del vino
2. Evaluar el perfil aromático de los vinos blancos elaborados mediante las técnicas de inoculación secuencial y co-inoculación para la realización de la fermentación maloláctica
3. Determinar las diferencias en la composición volátil de los vinos en los que la FML se ha realizado con diferentes bacterias lácticas (*Lactobacillus plantarum* *oenococcus oeni* y *Lactobacillus casei*).
4. Estudiar el efecto del aporte de nitrógeno al mosto sobre los compuestos volátiles de los vinos una vez concluida la FML.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Elaboración de los vinos base Macabeo

Para la realización del estudio se utilizó mosto de la variedad Macabeo en la vendimia del año 2020. Las pruebas se realizaron a nivel semi-industrial en bodega en depósitos de acero inoxidable de 50L (lecheras). Todos los ensayos se realizaron por duplicado y se mantuvo un control sin inocular bacteria láctica. Todas las experiencias se realizaron en el laboratorio ENOLAB de la Universidad de Valencia.

Se realizaron diferentes ensayos para estudiar el comportamiento en bodega de las cepas de bacteria lácticas (BAL) seleccionadas, con el fin de comprobar su capacidad de sintetizar ácido láctico a partir de azúcares y desarrollar la fermentación maloláctica (FML) en mosto (para obtener vino base para cava) tras ser inoculadas 24 h después de la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* IOC 18-2007.

Las cepas de BAL ensayadas fueron DV1K (*L. plantarum*), DV7D (*L. casei*) y DV16A (*O. oeni*), que habían sido previamente adaptadas a 5 g/hL de SO₂ y que fueron inoculadas en mosto Macabeo. Para estudiar el efecto de la nutrición sobre el crecimiento y fermentación maloláctica, se añadió RedBoost y mixta de N₂ (orgánico e inorgánico) a la mitad de la FA en las lecheras.

Para el presente estudio se realizaron un total de 13 tratamientos diferentes que quedan reflejados en la Tabla 1. Con los duplicados se obtuvieron 29 botellas de vino para analizar.

En la tabla 1 se muestra la nomenclatura abreviada con la explicación de cada tratamiento en cada una de las muestras para este ensayo.

Tabla 1 Nomenclatura y descripción de los distintos ensayos realizados.

<i>O.oeni</i>	
DV16A	Coinoculación Sin nitrógeno
DV16A'	Coinoculación Sin nitrógeno
DV16A N	Coinoculación Con nitrógeno
DV16A N'	Coinoculación Con nitrógeno
<i>L.casei</i>	
DV1K	Coinoculación Sin nitrógeno
DV1K'	Coinoculación Sin nitrógeno
DV1K N	Coinoculación Con nitrógeno
DV1K N'	Coinoculación Con nitrógeno
<i>L.casei</i>	
DV7D	Coinoculación Sin nitrógeno
DV7D'	Coinoculación Sin nitrógeno
DV7D N	Coinoculación Con nitrógeno
DV7D N'	Coinoculación Con nitrógeno
Controles Sin FLM	
Control DV16A	Secuencial sin nitrógeno
Control' DV16A	Secuencial sin nitrógeno
Control N DV16A	Secuencial con nitrógeno
Control N' DV16A	Secuencial con nitrógeno
Control DV7D	Secuencial sin nitrógeno
Control' DV7D	Secuencial sin nitrógeno
Control N DV7D	Secuencial con nitrógeno
Control N' DV7D	Secuencial con nitrógeno
Control DV1K	Secuencial sin nitrógeno
Control DV1K'	Secuencial sin nitrógeno
Control DV1K N	Secuencial con nitrógeno
Control DV1K N'	Secuencial con nitrógeno
Controles Sin FLM	
Control 1	Sin FML
Control 2	Sin FML
Control 3	Sin FML
Control4	Sin FML
Control 5	Sin FML

Para el seguimiento de la viabilidad, se tomaron muestras al inicio $t=0$, 24h, 48 h, 72 h y 7 días en todas las vinificaciones de las tres bacterias ensayadas. Se determinó la concentración de bacterias en cada uno de esos momentos mediante recuento de diluciones seriadas en medio de cultivo sólido MRS pH 6.5 para el caso de los *Lactobacillus* y MLO pH 4.8 para el caso del *O. oeni*. También se realizó un seguimiento de los parámetros fisicoquímicos mediante la técnica de HPLC.

3.1.1. Obtención de las colonias de bacterias lácticas

Para conseguir la biomasa adecuada para la inoculación de los 40 L de mosto, se realizó un escalado a partir de una colonia pura de cada bacteria. Se sembraron 100 mL de cultivo crecido en *O. oeni*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casei* en 9 mL de medio líquido AGB pH 3.5 y 3 g/hl de SO₂ y se llevaron a cabo sucesivos pases en volúmenes crecientes de dicho medio hasta alcanzar un volumen de 10L por cepa. Se incubó a temperatura ambiente durante 5 días y transcurrido este tiempo se realizó una siembra en placa para comprobar la pureza del cultivo y la concentración celular (UFC/mL) y se inoculó en las lecheras (bacterias con el caldo de cultivo sin centrifugar). En la Figura 3 se muestra un esquema del proceso de escalado.

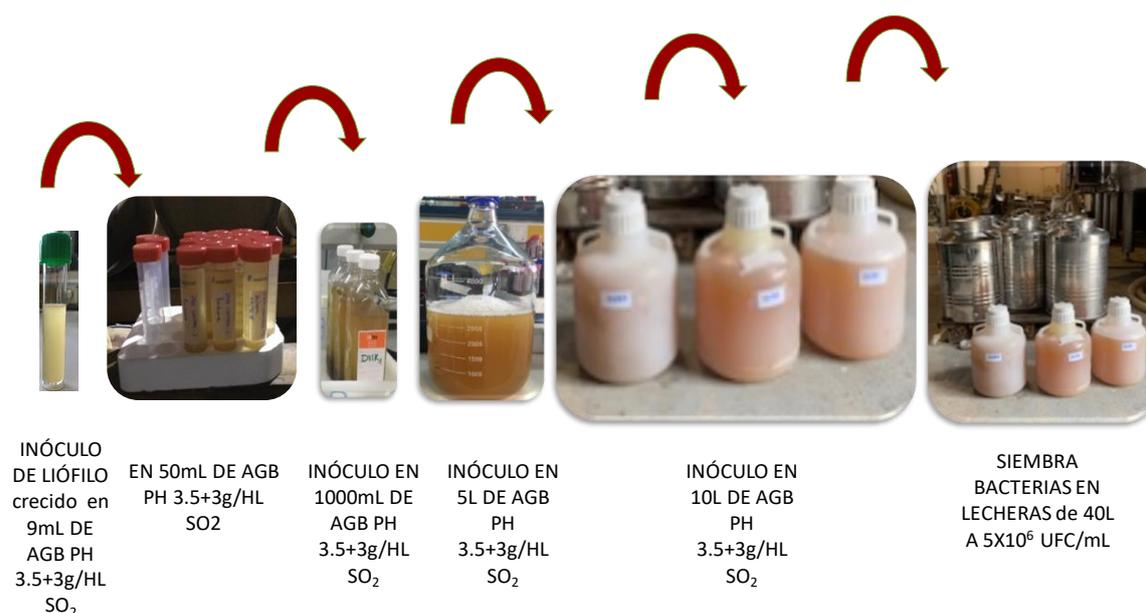


Fig. 3 Etapas del proceso de preparación de los inóculos de las cepas ensayadas destinado a la siembra de depósitos de 40 L.

Las bacterias lácticas se inocularon en los depósitos de mosto 24h. después de la inoculación de las levaduras.

3.1.2 Inoculación de la levadura

Al mosto de los depósitos objeto de estudio, se les añadió una dosis de 2 g/hL de SO₂ y la levadura (IOC 18-2007) se rehidrató e inoculó en el mismo según el protocolo implementado en la bodega.

3.1.2. Obtención de los controles con FML

Una vez finalizada la FA del depósito control de Macabeo, inoculada únicamente con la levadura IOC 18-2007, se procedió a la distribución en botellas de vino para ser inoculadas posteriormente en el laboratorio con bacterias lácticas.

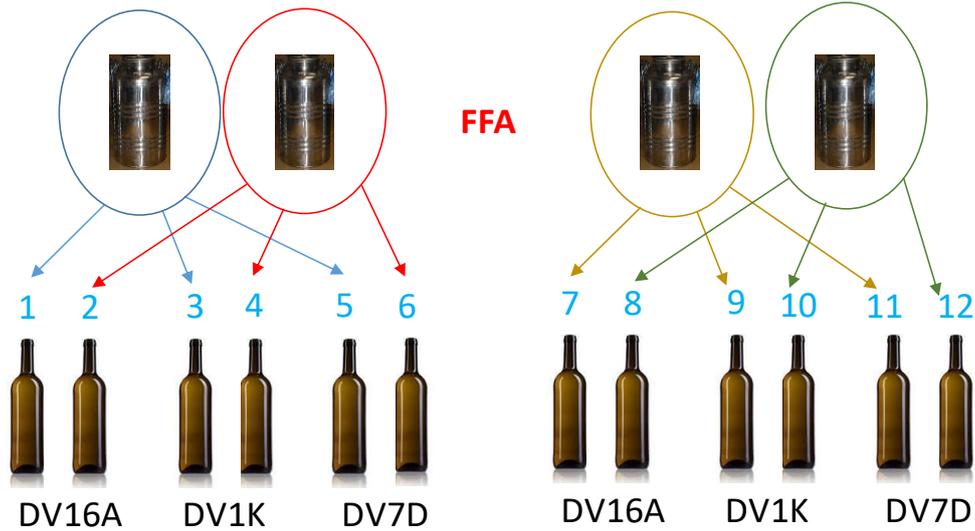
Las cepas ensayadas fueron DV1K (*L. plantarum*), DV7D (*L. casei*) y DV16A (*O. oeni*). Cada microorganismo se sembró en 10 mL de AGB pH 3.5 + 3 g/hL SO₂. Una vez crecidos, se

pasaron a 200 mL de medio de cultivo AGB pH 3.5 y se incubaron a 28°C. Transcurridos 4-5 días se realizó una siembra en placa para comprobar pureza y biomasa. Los 200 mL del cultivo de cada una de las bacterias en AGB se centrifugaron, se recogieron las células del sedimento y se re suspendieron en el vino correspondiente a una concentración de 2×10^8 ufc/mL

CONTROL

CON NUTRICIÓN (N) :0,2g/hL RB +30g/hL MIXTA DE N₂ A ¼ FA

SIN NUTRICIÓN: NINGUNA ADICIÓN DE N₂



1	CONTROL DV16A	CONTROL SIN NUTRICIÓN INOCULADO CON DV16A TRAS FA
2	CONTROL' DV16A	CONTROL SIN NUTRICIÓN INOCULADO CON DV16A TRAS FA
3	CONTROL DV1K	CONTROL SIN NUTRICIÓN INOCULADO CON DV1K TRAS FA
4	CONTROL' DV1K	CONTROL SIN NUTRICIÓN INOCULADO CON DV1K TRAS FA
5	CONTROL DV7D	CONTROL SIN NUTRICIÓN INOCULADO CON DV7D TRAS FA
6	CONTROL' DV7D	CONTROL SIN NUTRICIÓN INOCULADO CON DV7D TRAS FA
7	CONTROL N DV16A	CONTROL CON NUTRICIÓN INOCULADO CON DV16A TRAS FA
8	CONTROL N' DV16A	CONTROL CON NUTRICIÓN INOCULADO CON DV16A TRAS FA
9	CONTROL N DV1K	CONTROL CON NUTRICIÓN INOCULADO CON DV1K TRAS FA
10	CONTROL N' DV1K	CONTROL CON NUTRICIÓN INOCULADO CON DV1K TRAS FA
11	CONTROL N DV7D	CONTROL CON NUTRICIÓN INOCULADO CON DV7D TRAS FA
12	CONTROL N' DV7D	CONTROL CON NUTRICIÓN INOCULADO CON DV7D TRAS FA

DV16A: OENOCOCCUS OENI

DV7D: LACTOBACILLUS CASEI

DV1K: LACTOBACILLUS PLANTARUM

Fig. 4 Esquema de la inoculación secuencial de bacterias que se realizó en las botellas procedentes de la lechera control de Macabeo (no inoculada previamente con bacterias lácticas) tras finalizar la fermentación alcohólica.

3.1.3 Nutrición

A aquellos depósitos en los que se iba a estudiar el efecto de la nutrición sobre las bacterias inoculadas se les añadió 0.2 g/hL de RedBoost (Lallemand). A $\frac{3}{4}$ de la fermentación alcohólica se añadieron 30 g/hL de nutrición mixta de N (orgánico e inorgánico) para proveer de N a las levaduras en las lecheras con nutrición.

Toda la nutrición (RedBoost y mixta) se añadió exclusivamente a los depósitos con la nomenclatura de nutrición. En el resto no se añadió ningún suplemento nitrogenado.

En la Figura 5 se muestra un esquema simplificado del ensayo realizado en bodega.



Fig.5 Esquema de trabajo en bodega de las pruebas piloto en lecheras.

Una vez acabada la FA y la FML, se adicionaron 9 g/hL de SO_2 y se embotellaron todos los depósitos para posteriores análisis de cata y aromas.

3.2 Análisis de los compuestos volátiles

Para la determinación de los compuestos volátiles se empleó la metodología propuesta por Ortega et al. (2001), con las modificaciones especificadas por Hernández-Ortega y et al. (2014).

El protocolo a seguir para la preparación de muestras fue el siguiente:

En tubos de plástico de 15 mL se añaden:

- 4,05 gramos de sulfato de amonio

- 2,7 mL de vino (o cava) introducidos con pipeta
- 6,3 mL de agua miliQ (botella tapón rosa) con pipeta
- 0,25 mL de diclorometano con jeringuilla de plástico de 1 mL *
- 20 microlitros de patrón interno con jeringuilla de vidrio de 50

Las muestras se taparon con tapón de rosca y se cubrieron con Parafilm. A continuación, se depositaron en un baño termostático de agitación horizontal durante 2 horas, a 12°C y 75 rpm.

Tras este proceso, se introdujeron en una Centrífuga Himac CT6E VWR con capacidad para 24 tubos, durante 15 minutos a 40 rpm, para conseguir la separación entre la fase acuosa del vino y la fase apolar del diclorometano (disolvente), en la cual quedan disueltos los compuestos volátiles.

Para la separación de ambas fases, se extrajo el disolvente de debajo de la capa de sal mediante jeringuilla de vidrio de 1 mL, y se depositó en un vial de 2 mL con microinserto.

Se utilizó un cromatógrafo de gases HP-6890 dotado de detector de ionización de llama, equipado con una columna capilar HP-INNOWax (Crosslinked Polyethylene Glycol) de 60 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y H₂ como gas portador.

Las condiciones de trabajo fueron:

- Temperatura del inyector y detector de 270°C
- Relación Split de 1:25 (cantidad de muestra que se va a introducir en la columna)
- Flujo de hidrógeno de 40 mL/min
- Flujo de aire de 450 mL/min
- Presión de nitrógeno en cabeza de inyector de 15 p.s.

El procedimiento consiste en pinchar un patrón con concentraciones conocidas de los compuestos, y un patrón interno para posteriormente pinchar las muestras, de modo que, a partir de las áreas de los picos del cromatógrafo, se obtiene la concentración de cada compuesto volátil en mg/L.

3.3 Tratamiento estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA). Se calcularon las diferencias mínimas significativas (LSD) con un nivel de significación $P < 0.05$.

Se ha realizado un análisis de Componentes Principales (PCA) con el programa Simca-P de Umetrics V. 14.1.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras los resultados de seguimiento de viabilidad de las bacterias lácticas en el vino, se comprobó que la **bacteria DV1K** no logro imponerse, es por ello por lo que los resultados obtenidos en estos vinos no se han incluido en el trabajo.

Se han determinado un total de 25 compuestos volátiles en los vinos, agrupados en 5 familias: 5 ácidos, 5 alcoholes, 3 aldehídos, 11 ésteres y 1 lactona.

El perfil aromático de un vino es el resultado de la combinación e interacción entre los distintos grupos de compuestos aromáticos. Por lo que, para analizar mejor el efecto de las diferentes técnicas utilizadas para la elaboración de los vinos, se ha realizado el estudio atendiendo a las diferentes familias de compuestos volátiles, ya que como el aroma de los compuestos de un mismo grupo es igual o similar, el resultado es que en el vino puede percibirse la nota aromática característica de la familia. Asimismo, tienen gran influencia sobre el perfil aquellos compuestos volátiles que se encuentran por encima de su umbral de percepción y, por tanto, también se ha tenido en cuenta esta información.

4.1 Influencia de la Fermentación maloláctica en el perfil aromático del vino

En la Tabla 2 se muestran los resultados de los compuestos volátiles determinados en los vinos elaborados a partir de la variedad Macabeo con y sin fermentación maloláctica.

Se observa que la realización de la FML afecta significativamente a 9 de los compuestos volátiles estudiados pertenecientes a la familia de los alcoholes y de los ésteres. Sin embargo, la concentración de ácidos, aldehídos y lactonas no se ve afectada.

En la familia de los alcoholes, se observa que la concentración de 2-3 butanodiol (aroma a mantequilla) aumenta cuando los vinos han realizado la FML, sin embargo, la concentración de cis 3 hexenol (aroma herbáceo) disminuye.

Como muestra la Tabla 2, la FML afecta a la concentración de la mayoría de los ésteres estudiados, provocando un aumento de la concentración de acetato de isobutilo, hexanoato de etilo, acetato de hexilo, lactato de etilo, decanoato de etilo y succinato de etilo. Por el contrario, disminuye el octanoato de etilo. Resultados similares obtuvo Mendes et al. 2011; Ugliano et al, 2003; Pripis-Nicolau, 2004). Esto es importante para la calidad del vino ya que los ésteres son el grupo de compuestos volátiles más importante porque contribuye de forma positiva y significativa en el aroma frutal y floral de los vinos (Englezos et al., 2018; Luan et al., 2018). En cuanto a la formación de lactato de etilo durante la FML, este compuesto contribuye a la mejora de la sensación de volumen en boca del vino.

Si analizamos los resultados atendiendo a las diferentes familias de compuestos aromáticos (Figura 6), se pone de manifiesto que la FML produce un cambio en el perfil organoléptico de los vinos base elaborados con la variedad Macabeo, debido principalmente al aumento de la concentración de los ésteres. Este resultado coincide con el obtenido por Rollero et al, (2014).

Tabla 2. Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos volátiles (mg/L) de los vinos elaborados con y sin fermentación maloláctica. (**nivel significación P≤0,05. ***nivel significación P≤0,01)

Compuesto	Con FML	Sin FML	F-Ratio	Umbral percepción (mg/L)	Aroma descriptor
Alcoholes superiores	$\bar{x} \pm s$ (mg/l)	$\bar{x} \pm s$ (mg/l)			
1 butanol	0,05 ± 0,06	0,03 ± 0,00	0,31 ns	150,00	Mantequilla, Medicinal, Alcohol
alcohol isoamílico	0,23 ± 0,14	0,14 ± 0,02	2,24 ns	30,00	Alcohol, whiskey
cis 3 hexenol	0,09 ± 0,05	0,43 ± 0,14	21,37 ***	0,40	Herbáceo
1 heptanol	0,11 ± 0,04	0,15 ± 0,11	1,84 ns	1,00	Frutal, dulce
2-3 butanodiol	0,25 ± 0,13	0,07 ± 0,00	9,95 ***	120,00	Mantequilla
ácido isobutírico	0,77 ± 0,28	0,85 ± 0,14	0,35 ns	2,30	Rancio, queso
ácido butírico	0,37 ± 0,22	0,55 ± 0,07	3,37 ns	0,17	Rancio, queso
ácido isopentanoico	0,13 ± 0,15	0,09 ± 0,00	0,24 ns	15,00	queso, rancio
ácido octanoico	0,18 ± 0,16	0,39 ± 0,18	3,64 ns	0,50	Queso
ácido decanoico	0,12 ± 0,08	0,08 ± 0,06	1,10 ns	1,00	Rancio, queso
acetato de metilo	0,25 ± 0,11	0,22 ± 0,06	0,21 ns	0,18	fruta
acetato isobutilo	0,31 ± 0,07	0,18 ± 0,04	15,51 ***	No encontrado	Disolvente
etilisovalerato	0,06 ± 0,07	0,07 ± 0,06	0,12 ns	No encontrado	No encontrado
hexanoato etilo	0,50 ± 0,13	0,18 ± 0,07	27,05 ***	0,01	Manzana, fresa, piña
acetato hexilo	0,09 ± 0,03	0,03 ± 0,00	14,61 ***	0,67	Manzana, pera
lactato etilo	3,62 ± 0,56	1,93 ± 0,56	17,48 ***	155,00	Lácteo, fresa
octanoato de etilo	0,09 ± 0,06	0,48 ± 0,22	78,56 ***	0,01	Piña, floral, fresa
decanoato etilo	0,38 ± 0,18	0,11 ± 0,04	11,08 ***	0,20	Fruta, miel
succinato dietilo	0,17 ± 0,05	0,06 ± 0,00	19,55 ***	200,00	Caramelo
dietil glutarato	0,20 ± 0,07	0,14 ± 0,01	3,58 ns	No encontrado	No encontrado
2 fenilacetato	1,53 ± 0,38	1,67 ± 0,43	0,56 ns	0,25	Rosa, miel
Aldehídos					
acetaldehído	0,22 ± 0,20	0,23 ± 0,06	0,01 ns	0,50	Manzana, herbáceo
benzaldehído	0,08 ± 0,03	0,07 ± 0,01	0,50 ns	20,00	almendra
5 metil furfural	0,21 ± 0,09	0,21 ± 0,11	0,00 ns	No encontrado	No encontrado
Lactonas					
gamma butirrolactona	0,09 ± 0,05	0,10 ± 0,03	0,19 ns	0,04	Coco, ciruela, caramelo

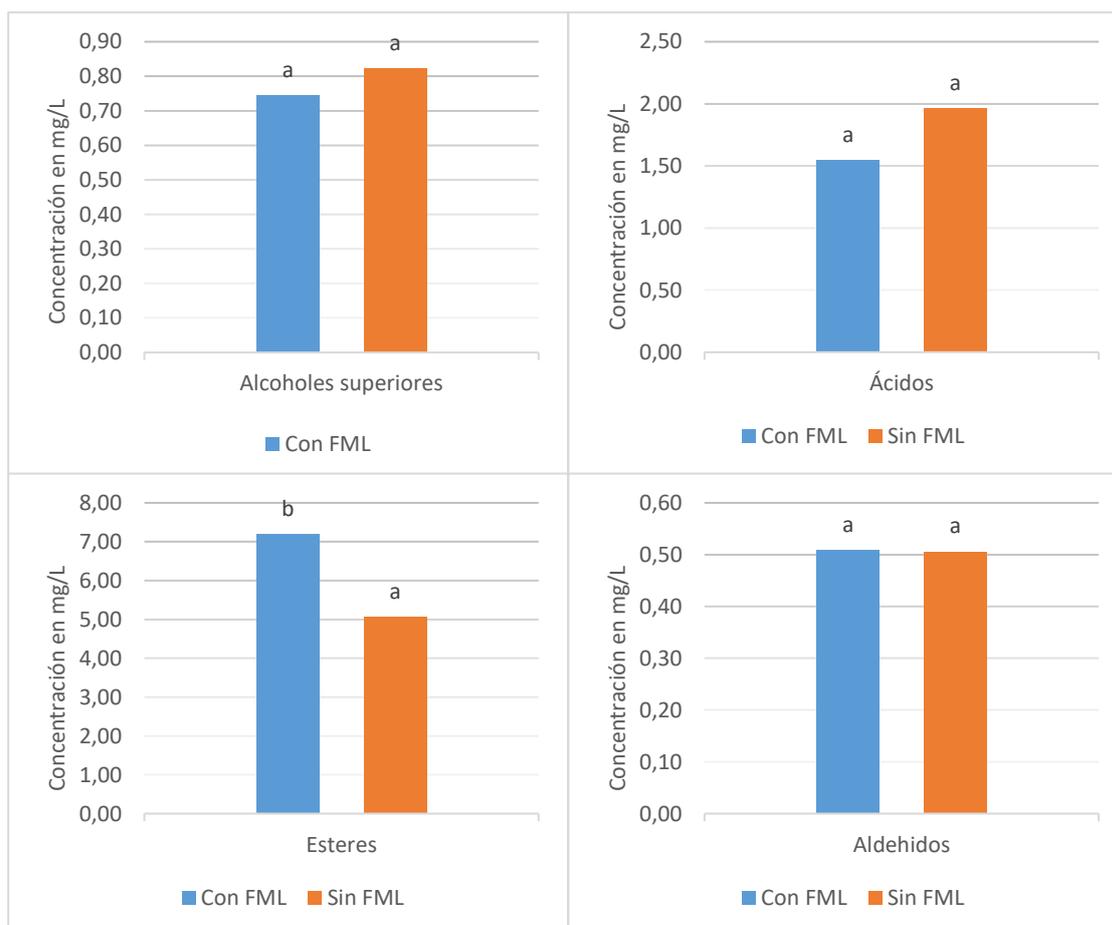


Fig. 6 Efecto de la fermentación maloláctica sobre la concentración de ácidos, alcoholes, aldehídos y ésteres en los vinos elaborados (mg/L).

4.2 Efecto de la cepa de bacteria láctica, momento de inoculación y nutrición con nitrógeno sobre el perfil aromático del vino base de Macabeo

Los resultados del análisis ANOVA de los compuestos volátiles estudiados en los vinos base cava de Macabeo, se muestran en la Tabla 3, y corresponden al efecto de la bacteria láctica utilizada para la realización de la FML, la influencia de la co-inoculación frente a la inoculación secuencial, y también el efecto de la nutrición con nitrógeno.

Alcoholes

Los alcoholes superiores aportan a los vinos caracteres vegetales y herbáceos considerándose desagradables, por lo que causan efectos negativos cuando se encuentran en concentraciones excesivas superando los 400-500 mg/L, pudiendo enmascarar los aromas aportados por los ésteres; o cuando superan su umbral de percepción (Zhang et al., 2018).

En cambio, cuando la concentración total de alcoholes está por debajo de los 300 mg/L, permiten un perfil agradable y contribuyen positivamente al aroma del vino. Esto es debido a que tienen función como precursores en la formación de ésteres, al igual que los ácidos (Luan et al., 2018).

Como se aprecia en la Tabla 3, los vinos en los que la FML se ha realizado con la bacteria DV16A, (*Oenococcus oeni*), aumenta significativamente la concentración de cis-3-hexenol. En los vinos fermentados con la bacteria DV7D (*Lactobacillus casei*), aumenta la concentración de 1-heptanol.

El momento de inoculación de la bacteria láctica tiene un efecto significativo sobre la concentración de cis-3-hexenol, 1-heptanol y 2-3 butanodiol, que aumentan con la inoculación secuencial.

La adición de nitrógeno al mosto tal y como se observa en la Tabla 3 produce vinos con menor concentración de 1-heptanol.

En la Figura 7, se muestra el contenido total de alcoholes en los vinos elaborados, se aprecia que únicamente el momento de inoculación afecta significativamente a su contenido siendo este superior en los vinos elaborados mediante inoculación secuencial de las bacterias lácticas para la realización de la FML. Este resultado coincide con los obtenidos por Lopez et al. que, en un estudio, comprobó, que en los vinos elaborados mediante co-inoculación de las bacterias lácticas aumentaba la concentración de alcoholes superiores (López et al., 2007). Sin embargo, Liu et al. (2021) encontraron que los alcoholes y los ácidos no presentaron diferencias significativas entre la inoculación secuencial y la co-inoculación (Liu et al., 2021).

Tabla 3 Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos volátiles (mg/L) de los vinos elaborados. Efecto de la bacteria láctica utilizada para la realización de la FML, de la co-inoculación frente a la inoculación secuencial, y de la nutrición con nitrógeno. **nivel significación $P \leq 0,05$. ***nivel significación $P \leq 0,01$. Bacterias lácticas: DV16A, (*Oenococcus oeni*), DV7D (*Lactobacillus casei*),

	Bacteria			Momento inoculación			Nitrogeno			Bact*Moment	Bact*Nit	Moment*Nit
	DV16A	DV7D	F ratio	Secuencial	Co-inoculación	F ratio	Con	Sin	F ratio	F ratio	F ratio	F ratio
Alcoholes superiores	$\bar{x} \pm s$ (mg/l)	$\bar{x} \pm s$ (mg/l)		$\bar{x} \pm s$ (mg/l)	$\bar{x} \pm s$ (mg/l)		$\bar{x} \pm s$ (mg/l)	$\bar{x} \pm s$ (mg/l)				
1 butanol	0,03 ± 0,01	0,06 ± 0,09	1,87 ns	0,04 ± 0,02	0,05 ± 0,09	0,39 ns	0,04 ± 0,02	0,05 ± 0,09	0,43 ns	0,63 ns	0,75 ns	2,18 ns
alcohol isoamilico	0,23 ± 0,09	0,23 ± 0,05	0,00 ns	0,26 ± 0,18	0,19 ± 0,07	2,53 ns	0,25 ± 0,18	0,21 ± 0,06	0,66 ns	4,72**	2,46 ns	0,10 ns
cis 3 hexenol	0,10 ± 0,07	0,08 ± 0,03	5,75**	0,11 ± 0,06	0,07 ± 0,03	10,93***	0,10 ± 0,05	0,08 ± 0,05	1,14 ns	35,75***	0,01 ns	0,96 ns
1 heptanol	0,09 ± 0,03	0,13 ± 0,03	22,52***	0,13 ± 0,03	0,10 ± 0,04	11,01***	0,10 ± 0,04	0,12 ± 0,04	5,86**	1,39 ns	0,21 ns	1,42 ns
2-3 butanodiol	0,25 ± 0,15	0,26 ± 0,09	0,23 ns	0,33 ± 0,11	0,17 ± 0,08	35,10***	0,27 ± 0,14	0,24 ± 0,11	0,78 ns	14,02***	0,14 ns	4,07 ns
Ácidos												
acido isobutirico	0,69 ± 0,24	0,86 ± 0,29	3,80 ns	0,71 ± 0,32	0,84 ± 0,20	2,21 ns	0,76 ± 0,30	0,79 ± 0,25	0,75 ns	4,18 ns	0,06 ns	0,00 ns
acido butirico	0,40 ± 0,22	0,35 ± 0,22	1,12 ns	0,38 ± 0,24	0,36 ± 0,20	0,14 ns	0,23 ± 0,06	0,51 ± 0,22	35,47***	16,32***	0,13 ns	0,86 ns
acido isopentanoico	0,16 ± 0,20	0,09 ± 0,05	1,94 ns	0,18 ± 0,20	0,08 ± 0,03	4,26**	0,16 ± 0,21	0,10 ± 0,04	1,51 ns	1,80 ns	0,49 ns	3,99 ns
acido octanoico	0,09 ± 0,05	0,27 ± 0,19	73,68***	0,09 ± 0,05	0,27 ± 0,19	77,13***	0,18 ± 0,13	0,18 ± 0,20	0,00 ns	48,19***	18,80***	2,36 ns
acido decanoico	0,09 ± 0,09	0,15 ± 0,15	14,53***	0,13 ± 0,11	0,11 ± 0,05	1,95 ns	0,10 ± 0,05	0,13 ± 0,11	3,83 ns	15,19***	0,78 ns	43,31***
Esteres												
acetato de metilo	0,27 ± 0,16	0,23 ± 0,03	1,52 ns	0,21 ± 0,04	0,28 ± 0,15	4,87**	0,27 ± 0,16	0,22 ± 0,03	2,46 ns	2,65 ns	3,79 ns	5,88**
acetato isobutilo	0,32 ± 0,07	0,30 ± 0,07	1,10 ns	0,27 ± 0,04	0,35 ± 0,08	11,51***	0,31 ± 0,08	0,31 ± 0,06	0,00 ns	1,75 ns	2,18 ns	0,88 ns
etilisovaleriano	0,07 ± 0,10	0,05 ± 0,01	0,36 ns	0,05 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,50 ns	0,07 ± 0,01	0,05 ± 0,01	1,13 ns	1,22 ns	1,10 ns	1,49 ns
hexanoato etilo	0,52 ± 0,12	0,47 ± 0,14	2,45 ns	0,45 ± 0,09	0,54 ± 0,15	7,21**	0,44 ± 0,12	0,55 ± 0,13	9,90***	4,18 ns	13,10***	3,36 ns
acetato hexilo	0,07 ± 0,02	0,12 ± 0,02	48,59***	0,10 ± 0,03	0,09 ± 0,04	0,49 ns	0,09 ± 0,04	0,09 ± 0,03	0,04 ns	2,32 ns	0,65 ns	1,45 ns
lactato etilo	3,60 ± 0,54	3,63 ± 0,61	0,02 ns	3,68 ± 0,50	3,56 ± 0,63	0,37 ns	3,47 ± 0,62	3,76 ± 0,48	2,02 ns	0,05 ns	0,34 ns	1,28 ns
octanoato de etilo	0,05 ± 0,02	0,12 ± 0,07	39,48***	0,07 ± 0,02	0,10 ± 0,08	7,68**	0,10 ± 0,08	0,07 ± 0,02	6,30**	20,31***	11,44***	8,94***
decanoato etilo	0,45 ± 0,14	0,32 ± 0,19	11,72***	0,50 ± 0,07	0,27 ± 0,19	35,33***	0,39 ± 0,21	0,38 ± 0,16	0,08 ns	11,23***	3,16 ns	0,80 ns
succinato dietilo	0,19 ± 0,07	0,15 ± 0,03	12,37***	0,17 ± 0,05	0,17 ± 0,06	0,18 ns	0,17 ± 0,05	0,17 ± 0,06	0,00 ns	1,56 ns	9,53***	18,43***
dietil glutarato	0,15 ± 0,03	0,24 ± 0,07	29,81***	0,18 ± 0,05	0,21 ± 0,09	3,21 ns	0,21 ± 0,08	0,19 ± 0,07	2,10 ns	8,69***	0,73 ns	4,50***
2 feniletilacetato	1,53 ± 0,38	1,54 ± 0,39	0,00 ns	1,67 ± 0,35	1,39 ± 0,37	5,08**	1,52 ± 0,42	1,54 ± 0,35	0,03 ns	1,97 ns	3,59 ns	0,00 ns
Aldehidos												
acetaldehido	0,11 ± 0,08	0,34 ± 0,22	36,38***	0,26 ± 0,25	0,19 ± 0,14	4,00 ns	0,29 ± 0,16	0,16 ± 0,09	12,73***	0,07 ns	32,82***	2,30 ns
benzaldehido	0,08 ± 0,04	0,08 ± 0,03	0,14 ns	0,07 ± 0,04	0,09 ± 0,03	2,65 ns	0,07 ± 0,04	0,09 ± 0,03	5,18**	1,59 ns	0,27 ns	29,51***
5 metil furfural	0,13 ± 0,04	0,28 ± 0,06	113,34***	0,21 ± 0,06	0,20 ± 0,12	0,06 ns	0,20 ± 0,08	0,21 ± 0,11	1,33 ns	22,48***	3,82 ns	0,83 ns
Lactonas												
γ-butilolactona	0,08 ± 0,04	0,11 ± 0,05	14,86***	0,09 ± 0,06	0,10 ± 0,04	2,50 ns	0,10 ± 0,05	0,09 ± 0,05	0,55 ns	16,42***	0,30 ns	61,08***

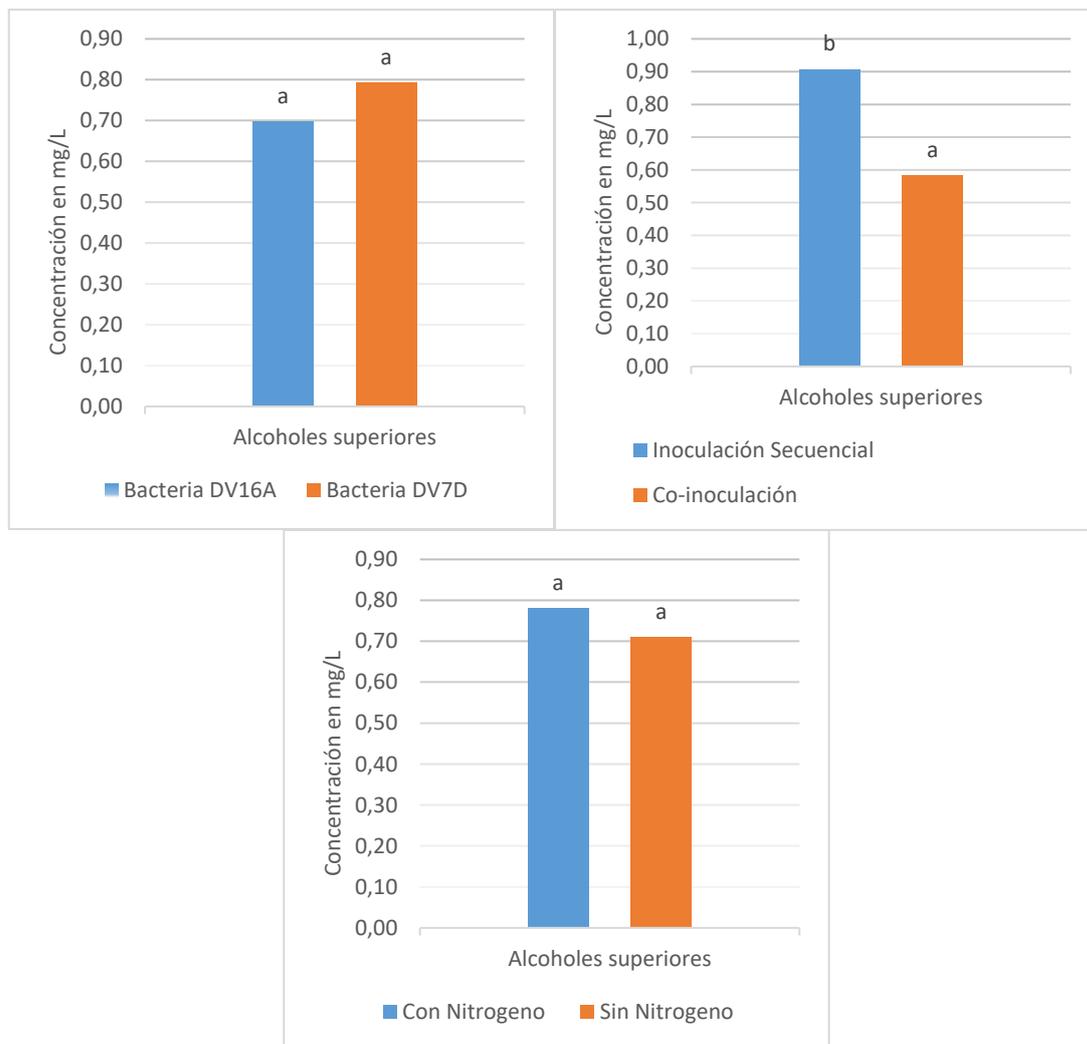


Fig. 7. Efecto de la bacteria láctica utilizada para la realización de la FML, de la co-inoculación frente a la inoculación secuencial, y de la nutrición con nitrógeno sobre el contenido de alcoholes en los vinos. (Letras distintas indican diferencias significativas al 95%. Bacterias lácticas: DV16A, (*Oenococcus oeni*), DV7D (*Lactobacillus casei*).

Ácidos

Los ácidos grasos volátiles lineales de cadena corta (C2-C4), media (C6-C10) y larga (C6-C10) y los ramificados se producen durante la fermentación, y se ha comprobado que a medida que aumenta la longitud de su cadena, la volatilidad disminuye y el aroma cambia de ácido a rancio (Pozo Bayon., 2011).

Los ácidos grasos son descritos con aromas rancios, a queso y mantequilla, por lo que se consideran desagradables cuando su total supera los 20 mg/L. Sin embargo, son deseables cuando se encuentran por debajo de su umbral de percepción, puesto que contribuyen a la complejidad del vino al esterificarse con los alcoholes dando lugar a ésteres afrutados (Englezos et al., 2018).

Los resultados (Tabla 3) muestran que los vinos que han realizado la FML con la bacteria DV7D presentan mayor concentración de ácido octanoico y ácido decanoico.

El momento de inoculación influye significativamente sobre la concentración de ácido isopentanoico que es mayor con inoculación secuencial. Por el contrario, el ácido octanoico aumenta cuando se utiliza la técnica de la coinoculación.

En cuanto a la nutrición con nitrógeno, si no se realiza, da como resultado un aumento significativo de ácido butírico en los vinos.

Los resultados del estudio han puesto de manifiesto que el contenido total de ácidos en los vinos se ve modificado con la aportación de nitrógeno al mosto, siendo mayor su concentración cuando no realiza (Figura 8). Algunos estudios han demostrado que la suplementación con nitrógeno en el mosto produce una disminución progresiva en la producción de ácidos (Vilanova et al, 2007)

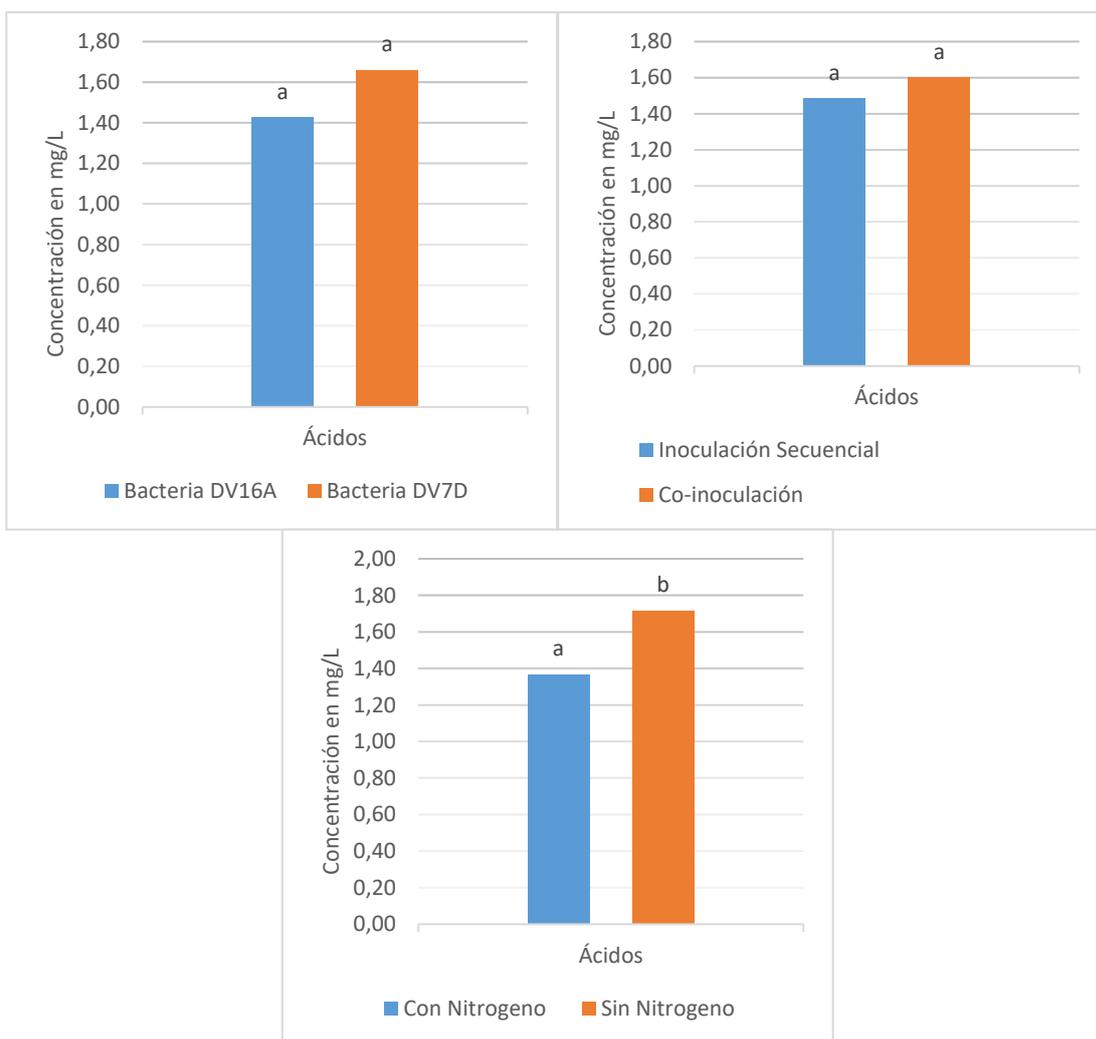


Fig. 8 Efecto de la bacteria láctica utilizada para la realización de la FML, de la co-inoculación frente a la inoculación secuencial, y de la nutrición con nitrógeno sobre el contenido de ácidos en los vinos. (Letras distintas indican diferencias significativas al 95%. Bacterias lácticas: DV16A, (*Oenococcus oeni*), DV7D (*Lactobacillus casei*).

Ésteres

Los ésteres son el grupo de compuestos volátiles más importante porque contribuye de forma positiva y significativa en el aroma frutal y floral de los vinos (Englezos et al., 2018; Luan et al., 2018).

Durante la fermentación se producen reacciones químicas sobre todo de ácidos grasos y alcoholes superiores llamadas esterificaciones, que dan lugar a los ésteres (González-Marco et al., 2008). Una concentración por debajo del umbral de percepción de los alcoholes puede favorecer al perfil del vino, ya que actúan como precursores de ésteres, junto a los ácidos grasos (Luan et al., 2018).

Como se aprecia en la Tabla 3 los ésteres: acetato hexilo, octanoato de etilo y dietil glutarato aumentan significativamente su concentración en los vinos en los cuales la FML se ha realizado con la bacteria *Lactobacillus casei*, DV7D. Cuando se inocula la bacteria DV16A es el decanoato etilo el que aumenta significativamente.

Para la mayoría de los ésteres estudiados, la co-inoculación tiene un efecto significativo sobre algunos compuestos como acetato de metilo, acetato isobutilo, hexanoato y octanoato de etilo, que aumentan (López et al., 2007) Si la siembra de las bacterias lácticas se realiza de forma secuencial, el decanoato etilo y el 2 feniletilacetato se encuentran en mayor concentración en los vinos.

El aporte de nitrógeno favorece la presencia de hexanoato etilo en los vinos, mientras que cuando no se realiza la adición, aumenta la concentración de octanoato de etilo.

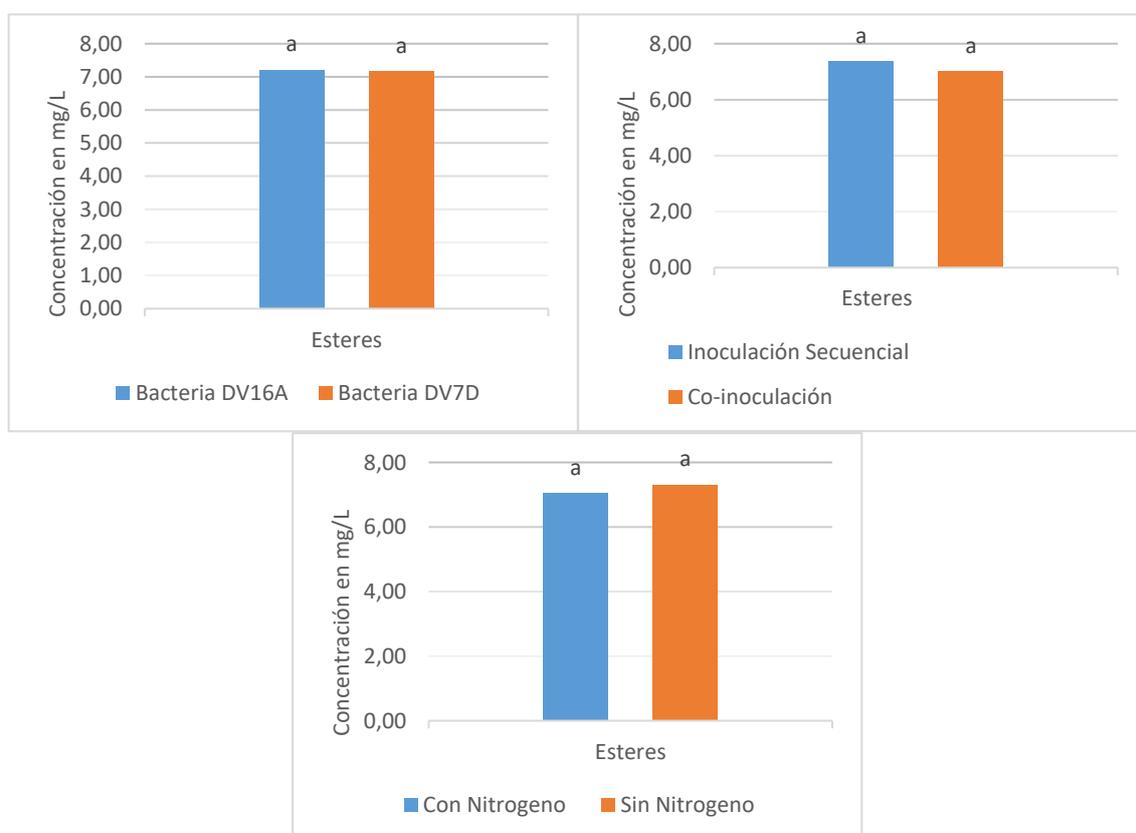


Fig.9 Efecto de la bacteria láctica utilizada para la realización de la FML, de la co-inoculación frente a la inoculación secuencial, y de la nutrición con nitrógeno sobre el contenido de ésteres en los vinos. Letras distintas indican diferencias significativas al 95%. Bacterias lácticas: DV16A, (*Oenococcus oeni*), DV7D (*Lactobacillus casei*).

El contenido total de ésteres (Figura 9), no se ve modificado significativamente por efecto de la bacteria láctica utilizada para la realización de la FML, ni del momento de su inoculación, secuencial o co-inoculación, tampoco por la nutrición con nitrógeno.

Aldehídos

Los aldehídos dotan a los vinos de perfiles no deseables cuando se encuentran por encima de su umbral de percepción. El acetaldehído constituye más del 90 % del contenido total de aldehídos, por ello se considera el aldehído de mayor importancia desde el punto de vista de su influencia en el aroma (Hernández et al., 2014).

El acetaldehído, se considera agradable cuando está a bajas concentraciones, dotando al vino de aromas frutales (Arslan et al., 2018). Pero en cantidades superiores a su umbral de percepción (0,5mg/L) pueden ofrecer aromas indeseables como almendra amarga.

El uso de la bacteria *Lactobacillus casei*, DV7D para inducir la FML aumenta significativamente la concentración de acetaldehído y 5 metil furfural en los vinos (Tabla 3).

El momento de inoculación no tiene un efecto significativo sobre la concentración de los aldehídos de los vinos. (Tabla 3), y cuando se adiciona nitrógeno al mosto se observa un aumento significativo en los vinos de acetaldehído, mientras que disminuye la cantidad de benzaldehído.

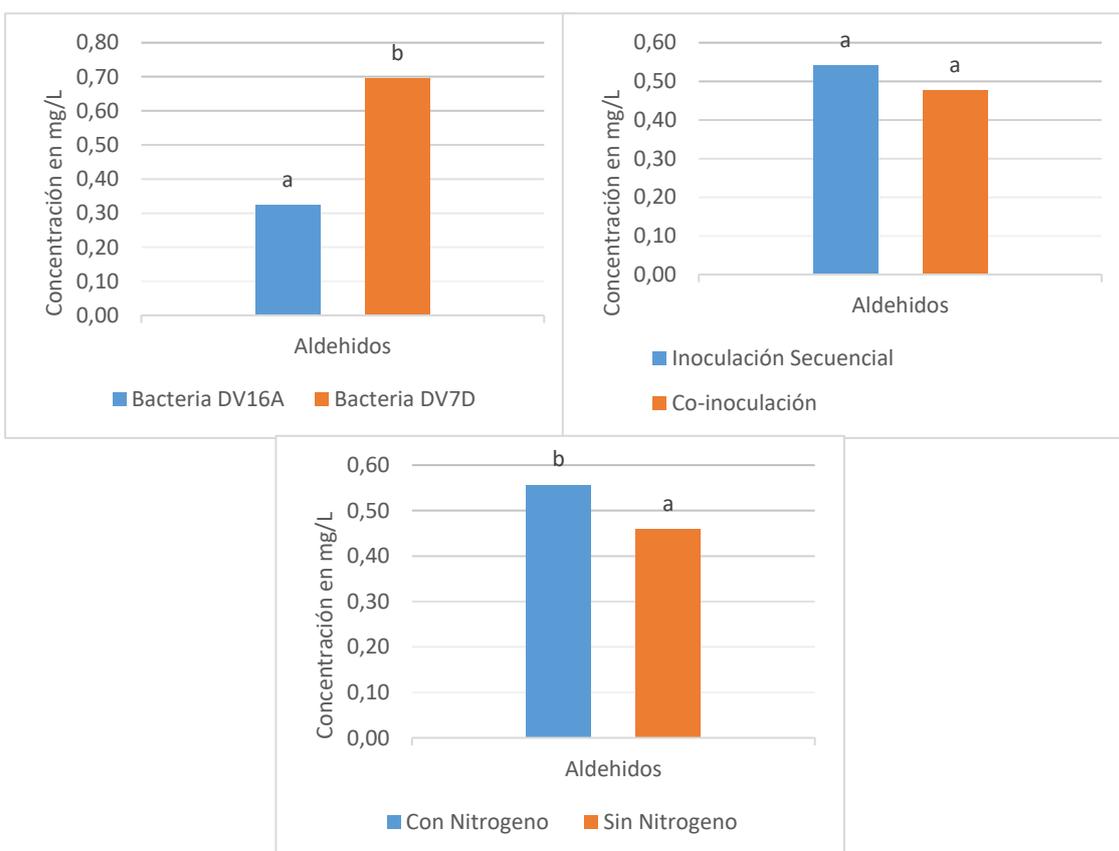


Fig. 10 Efecto de la bacteria láctica utilizada para la realización de la FML, de la co-inoculación frente a la inoculación secuencial, y de la nutrición con nitrógeno sobre el contenido de aldehídos en los vinos. Letras distintas indican diferencias significativas al 95%. Bacterias lácticas: DV16A, (*Oenococcus oeni*), DV7D (*Lactobacillus casei*).

Como muestra la Figura 10, el contenido total de aldehídos en los vinos elaborados se ve afectado significativamente por la bacteria láctica y por la nutrición del mosto con nitrógeno, aumentando con la DV7D y con el aporte de nitrógenos al mosto.

Lactonas

Las lactonas son compuestos volátiles que aportan complejidad al perfil aromático del vino y pueden aportar aromas al vino a frutas de hueso. En este estudio se ha cuantificado la γ -butirolactona.

Como muestra la Tabla 3, la γ -butirolactona aumenta significativamente en los vinos cuando la FML la realiza la bacteria *Lactobacillus casei* (DV7D). No se ha observado un efecto significativo del momento de inoculación de la bacteria, ni de la nutrición del mosto con nitrógeno, sobre la concentración de este compuesto en el vino.

4.3 Análisis de componentes principales (PCA)

Con la finalidad de agrupar los distintos tipos de vinos en función de los compuestos volátiles presentes en ellos, se ha realizado un análisis de los componentes principales o PCA. Este análisis es uno de los métodos pioneros del análisis multivariante. Consiste en una técnica de reducción de la información disponible sobre el conjunto de individuos (en este caso los vinos objeto de análisis) en los cuales se han tomado diversas observaciones.

El método condensa la matriz de correlaciones entre las variables en unos “componentes principales” de la variabilidad total, es decir, permite transformar un conjunto de variables inter correlacionadas con otro conjunto de variables no correlacionadas, denominadas componentes principales, que son combinación lineal de las variables originales.

El primer componente principal que se extrae en el análisis es el que resume lo mejor posible la información contenida en la matriz de datos original, es decir, es el que mejor contribuye a explicar la varianza total. El segundo componente es el que resume lo mejor posible la varianza restante, siendo independiente del primero. La secuencia puede continuar extrayendo factores hasta explicar la varianza total.

El gráfico de puntuaciones (scores), que hace referencia a los componentes principales, muestra la distribución de la variable estudiada en la matriz. Mientras que, el gráfico de cargas (loading), que indica el peso de los componentes, muestra la disposición de los distintos compuestos volátiles en el plano, en función de los dos ejes principales (Componente 1 y Componente 2).

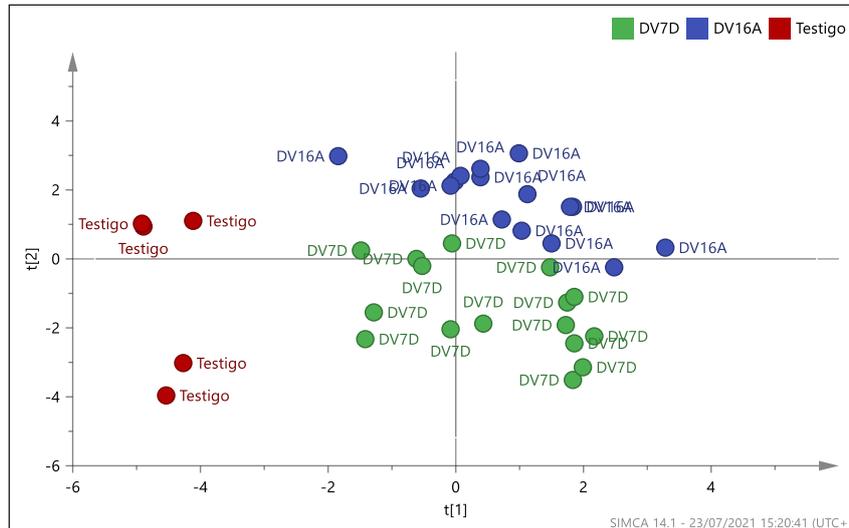
En la Figura 11 se muestran los resultados del PCA de los vinos elaborados con y sin FML. En el gráfico de scores la PC1, que es la que mejor explica la varianza total, permite diferenciar los vinos Testigo que no han realizado la FML de los que la han realizado con las dos bacterias lácticas utilizadas en este estudio. Observando el gráfico de loadings se aprecia que el vino testigo se relaciona con contenidos mayores de cis 3 hexenol, ácido butírico y octanoato de etilo. La PC2 permite diferenciar los vinos en función de la bacteria láctica utilizada para la realización de la FML

Los resultados del análisis del PCA realizado con los resultados de los compuestos volátiles obtenidos en los vinos elaborados con las dos bacterias lácticas utilizadas para la realización de la FML, se muestran en la Figura 12. En el gráfico de puntuaciones se observa que la PC1 permite una diferenciación bien marcada entre las dos bacterias lácticas. Ocupando la bacteria *Oenococcus oeni*, (DV16A), la zona izquierda mientras que la *Lactobacillus casei*, (DV7D), se posiciona en la zona derecha. En el gráfico de cargas se puede asociar mayor concentración de cis-3-hexenol, decanoato etilo, 2 feniletacetato y succinato de dietilo a los vinos en los que la FML la ha realizado la bacteria DV16A. Los compuestos 1-heptanol, ácido octanoico, acetato hexilo, octanoato de etilo, dietil glutarato, acetaldehído y 5 metil furfural están más relacionados con la bacteria DV7D.

En función del momento de la inoculación de las bacterias lácticas para la realización de la FML en los vinos base de Macabeo, el análisis de componentes principales realizado sobre los compuestos volátiles de los vinos obtenidos (Figura 13) permite observar como la inoculación secuencial muestra comportamiento diferente en función de la bacteria empleada. Se observa en la zona superior derecha como la secuencial está ocupada por la bacteria DV7D y en la zona inferior superior es la DV16A la que predomina, siendo en ambos casos inoculación secuencial. El gráfico de cargas permite asociar las bacterias con inoculación secuencial (DV16A) los siguientes compuestos, alcohol isoamílico, cis-3-hexenol y 2-3 butanodiol. Y para la bacteria DV7D junto con la inoculación secuencial los compuestos, ácido isobutírico, ácido butírico, ácido octanoico, octanoato de etilo, dietil

glutarato y 5 metil furfural. A pesar de lo mencionado anteriormente, en el gráfico de puntuaciones se observa que la PC1 permite una cierta diferenciación entre la inoculación secuencial y la co-inoculación. En los vinos en los que se ha realizado inoculación secuencial de levaduras y bacterias lácticas, aumenta el contenido de lactato de etilo, 2 feniletacetato, cis-3-hexenol, ácido isopentanoico y acetato de isbutilo

a) Gráfico de puntuaciones



b) Gráfico de cargas

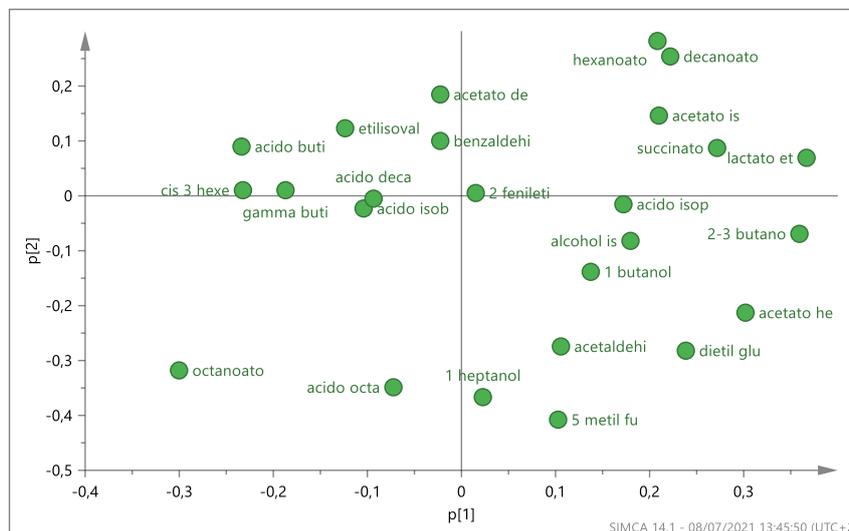
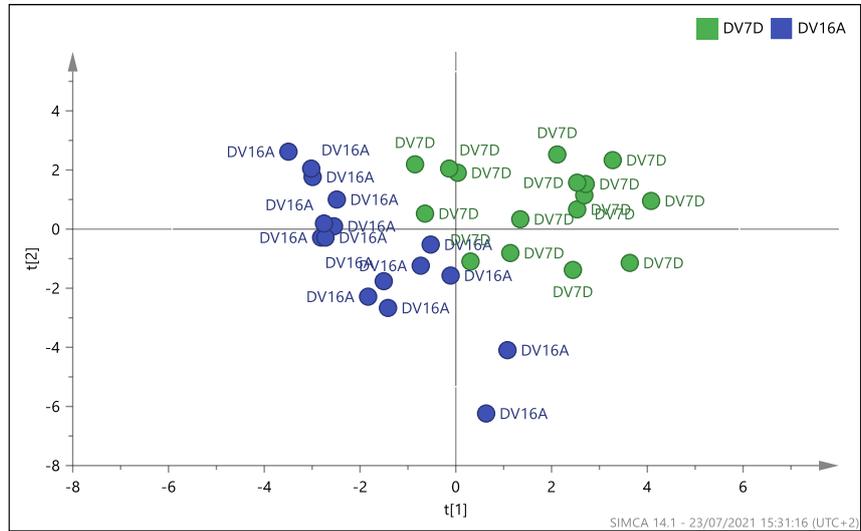


Fig. 11 Análisis de Componentes principales (Componente 1 frente a 2) realizado sobre los compuestos volátiles identificados en los vinos elaborados con y sin FML. a) gráfico de puntuaciones (scores), b) gráfico de cargas (loadings).

a) Gráfico de puntuaciones



b) Gráfico de cargas

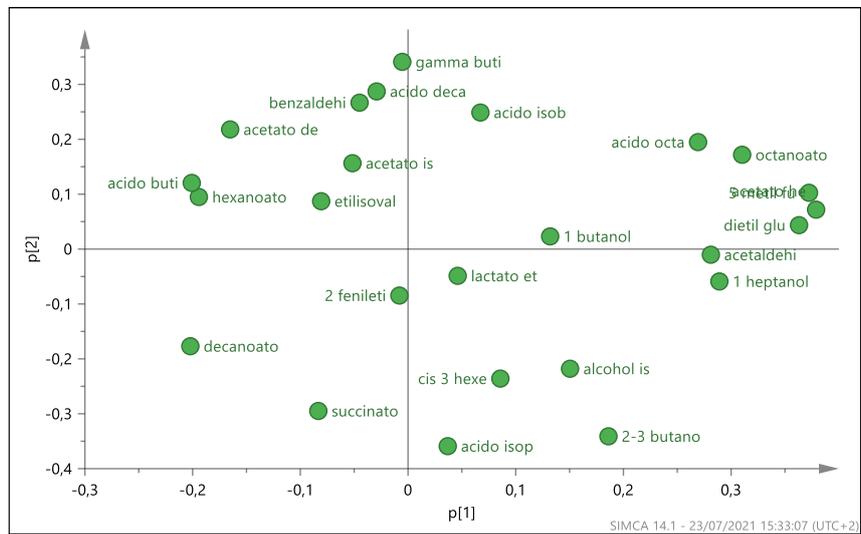
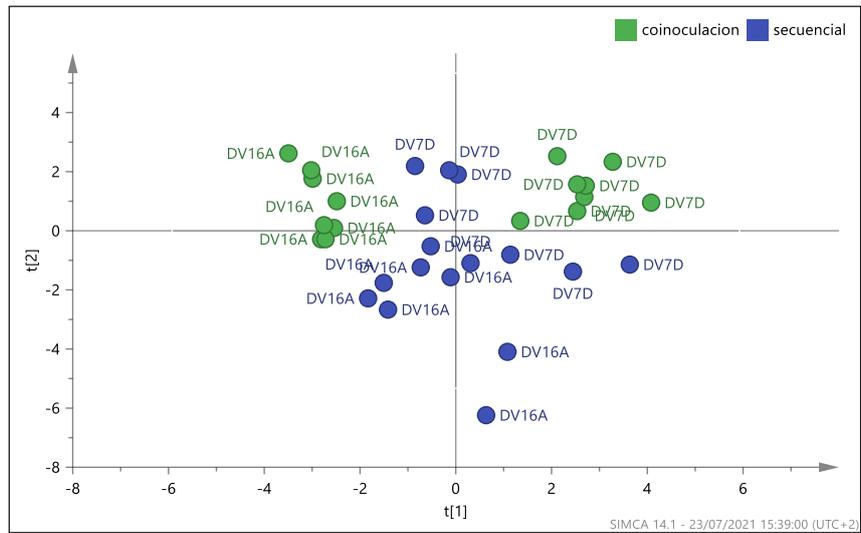


Fig. 12 Análisis de Componentes principales (Componente 1 frente a 2) realizado sobre los compuestos volátiles identificados en los vinos elaborados con las bacterias lácticas *Oenococcus oeni*, (DV16A) y *Lactobacillus casei*, (DV7D). a) gráfico de puntuaciones (scores), b) gráfico de cargas (loadings).

a) Gráfico de puntuaciones



b) Gráfico de cargas

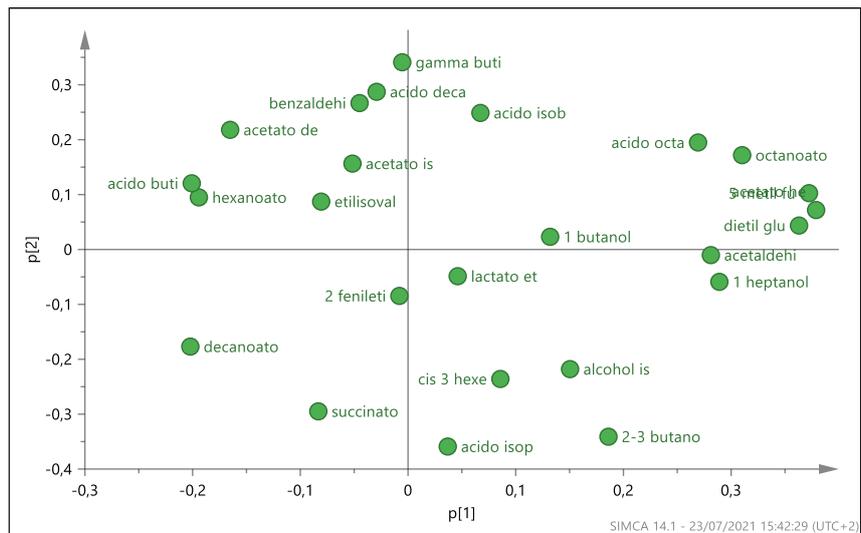


Fig.13. Análisis de Componentes principales (Componente 1 frente a 2) realizado sobre los compuestos volátiles identificados en los vinos elaborados con inoculación secuencial y co-inoculación para la realización de la FML. a) gráfico de puntuaciones (scores),

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio permiten extraer una serie de conclusiones de los efectos que tiene la realización de la FML, la cepa de bacteria utilizada, la técnica de inoculación y la nutrición con nitrógeno, sobre la composición volátil de los vinos base cava elaborados a partir de la variedad Macabeo.

La FML produce un cambio en el perfil organoléptico de los vinos base elaborados con la variedad Macabeo, debido principalmente al aumento de la concentración de los ésteres, una de las familias de compuestos más importantes para la calidad del vino. En concreto los ésteres que aumentan su concentración al realizar la fermentación maloláctica son el acetato isobutilo, hexanoato etilo, acetato hexilo, lactato etilo, decanoato etilo y succinato dietilo.

La cepa de bacteria láctica, el momento de inoculación y la nutrición con nitrógeno afecta a algunos de los compuestos volátiles estudiados pertenecientes a las familias de alcoholes, ácidos ésteres y aldehídos.

El contenido total de alcoholes en los vinos elaborados se ve afectado por el momento de inoculación siendo este superior en los vinos elaborados mediante inoculación secuencial de las bacterias lácticas para la realización de la FML.

Los resultados del estudio han puesto de manifiesto que el contenido total de ácidos en los vinos se ve modificado con la aportación de nitrógeno al mosto, siendo mayor su concentración cuando no realiza.

El contenido total de ésteres, no se ve modificado significativamente por efecto de la bacteria láctica utilizada para la realización de la FML, ni del momento de su inoculación, secuencial o co-inoculación, tampoco por la nutrición con nitrógeno.

El contenido total de aldehídos en los vinos elaborados se ve afectado significativamente por la bacteria láctica y por la nutrición del mosto con nitrógeno, aumentando con la DV7D y con el aporte de nitrógeno al mosto.

El Análisis de componentes principales (PCA) ha permitido diferenciar los vinos con y sin FML, según la bacteria láctica utilizada y en menor medida por su momento de inoculación.

Sería necesario realizar un análisis organoléptico de los vinos para comprobar si estas diferencias encontradas en la composición aromática de los vinos se perciben también a nivel sensorial.

BIBLIOGRAFIA

- Abrahamse, C., & Bartowsky, E. (2011). Timing of malolactic fermentation inoculation in Shiraz grape must and wine: influence on chemical composition. *World Journal Of Microbiology And Biotechnology*, 28(1), 255-265. doi: 10.1007/s11274-011-0814-3
- Antalick, G., Perello, M., & de Revel, G. (2016). Co-inoculation with Yeast and LAB Under Winery Conditions: Modification of the Aromatic Profile of Merlot Wines. *South African Journal Of Enology And Viticulture*, 34(2). doi: 10.21548/34-2-1098
- Arslan, E., Çelik, Z., & Cabaroğlu, T. (2018). Effects of Pure and Mixed Autochthonous *Torulasporea delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on Fermentation and Volatile Compounds of Narince Wines. *Foods*, 7(9), 147. doi: 10.3390/foods7090147
- Azzolini, M., Tosi, E., Vagnoli, P., Krieger, S., & Zapparoli, G. (2010). Evaluation of technological effects of yeast-bacterial co-inoculation in red table wine production. *Italian Journal Of Food Science*, 22(3). Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/264892324_Evaluation_of_technological_effects_of_yeast-bacterial_co-inoculation_in_red_table_wine
- Barbosa, C., Falco, V., Mendes-Faia, A. and Mendes-Ferreira, A., (2009). Nitrogen addition influences formation of aroma compounds, volatile acidity and ethanol in nitrogen deficient media fermented by *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 108(2), pp.99-104.
- Bisson, L. (1991). Geographic Origin and Diversity of Wine Strains of *Saccharomyces*. *American Journal Of Enology And Viticulture*, 63(2), 165-176. doi: 10.5344/ajev.2012.11083
- Boschfuste, J., Riuauamatell, M., Guadayol, J., Caixach, J., Lopez Tamames, E., & Buxaderas, S. (2007). Volatile profiles of sparkling wines obtained by three extraction methods and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis. *Food Chemistry*, 105(1), 428-435. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.12.053
- Boulton, R., Powell, R., & Heymann, H. (1996). Key constituents affecting wine body - an exploratory study. *Journal of sensory studies*, 26(1), 62-70. Doi: 10.1111/j.1745-459x.2010.00322.x
- 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. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.024
- 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. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.024
- Carrau, F., Medina, K., Farina, L., Boido, E., A. Henschke, P., & Dellacassa, E. (2008). Production of fermentation aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts: effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains.
- Cooper, J., Tourte, J., & Gros, P. (1982). Determination of pentachlorophenol residues in wine and corks by solvent extraction methodology and specific gas chromatography detection. *Chromatographia*, 38(3-4), 147-150. doi: 10.1007/bf02290327
- Curtin, C., Kennedy, E., & Henschke, P. (2012). Genotype-dependent sulphite tolerance of Australian *Dekkera* (*Brettanomyces*) *bruxellensis* wine isolates. *Letters In Applied Microbiology*, 55(1), 56-61. doi: 10.1111/j.1472-765x.2012.03257.x

- Curtin, C., Kennedy, E., & Henschke, P. (2012). Genotype-dependent sulphite tolerance of Australian Dekkera (*Brettanomyces*) bruxellensis wine isolates. *Letters In Applied Microbiology*, 55(1), 56-61. doi: 10.1111/j.1472-765x.2012.03257.x
- Englezos, V., Rantsiou, K., Cravero, F., Torchio, F., Pollon, M., & Fracassetti, D. et al. (2018). Volatile profile of white wines fermented with sequential inoculation of *Starmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chemistry*, 257, 350-360. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.03.018
- Englezos, V., Torchio, F., Cravero, F., Marengo, F., Giacosa, S., & Gerbi, V. et al. (2016). Aroma profile and composition of Barbera wines obtained by mixed fermentations of *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) and *Saccharomyces cerevisiae*. *LWT*, 73, 567-575. doi: 10.1016/j.lwt.2016.06.063
- Ferreira, V., Fernández, P., Peña, C., Escudero, A. and Cacho, J., (1995). Investigation on the role played by fermentation esters in the aroma of young Spanish wines by multivariate analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 67(3), pp.381-392.
- Gamero, A., Hernández-Orte, P., Querol, A., & Ferreira, V. (2011). Effect of aromatic precursor addition to wine fermentations carried out with different *Saccharomyces* species and their hybrids. *International Journal of Food Microbiology*, 147(1), 33-44.
- González-Marco, A., & Jiménez-Moreno, N. (2008). Current knowledge about the presence of amines in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(3), 257-275.
- González, S., Gallo, L., Climent, M., Barrio, E., & Querol, A. (2007). Enological characterization of natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii*. *International Journal Of Food Microbiology*, 116(1), 11-18. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.047
- Gobert, A., Tourdot-Maréchal, R., Morge, C., Sparrow, C., Liu, Y., & Quintanilla-Casas, B. et al. (2017). Non-*Saccharomyces* Yeasts Nitrogen Source Preferences: Impact on Sequential Fermentation and Wine Volatile Compounds Profile. *Frontiers In Microbiology*, 8. doi: 10.3389/fmicb.2017.02175
- Henschke, T. (1993). The nitrogenous metabolism of yeast. Part i. The determination of the total nitrogen of yeast. *Journal Of The Institute Of Brewing*, 38(1), 23-29. doi: 10.1002/j.2050-0416.1932.tb05386.x
- Hernández-Orte, P., Franco, E., Huerta, C., García, J., Cabellos, M., & Suberviola, J. et al. (2014). Criteria to discriminate between wines aged in oak barrels and macerated with oak fragments. *Food Research International*, 57, 234-241. doi: 10.1016/j.foodres.2014.01.044
- Ivit, N., & Kemp, B. (2018). The Impact of Non-*Saccharomyces* Yeast on Traditional Method Sparkling Wine. *Fermentation*, 4(3), 73. doi: 10.3390/fermentation4030073
- Jiranek, V. (2011). Smoke taint compounds in wine: nature, origin, measurement and amelioration of affected wines. *Australian Journal Of Grape And Wine Research*, 17(2), S2-S4. doi: 10.1111/j.1755-0238.2011.00154.x
- Jussier, D., Dubé Morneau, A., & Mira de Orduña, R. (2006). Effect of Simultaneous Inoculation with Yeast and Bacteria on Fermentation Kinetics and Key Wine Parameters of Cool-Climate Chardonnay. *Applied And Environmental Microbiology*, 72(1), 221-227. doi: 10.1128/aem.72.1.221-227.2006
- Krieger-Weber, S., & Ferrer, S. (2003). Use of starter cultures of *Lactobacillus* to induce malolactic fermentation in wine. *Australian Journal Of Grape And Wine Research*, 23(1), 15-21. doi: 10.1111/ajgw.12261

- Knoll, C., Fritsch, S., Schnell, S., Grossmann, M., Krieger-Weber, S., du Toit, M. and Rauhut, D., (2011). Impact of different malolactic fermentation inoculation scenarios on Riesling wine aroma. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(3), pp.1143-1153.
- Liu, S., Laaksonen, O. and Yang, B., (2019). Volatile composition of bilberry wines fermented with non-Saccharomyces and Saccharomyces yeasts in pure, sequential and simultaneous inoculations. *Food Microbiology*, 80, pp.25-39.
- Liu, X., Li, Y., Zhou, J., & Huang, M. (2021). Effects of co-inoculation and sequential inoculation of *Wickerhamomyces anomalus* and *Saccharomyces cerevisiae* on the physicochemical properties and aromatic characteristics of longan (Dimocarpus longan Lour.) wine. *Quality Assurance And Safety Of Crops & Foods*, 13(2), 56-66. doi: 10.15586/qas.v13i2.893
- López, R., Garijo, P., Gutiérrez, A.R., Tenorio, C., López, I., Santamaría, P. (2007), *Experiencias de inoculación de bacterias lácticas en distintos momentos de la elaboración de vinos tintos de Rioja (España)*, OIV, Editor.
- Luan, Y., Zhang, B., Duan, C., & Yan, G. (2018). Effects of different pre-fermentation cold maceration time on aroma compounds of *Saccharomyces cerevisiae* co-fermentation with *Hanseniaspora opuntiae* or *Pichia kudriavzevii*. *LWT*, 92, 177-186. doi: 10.1016/j.lwt.2018.02.004
- Marais, J., (2017). Effect of Grape Temperature and Yeast Strain on Sauvignon blanc Wine Aroma Composition and Quality. *South African Journal of Enology & Viticulture*, 22(1).
- Massera, A., Soria, A., Catania, C., Krieger, S. and Combina, M., (2009). Simultaneous Inoculation of Malbec (*Vitis vinifera*) Musts with Yeast and Bacteria: Effects on Fermentation Performance, Sensory and Sanitary Attributes of Wines. *Food Technol. Biotechnol.*, [online] 47(2). Available at: <<https://repositorio.inta.gob.ar/xmlui/handle/20.500.12123/8579>> [Accessed 9 July 2021].
- Medina, K., Boido, E., Fariña, L., Gioia, O., Gomez, M., & Barquet, M. et al. (2013). Increased flavour diversity of Chardonnay wines by spontaneous fermentation and co-fermentation with *Hanseniaspora vineae*. *Food Chemistry*, 141(3), 2513-2521. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.04.056
- Mendes-Ferreira, A., Barbosa, C., Lage, P., & Mendes-Faia, A. (2011). THE IMPACT OF NITROGEN ON YEAST FERMENTATION AND WINE QUALITY. *Ciência E Técnica Vitivinícola*, 26(32). Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/259226122_The_Impact_Of_Nitrogen_On_Yeast_Fermentation_And_Wine_Quality
- Mendes-ferreira, A., mendes-faia, A., & leão, C. (2002). Survey of Hydrogen Sulphide Production by Wine Yeasts. *Journal Of Food Protection*, 65(6), 1033-1037. doi: 10.4315/0362-028x-65.6.1033
- Montalva, L. (2017) estudio del perfil sensorial de vinos elaborados con levaduras No Saccharomyces a partir de la variedad merlot. *Universidad politécnica de valencia*.
- Nielsen, J. C., Prahl, C., & Lonvaud-Funel, A. (1996). Malolactic fermentation in wine by direct inoculation with freeze-dried *Leuconostoc oenos* cultures. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47(1), 42-48.

- 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. doi: 10.3389/fmicb.2016.00411
- Pretorius, I. (2000). Conducting Wine Symphonics with the Aid of Yeast Genomics. *Beverages*, 2(4), 36. doi: 10.3390/beverages2040036
- Pripis-Nicolau, L., Revel, G., Bertrand, A., & Lonvaud-Funel, A. (2004). Methionine catabolism and production of volatile sulphur compounds by *Oenococcus oeni*. *Journal Of Applied Microbiology*, 96(5), 1176-1184. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02257.x
- Ramírez, M., Velázquez, R., Maqueda, M., Zamora, E., López-Piñeiro, A., & Hernández, L. (2016). Influence of the dominance of must fermentation by *Torulaspora delbrueckii* on the malolactic fermentation and organoleptic quality of red table wine. *International Journal Of Food Microbiology*, 238, 311-319. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.029
- Ribéreau-Gayon, P. (1999). Observations related to the causes and consequences of stuck fermentation in vinification. *OENO One*, 33(1), 39. doi: 10.20870/oeno-one.1999.33.1.1041
- Rollero, S., Bloem, A., Camarasa, C., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., & Sablayrolles, J. et al. (2014). Combined effects of nutrients and temperature on the production of fermentative aromas by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 99(5), 2291-2304. doi: 10.1007/s00253-014-6210-9
- Rollero, S., Bloem, A., Ortiz-Julien, A., Camarasa, C., & Divol, B. (2018). Fermentation performances and aroma production of non-conventional wine yeasts are influenced by nitrogen preferences. *FEMS Yeast Research*, 18(5). doi: 10.1093/femsyr/foy055
- Rosi, I., Fia, G., & Canuti, V. (2003). Influence of different pH values and inoculation time on the growth and malolactic activity of a strain of *Oenococcus oeni*. *Australian Journal Of Grape And Wine Research*, 9(3), 194-199. doi: 10.1111/j.1755-0238.2003.tb00270.x
- Santos, R. O., Trindade, S. C., Maurer, L. H., Bersch, A. M., Sautter, C. K., & Penna, N. G. (2016). Physicochemical, antioxidant and sensory quality of Brazilian blueberry wine. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 88(3), 1557–1568.
- Styger, G., Prior, B. and Bauer, F., (2011). Wine flavor and aroma. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(9), pp.1145-1159.
- Swiegers, J., Bartowsky, E., Henschke, P., & Pretorius, I. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal Of Grape And Wine Research*, 11(2), 139-173. doi: 10.1111/j.1755-0238.2005.tb00285.x
- Swiegers, J., Capone, D., Pardon, K., Elsey, G., Sefton, M., Francis, I., & Pretorius, I. (2007). Engineering volatile thiol release in *Saccharomyces cerevisiae* for improved wine aroma. *Yeast*, 24(7), 561-574. doi: 10.1002/yea.1493
- Torrea, D., Varela, C., Ugliano, M., Ancin-Azpilicueta, C., Leigh Francis, I., & Henschke, P. (2011). Comparison of inorganic and organic nitrogen supplementation of grape juice – Effect on volatile composition and aroma profile of a Chardonnay wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Food Chemistry*, 127(3), 1072-1083. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.01.092
- Ugliano, M., Genovese, A., & Moio, L. (2003). Hydrolysis of Wine Aroma Precursors during Malolactic Fermentation with Four Commercial Starter Cultures of *Oenococcus oeni*. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 51(17), 5073-5078. doi: 10.1021/jf0342019

- 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. doi: 10.1128/aem.70.6.3392-3400.2004
- Vilanova, M., Ugliano, M., Varela, C., Siebert, T., Pretorius, I. S., & Henschke, P. A. (2007). Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(1), 145–157.
- Zapparoli, G., Tosi, E., Azzolini, M., Vagnoli, P., & Krieger, S. (2016). Bacterial Inoculation Strategies for the Achievement of Malolactic Fermentation in High-alcohol Wines. *South African Journal Of Enology And Viticulture*, 30(1). doi: 10.21548/30-1-1424
- Zhang, B., Luan, Y., Duan, C., & Yan, G. (2018). Use of *Torulasporea delbrueckii* Co-fermentation With Two *Saccharomyces cerevisiae* Strains With Different Aromatic Characteristic to Improve the Diversity of Red Wine Aroma Profile. *Frontiers In Microbiology*, 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.00606