



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL MEDIO  
NATURAL (ETSIAMN)**

*GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS*

*Curso 2017/2018*

## Selección de levaduras *No-Saccharomyces* de las uvas Merlot y Cabernet Sauvignon en función de su perfil polifenólico

VALENCIA, marzo de 2018

**Alumno:** Ismael Boluda Puchades

**Tutora:** María Inmaculada Álvarez Cano

## RESUMEN

Las cepas de levaduras que intervienen en la fermentación son responsables de gran parte de las características finales de los vinos, ya que tienen una influencia determinante en el color, estructura, composición aromática, estabilidad y seguridad alimentaria, entre otros. La siembra secuencial de levaduras no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces*, de forma similar a lo que ocurre en la fermentación espontánea del mosto de uva, contribuye a incrementar la complejidad de los vinos y a potenciar su personalidad, debido a las características diferenciadoras que pueden aportar las cepas de levaduras no-*Saccharomyces* a los vinos.

En este trabajo se ha estudiado el efecto de distintas cepas de levaduras no-*Saccharomyces* aisladas en uvas de Cabernet Sauvignon y Merlot, de la Bodega Chozas Carrascal, en la composición química y organoléptica de los vinos con ellas elaborados. Para ello se han realizado vinificaciones individuales con cada una de las cepas de levadura no-*Saccharomyces* aisladas, sembrándose a los tres días los mostos en fermentación con la cepa *Saccharomyces cerevisiae* 22H, aislada previamente en las uvas de esta bodega, con el fin de que esta cepa concluya el proceso fermentativo. En los vinos elaborados se ha determinado la composición convencional y polifenólica y se ha establecido su perfil sensorial, con la finalidad de determinar las mejores cepas de levaduras presentes en el viñedo, e implementarlas en la vinificación, para obtener vinos de mayor calidad y personalidad, que potencien la composición polifenólica de los vinos y su valoración organoléptica. En general, en los vinos de la variedad Merlot y Cabernet Sauvignon elaborados, la fermentación secuencial con cepas no-*Saccharomyces-Saccharomyces* 22H, da lugar a un mejor comportamiento polifenólico y a una mejor valoración organoléptica, respecto a los vinos fermentados únicamente con la cepa *Saccharomyces* 22H. De todas las cepas ensayadas, ha sido la cepa no-*Saccharomyces* 42 d para los vinos de Merlot, y la 58E para los de Cabernet, las elegidas para formar parte de un cultivo secuencial mixto junto con la levadura *S. cerevisiae* 22H.

**Palabras clave:** Levaduras, No-*Saccharomyces*, polifenoles, Cabernet Sauvignon, Merlot, taninos, antocianos.

## RESUM

Els ceps de llevat que intervenen en la fermentació són els responsables d'una gran part de les característiques finals dels vins, ja que tenen una influència determinant en el color, estructura, composició aromàtica, estabilitat i seguretat alimentària, entre altres. La sembra seqüencial de ceps no-*Saccharomyces* i *Saccharomyces*, de forma semblant al que ocorre en la fermentació espontània del most del raïm, contribueix a incrementar la complexitat dels vins i a potenciar la seua personalitat, a causa de les característiques diferenciadores que poden aportar els ceps de no-*Saccharomyces* als vins.

En aquest treball s'ha estudiat l'efecte de distints ceps de llevat no-*Saccharomyces* aïllades en raïm de Cabernet Sauvignon i Merlot, de la Bodega Chozas Carrascal, en la composició química i organolèptica dels vins amb ells elaborats. Amb eixe objectiu, s'han realitzat vinificacions individuals amb cada un dels ceps de no-*Saccharomyces* aïllades, sembrant-se als tres dies els mostos en fermentació amb el cep *Saccharomyces cerevisiae* 22 H, aïllada prèviament amb el raïm de aquesta Bodega, per a que este concloga el procés fermentatiu. Als vins elaborats, s'ha determinat la composició convencional i polifenólica i s'ha establert el seu perfil sensorial, amb la

finalitat de determinar els millors ceps de llevat presents en la vinya, i implementar-les en la vinificació, per a obtenir vins de major qualitat i personalitat, que potencien la composició polifenòlica dels vins i la seua valoració organolèptica. En general, en els vins de la varietat Merlot i Cabernet Sauvignon elaborats, la fermentació seqüencial amb ceps no-*Saccharomyces-Saccharomyces* 22 H, dóna lloc a un millor comportament polifenòlic i una millor valoració organolèptica, respecte als vins fermentats únicament amb el cep *Saccharomyces* 22 H. De tots els ceps assaïjats, ha sigut el cep no-*Saccharomyces* 42 d per als vins de Merlot, i el 58 E per als de Cabernet Sauvignon, els triats per a formar part d'un cultiu seqüencial mixt junt amb el de *Saccharomyces cerevisiae* 22 H.

**Paraules clau:** Llevat, *No-Saccharomyces*, polifenols, Cabernet Sauvignon, Merlot, tanins, antocians.

## ABSTRACT

Yeast strains that intervene in fermentation are responsible for much of the final characteristics of the wines, because they have a decisive influence on the colour, structure, aromatic composition, stability and food safety. The sequential sowing of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts, like what happens in the spontaneous fermentation of the grape must, contributes to increase the complexity of the wines and to improve their personality, due to the differential characteristics that non-*Saccharomyces* yeast strains can give to wines.

It is studied the effect of different strains of non-*Saccharomyces* yeast strains isolated in Cabernet Sauvignon and Merlot grapes, from Winery Chozas Carrascal, in the chemical and organoleptic composition of wines with them elaborated. For this purpose, individual fermentations have been made with each of the non-*Saccharomyces* yeast strains isolated, sowing it in the musts in fermentation with the strain *Saccharomyces cerevisiae* 22H, previously isolated in the grapes of this winery, so that strain concludes the fermentation process. In the elaborated wines, the conventional and polyphenolic composition has been determined and its sensory profile has been established, with the purpose of determining the best strains of yeast present in the vineyard, and to implement them in the fermentation, to obtain wines of higher quality and personality, which improve the polyphenolic composition of wines and their organoleptic valuation. In general, in wines of the Merlot and Cabernet Sauvignon variety elaborated, the sequential fermentation with non-*Saccharomyces-Saccharomyces* 22 H strains rise to a better polyphenolic behaviour and a better organoleptic valuation, compared to the wines fermented only with the *Saccharomyces* 22 H strain. Of all the strains tested, has been the strain non-*Saccharomyces* 42 d in Merlot wines, and the 58 E for those of Cabernet, chosen to be part of a mixed sequential fermentation together with the yeast *S. cerevisiae* 22H.

**Key words:** Yeast strains, *Non-Saccharomyces*, polyphenol, Cabernet Sauvignon, Merlot, tannins, anthocyanin.

## ÍNDICE

1. Introducción. ....	1
1.1. Generalidades. ....	1
1.1.1. El cultivo de la vid en España y la Comunidad Valenciana. ....	1
1.1.2. Las variedades Merlot y Cabernet Sauvignon. ....	1
1.2. La fermentación alcohólica de los vinos. ....	2
1.2.1. Las levaduras. ....	2
1.2.2. Levaduras <i>Saccharomyces</i> . ....	2
1.2.3. Levaduras no- <i>Saccharomyces</i> . ....	3
1.3. Los compuestos polifenólicos.....	4
1.3.1. Las interacciones entre los compuestos fenólicos.....	4
1.3.1.1. Condensación entre compuestos polifenólicos. ....	4
a. Condensación antociano-tanino. ....	5
b. Condensación tanino-antociano.....	5
1.3.1.2. Polimerización mediante unión con acetaldehído.....	5
1.4. Efecto de las levaduras sobre los compuestos fenólicos. ....	5
1.5. Selección de levaduras autóctonas.....	7
2. Justificación del trabajo y Objetivos.....	8
3. Materiales y métodos. ....	9
3.1. Materiales.....	9
3.2. Plan experimental. ....	9
3.2.1. Proceso de elaboración. ....	9
3.2.2. Diseño experimental. ....	11
3.3. Métodos analíticos. ....	12
3.3.1. Parámetros convencionales.....	12
3.3.2. Parámetros relacionados con el color. ....	12
3.3.2.1. Intensidad Colorante y matiz (Glories, 1978) ....	12
3.3.2.2. Concentración de antocianos totales. (Blouin, 1992) ....	12
3.3.2.3. Antocianos no decolorables por el sulfuroso (Ribéreau-Gayon, 1979) ....	13
3.3.2.4. Antocianos copigmentados, polimerizados y libres (Boulton, 2001). ....	13
3.3.3. Parámetros relacionados con la concentración de polifenoles. ....	13
3.3.3.1. Índice de Polifenoles Totales (IPT) y CFT (Glories, 1978).....	13
3.3.3.2. Taninos condensados totales (Ribéreau-Gayon, 1979). ....	13
3.3.3.3. Concentración de catequinas (Pompei y Peri, 1971).....	14
3.3.4. Parámetros relacionados con la calidad de los taninos. ....	14
3.3.4.1. Índice de Etanol (Glories, 1984).....	14

3.3.4.2. Índice DMACH (Vivas, 1994).....	15
3.3.4.3. Índice de PVPP (Blouin, 1977). ....	15
3.3.4.4. Índice de Gelatina (Glories, 1978). ....	15
3.3. Análisis sensorial de los vinos. ....	16
3.3 Tratamiento estadístico. ....	16
4. Resultados y discusión. ....	17
4.1. Influencia de las levaduras no- <i>Saccharomyces</i> en la variedad Merlot. ....	17
4.1.1. Parámetros convencionales de los vinos de Merlot. ....	18
4.1.2. Parámetros polifenólicos de los vinos de Merlot. ....	19
4.1.3. Análisis sensorial de los vinos de Merlot. ....	22
4.2. Influencia de las levaduras no- <i>Saccharomyces</i> en la variedad Cabernet Sauvignon. ....	24
4.2.1. Parámetros convencionales de los vinos de Cabernet Sauvignon. ....	24
4.2.2 Parámetros polifenólicos de los vinos de Cabernet Sauvignon. ....	25
4.2.3. Análisis sensorial de los vinos de Cabernet Sauvignon. ....	27
5. Conclusión. ....	29
6. Bibliografía. ....	30

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diagrama del proceso de elaboración. ....	10
<b>Tabla 1.-</b> Código y especie las levaduras utilizadas en la vinificación de la variedad Merlot. ....	11
<b>Tabla 2.-</b> Código y especie las levaduras utilizadas en la vinificación de la variedad Cabernet Sauvignon. ....	11
<b>Tabla 3.</b> Valores medios de los parámetros convencionales de los mostos de la variedad Merlot. ....	17
<b>Tabla 4.</b> Medias, desviación estándar y tratamiento estadístico ANOVA de los parámetros convencionales de los vinos de la variedad Merlot. ....	18
<b>Tabla 5.</b> Medias, desviación estándar y tratamiento estadístico ANOVA de parámetros relacionados con el color para los vinos de la variedad Merlot. ....	19
<b>Tabla 6.</b> Medias, desviación estándar y tratamiento estadístico ANOVA de parámetros relacionados con el color para los vinos de la variedad Merlot. ....	20
<b>Tabla 7.</b> Medias, desviación estándar y tratamiento estadístico ANOVA de los parámetros relacionados con la concentración de polifenoles para los vinos de la variedad Merlot. ....	21
<b>Tabla 8.</b> Medias, desviación estándar y tratamiento estadístico ANOVA de los parámetros relacionados con la calidad de los taninos para los vinos de la variedad Merlot. ....	22
<b>Tabla 9.</b> Medias y tratamiento estadístico ANOVA del análisis sensorial de los vinos de Merlot. ....	23
<b>Tabla 10.</b> Medias y desviación estándar de los parámetros del mosto de la variedad Cabernet Sauvignon. ....	24
<b>Tabla 11.</b> Medias, desviación estándar y tratamiento estadístico ANOVA de los parámetros convencionales de los vinos de la variedad Cabernet Sauvignon. ....	24
<b>Tabla 12.</b> Medias, desviación estándar y tratamiento estadístico ANOVA de parámetros relacionados con el color para los vinos de la variedad Cabernet Sauvignon. ....	25
<b>Tabla 13.</b> Medias, desviación estándar y tratamiento estadístico ANOVA de parámetros relacionados con el color para los vinos de la variedad Cabernet Sauvignon. ....	26
<b>Tabla 14.</b> Medias, desviación estándar y tratamiento estadístico ANOVA de los parámetros relacionados con la concentración de polifenoles para los vinos de la variedad Cabernet Sauvignon. ....	26
<b>Tabla 15.</b> Medias, desviación estándar y tratamiento estadístico ANOVA de los parámetros relacionados con la calidad de los taninos para los vinos de la variedad Cabernet Sauvignon. ....	27
<b>Tabla 16.</b> Medias y tratamiento estadístico ANOVA del análisis sensorial de los vinos de Cabernet Sauvignon. ....	28

# **1. Introducción.**

## **1.1. Generalidades.**

### **1.1.1. El cultivo de la vid en España y la Comunidad Valenciana.**

El mercado del vino es uno de los sectores más importantes y considerados tanto en el panorama nacional como en el autónomo. Según datos de la Oficina Internacional de la Viña y el Vino (OIV), se cifra la superficie mundial de viñedo en 7,5 millones de hectáreas. España se mantiene en la cima de la producción vinícola mundial con un 13% de la superficie mundial de viñedos, seguida muy de cerca por China, aunque cabe resaltar que su producción se centra más en uva para mesa y uva pasa.

En 2016, España se ha colocado la cuarta potencia exportadora de vino con un incremento del 0,7% respecto al año anterior. Además, se ha recuperado el consumo interno del país, contemplando el aumento en hostelería, el enoturismo y una considerable venta online.

La gran variedad de zonas climatológicas y variedad de suelos en España, traen la consecuencia de obtener vinos de características muy dispares, cosa que enriquece nuestro mercado.

En cuanto a las comunidades autónomas, cabe destacar a Castilla La Mancha como la principal comunidad productora. En lo referente a la Comunidad Valenciana, es la cuarta productora de vino en España, según MAPAMA, y en el año 2016 ha aumentado sus exportaciones.

### **1.1.2. Las variedades Merlot y Cabernet Sauvignon.**

La utilización de distintas variedades de la vid puede ser debida a distintas razones: utilidad, adaptación al clima, aroma, gusto del productor y potencialidad económica de la misma.

Entre las variedades más cultivadas en el mundo destacan la Merlot y la Cabernet Sauvignon. La variedad Cabernet Sauvignon con un 5% del área mundial, es la variedad más internacional. La variedad Merlot, aunque ocupa menor extensión, es considerada la segunda más importante para vinificación. Ambas variedades están extendidas por territorios tan diversos como Europa, Asia, América e incluso Australia.

La variedad Cabernet Sauvignon procede de la región de Burdeos, cuna de muchas variedades de uva, pero es la variedad más extendida por el mundo. De racimo cónico, con compacidad media y granos muy uniformes. Produce mostos de colores muy intensos y oscuros, así como vinos muy tánicos y con color estable, si las uvas alcanzan una buena madurez. Al tener un hollejo grueso se extraen en el proceso muchos taninos, cosa que permite un largo envejecimiento. Es una variedad muy utilizada en vinos polivarietales.

La variedad Merlot también procede del sudoeste de Francia, más concretamente de la región de Burdeos. Es una variedad de tamaño medio a pequeño, con una pronta maduración, cosa que la hace ideal para vinos jóvenes. Tiene una característica muy importante, como es que dependiendo del terreno en el que se desarrolle, dará diferentes personalidades de vino. Por último, 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 (VITIVINICULTURA).

## 1.2. La fermentación alcohólica de los vinos.

La fermentación alcohólica de los vinos es un proceso complejo que incluye un conjunto de transformaciones bioquímicas cuyo resultado es la transformación de los azúcares del mosto de la uva, glucosa y fructosa, en etanol como producto mayoritario y gas carbónico. Además, durante la fermentación se liberan sustancias como el glicerol, el ácido succínico, el ácido acético, alcoholes superiores, ésteres, y muchas más sustancias que influyen de forma determinante en la calidad final de los vinos. En estas transformaciones intervienen un gran número de enzimas producidas por diversas especies de levaduras, siendo la composición enzimática de estos microorganismos la que va a determinar las propiedades tecnológicas y sensoriales de los vinos después de la fermentación.

La fermentación alcohólica se puede producir de manera espontánea mediante los propios microorganismos del mosto, o inducirla inoculando levaduras seleccionadas, habitualmente de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* seleccionadas para llevar a cabo una adecuada fermentación. La inoculación puede ser en forma de levadura seca activa (LSA) o suspendida en un medio líquido. El objetivo de esta adición es controlar mejor las fermentaciones y conseguir calidad organoléptica y seguridad.

### 1.2.1. Las levaduras.

El rol principal de las cepas de levadura en el vino se ha ido volviendo más complejo a medida que se producía el aumento de la calidad de los vinos. En consecuencia, la elección de estas cepas es crucial para que estas sean capaces de mejorar los vinos en parámetros clave como el color, aroma, sabor, estructura y otros como la seguridad alimentaria y estabilidad.

Diversos estudios han puesto de manifiesto que la fermentación con distintas cepas de levaduras da lugar a vinos con diferente composición y con distinta calidad aromática y polifenólica (Morata *et al.*, 2012). Además, la utilización secuencial de distintas cepas de levaduras, tal como sucede en la fermentación espontánea, da lugar a vinos más complejos organolépticamente y con mayor variedad de compuestos. Es por ello, que se ha introducido el uso de levaduras no-*Saccharomyces* en cultivos iniciadores mixtos junto con *Saccharomyces cerevisiae*, que, no sólo son capaces de llevar a cabo la fermentación alcohólica, sino que también contribuyen a enriquecer el vino en compuestos tanto aromáticos como polifenólicos (Liu *et al.*, 2016).

Algunos investigadores sugieren que la fermentación secuencial de levaduras no-*Saccharomyces* junto con *Saccharomyces cerevisiae*, es la mejor estrategia de vinificación. Esto es así porque el comportamiento cinético se asemeja mucho a la fermentación espontánea, en la cual son siempre las cepas no-*Saccharomyces* las que comienzan la fermentación y aportan al vino características aromáticas específicas. Además, esta fermentación secuencial favorece la desaparición de las cepas débiles, y permite retrasar la inoculación de *S. cerevisiae* para que los rasgos que confieren las no-*Saccharomyces* puedan ser desarrollados (Lu *et al.*, 2015).

### 1.2.2. Levaduras *Saccharomyces*.

Las levaduras *Saccharomyces*, en concreto las *S. cerevisiae*, son las que terminan la fermentación alcohólica, y por tanto son las más utilizadas en la vinificación. Son levaduras que toleran altas concentraciones de etanol y además toleran las altas temperaturas de manera mucho más pronunciada que otras levaduras. En condiciones

de fermentación anaerobia, se genera gran cantidad de energía que se pierde en forma de calor (Bisson y Kunkee, 1991).

La especie *S.cerevisae* es producto de la domesticación (Gonçalves *et al.*, 2011). Es una especie muy favorable para la elaboración del vino ya que metaboliza glucosa y fructosa en condiciones tanto aerobias como anaerobias (González *et al.*, 2007). Además, tiene una capacidad idónea de crecimiento en mostos de uva con bajo contenido en sustancias nitrogenadas (Tiago *et al.*, 2012). Actualmente, diversas situaciones conducen a la búsqueda de otras cepas de levaduras fermentativas, como la elaboración de vinos con menor grado alcohólico, con mayor acidez o con mayor producción aromática. Estas cepas no convencionales incluyen las no-*Saccharomyces* (Ciani *et al.*, 2016).

### **1.2.3. Levaduras no-*Saccharomyces*.**

Las levaduras no-*Saccharomyces* se encuentran en el viñedo y en las propias uvas, y de forma espontánea realizan la primera fase de la fermentación alcohólica, pudiendo tener efectos beneficiosos en la calidad, pero también provocar algunos efectos indeseados. Las levaduras *Saccharomyces*, que también se encuentran de forma natural en el viñedo y por tanto en la uva, se imponen en un corto periodo de tiempo sobre las no-*Saccharomyces* y son las que terminan la fermentación alcohólica.

Tradicionalmente, las prácticas de inoculación buscaban limitar las levaduras no-*Saccharomyces* porque se creía que eran propensas a elevar la cantidad de compuestos no deseables, como el ácido acético, acetaldehído, acetona y acetato de etilo (Comitini *et al.*, 2011). Posteriormente se ha demostrado que las levaduras no-*Saccharomyces* poseen actividades enzimáticas que catalizan la formación de compuestos aromáticos volátiles a partir de precursores no volátiles (Hernández-Orte *et al.*, 2008). Además, las cepas de no-*Saccharomyces* tienen capacidad de producir compuestos aromáticos no asociados a la fermentación, tales como los monoterpenos (García *et al.*, 2002). También se han encontrado levaduras no-*Saccharomyces* capaces de reducir los niveles de etanol en los vinos (Heux *et al.*, 2006).

En general, las levaduras no-*Saccharomyces* son levaduras oxidativas y apiculadas, poco tolerantes al etanol, que van desapareciendo a medida que se produce este en la fermentación alcohólica y, posteriormente, son reemplazadas por las *S.cerevisiae*, mucho más resistentes al etanol. Durante la fermentación, las cepas de levadura no-*Saccharomyces* pueden ser más o menos resistentes, en función de diversos factores, tanto fisicoquímicos como microbiológicos.

En lo referente a factores fisicoquímicos, la temperatura de fermentación y la concentración de oxígeno son de los más determinantes. Cabe destacar que a menor temperatura hay mayor resistencia a etanol y, por tanto, mayor permanencia de las levaduras no-*Saccharomyces*. Hay que resaltar también que, cuanto menor sea la concentración de oxígeno, la permanencia es menor. En cuanto a los factores microbiológicos, la permanencia o supervivencia de las levaduras no-*Saccharomyces* depende de la cantidad de células viables de *S.cerevisiae* presentes en el medio fermentativo, que pueden provocar una interacción célula-célula, hecho que provoca la inhibición de las levaduras no-*Saccharomyces*.

### **1.3. Los compuestos polifenólicos.**

Los compuestos fenólicos del vino son metabolitos secundarios con estructuras químicas muy diversas, pero tienen en común uno o varios grupos fenol. La presencia de estos compuestos en la uva y, en consecuencia en el vino, depende de diversos factores como son el clima y el suelo, y además dependen de la variedad y de la madurez de la uva.

Los compuestos fenólicos son responsables de una parte importante de las características sensoriales de los vinos, tales como color, sabor, estructura, cuerpo, astringencia y longevidad. Estos compuestos presentes en la uva pasan al vino en mayor o menor grado en función de las técnicas de vinificación empleadas, extrayéndose durante el proceso de maceración de hollejos y pepitas con el mosto, y dando lugar a reacciones entre sí y con otros compuestos de la uva y del vino, que modifican de forma apreciable su composición y propiedades, y que tienen gran repercusión sobre la calidad final del vino.

Los compuestos polifenólicos los podemos clasificar como:

- No flavonoides: ácidos fenólicos, estilbenos.
- Flavonoides: flavanoles, flavanoles y antocianos.

La distribución de los polifenoles no es uniforme en la uva. Sobre un 60 % de los polifenoles de la uva se concentran en las pepitas, un 30 % en la piel y menos de un 10 % en raspón y pulpa. De todos los polifenoles presentes en las uvas, los antocianos y los taninos (flavanoles también llamados proantocianidinas), son los más abundantes.

Los antocianos se extraen generalmente del hollejo de las uvas durante la maceración y fermentación, son los responsables del color de los vinos y además tienen una relevancia muy importante en las reacciones de polimerización de los vinos durante su envejecimiento. En vinos con envejecimiento se ha demostrado que se modifica considerablemente el perfil de antocianos ya que después de unos años en crianza en barrica o botella muchas estructuras se modifican y aparecen otras nuevas (Hermosín y Gutierrez *et al.*, 2004).

Los taninos son compuestos que pueden encontrarse hidrolizados (los procedentes de la madera en los vinos de crianza en madera) y condensados. Los taninos condensados o proantocianidinas proceden de la uva, tanto de hollejos como de pepitas, y son resultantes de la polimerización de compuestos flavanoles simples, como catequinas y epicatequina. Confieren estructura, astringencia y estabilidad a los vinos.

#### **1.3.1. Las interacciones entre los compuestos fenólicos.**

En la elaboración y conservación de los vinos tienen lugar reacciones e interacciones entre los compuestos fenólicos del vino, que ocasionarán cambios estructurales que afectan al color e influyen en las características organolépticas.

##### **1.3.1.1. Condensación entre compuestos polifenólicos.**

Son debidas a que tanto antocianos como taninos pueden actuar como agentes electrofílicos (presentan deficiencia de electrones) y tienden a unirse con moléculas nucleofílicas (con exceso de electrones). Los antocianos pueden encontrarse libres y

combinados en el vino, fundamentalmente en combinación con los taninos mediante las llamadas reacciones de condensación.

#### **a. Condensación antociano-tanino.**

En su forma catiónica, los antocianos reaccionan con las posiciones negativas de los taninos (C6-C8). Esta relación provoca un flaveno incoloro que, en presencia de oxígeno, se puede colorear de rojo. Este compuesto formado es resistente a la decoloración por SO<sub>2</sub>.

#### **b. Condensación tanino-antociano.**

Las proantocianidinas, o 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 relativamente 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 formado es vulnerable a la decoloración por SO<sub>2</sub> y la hidratación.

#### **1.3.1.2. Polimerización mediante unión con acetaldehído.**

Los compuestos fenólicos como los antocianos y taninos también pueden unirse mediante la reacción de polimerización, en la que interviene el acetaldehído. La estabilidad del producto de esta reacción es consecuencia del grado de polimerización anterior de las moléculas de antocianos y taninos.

El acetaldehído actúa como puente de condensación (puente de etilo) y crea diferentes conjuntos dependiendo de qué tipo de moléculas se unan. 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 SO<sub>2</sub> 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 hemiacetálica) (Atanasova *et al.*, 2002). 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.

### **1.4. Efecto de las levaduras sobre los compuestos fenólicos.**

Las cepas de levadura que lleva a cabo la fermentación van a tener un efecto importante sobre los polifenoles, modificando el contenido polifenólico, así como el estado y estabilidad de los compuestos polifenólicos en el vino (Morata *et al.*, 2005; Bautista-Ortín *et al.*, 2007; Caboulet *et al.*, 2012).

Hay que tener en cuenta que las membranas de las levaduras están cargadas positivamente y los polifenoles tienen carga negativa. En consecuencia, por atracción electrostática los polifenoles son adsorbidos por las membranas celulares de las levaduras, y esta capacidad de absorción es distinta en función de la naturaleza de la levadura, ya que éstas presentan distintas cargas. Esto reduce la cantidad de

antocianos disponibles y da lugar a una menor intensidad colorante (Morata *et al.*, 2005). Esta capacidad de adsorción de antocianos por parte de la levadura varía en función de múltiples factores como la disponibilidad de nutrientes en el medio (biotina, piridoxina, tiamina, etc.) y la especie y cepa de levadura utilizada.

Chen *et al.* (2018) pusieron de manifiesto que diferentes cepas de *S. cerevisiae* reducían el contenido de flavonoles, taninos totales, y taninos responsables de la astringencia en vinos, influyendo el estado químico de antocianos y taninos en la reactividad de estos compuestos con las membranas de las levaduras, ocasionando mayor pérdida de compuestos cuanto mayor reactividad tengan, mientras que esta reactividad disminuye con la polimerización.

La actividad  $\beta$ -glucosidásica de las levaduras puede actuar hidrolizando el enlace glucosídico entre la antocianina y el azúcar correspondiente, dejando libre la antocianidina en forma aglicona y aumentando su desprotección ante la oxidación (Hernández *et al.*, 2003). En cambio, las levaduras también contribuyen a la estabilización de la materia colorante en el proceso de fermentación, debido a su capacidad de sintetizar compuestos carbonilo tales como acetaldehído y ácido pirúvico, y estos compuestos pueden actuar como precursores de la formación de piranoantocianos, moléculas más estables en el tiempo y no decolorables por el SO<sub>2</sub>, y que favorecen la condensación entre antocianos y taninos (Dournel *et al.*, 1985; Bautista-Ortín *et al.*, 2007; Caboulet *et al.*, 2012). La cantidad de precursores formados varía en función de la cepa de *Saccharomyces* que lleva a cabo la fermentación (Morata *et al.*, 2016).

Las levaduras fermentativas también pueden modificar la reactividad de los taninos del vino, ocasionando una disminución de su astringencia. Por una parte, las levaduras liberan polisacáridos de su pared celular durante la fermentación y la crianza sobre lías, debido a procesos de autólisis de las levaduras muertas, y esta capacidad de liberación de polisacáridos varía en función de la naturaleza de la cepa (Del Barrio-Galán *et al.*, 2012,; González-Royo *et al.*, 2013). Estos polisacáridos reaccionan con los taninos astringentes polimerizándolos y dificultando la unión de éstos a las glicoproteínas salivales, y por tanto disminuyendo la sensación de astringencia (Vidal *et al.*, 2003), favoreciendo además el crecimiento de bacterias lácticas, que a su vez van a producir más polisacáridos en su proceso de autólisis.

Todo ello pone de manifiesto la gran repercusión que tiene la cepa de levadura sobre la composición polifenólica de los vinos y sobre sus características organolépticas, de tal forma que no solo es posible modificar la calidad de los vinos en función de las cepas de levaduras que lleva a cabo la fermentación, sino también utilizar las distintas cepas de levaduras según el tipo de vino que se quiera elaborar; así, si queremos un vino joven pueden interesarnos levaduras que liberen rápidamente polisacáridos, mientras que en vinos destinados a crianza podría ser más interesante utilizar levaduras que se autolisen más lentamente, para obtener los polisacáridos durante la época de crianza (González *et al.*, 2013).

## 1.5. Selección de levaduras autóctonas.

Las especies microbianas que se encuentran en el mosto va a depender de las que se encuentran en la uva, que se pueden modificar en función de la climatología, estado fitosanitario y estado de maduración de la uva, así como de la flora presente en la bodega, que a su vez está influenciada por las prácticas de higienización realizadas, y la tecnología de la elaboración, especialmente la utilización de levaduras comerciales en la fermentación, que inhiben la actuación de las levaduras autóctonas de la uva (Chambers y Pretorius, 2010).

Las fermentaciones espontáneas con las levaduras que lleva la uva son cada vez menos frecuentes en la elaboración de vinos, debido a la gran diversidad de especies que pueden estar presentes, muchas de ellas negativas para la calidad del vino. En cambio, estas levaduras son diferentes en cada viñedo y eso contribuye a la tipicidad y originalidad del vino. Las levaduras comerciales, en cambio, aseguran una buena cinética fermentativa y la producción de compuestos beneficiosos para la calidad del vino, pues con ese criterio han sido seleccionadas, pero aportan homogeneidad a los vinos (Álvarez-Pérez *et al.*, 2012).

Tras años de hegemonía de las levaduras comerciales, debido a que consiguen una fermentación controlada y unas características organolépticas determinadas, actualmente se observa una tendencia a elaborar con las levaduras autóctonas de cada zona vitivinícola o variedad de uva, con la finalidad de elaborar vinos con las características diferenciales que le aportan las diferentes cepas presentes en los viñedos, y evitar que los vinos sean muy semejantes organolépticamente. Para evitar los riesgos que conllevaría una fermentación espontánea, que no permitiría la reproducibilidad y trazabilidad del proceso de fermentación y podría tener una repercusión negativa sobre la calidad de los vinos, las bodegas recurren a la selección de sus propias levaduras, tanto *Saccharomyces* como en cultivos iniciadores mixtos compuestos de no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces*.

En el proceso de selección de levaduras autóctonas se debe tener en cuenta que las levaduras seleccionadas se adapten a las características del mosto, tengan un adecuado poder fermentativo, y den lugar a compuestos favorables a la calidad sensorial y a la tipicidad de los vinos. Esta selección implica el aislamiento de un gran número de levaduras directamente de las uvas de un determinado viñedo o variedad de uva, y un proceso de caracterización enológica que asegure un buen comportamiento tecnológico y enológico de las levaduras seleccionadas (Gutiérrez *et al.*, 1995; Fleet, 2008). Es necesario también que el aislamiento de levaduras autóctonas se realice durante al menos dos años, ya que la climatología y las condiciones del cultivo pueden modificar la microbiota de las levaduras, apareciendo distintas cepas en distintas cosechas. Una cepa que ha sido seleccionada por sus cualidades durante dos o más años será una cepa resistente que se adapta bien a las condiciones climatológicas de la zona (Torija, 2002).

## 2. Justificación del trabajo y Objetivos.

En un mercado cada vez más diverso, se busca la obtención de vinos complejos y más atractivos desde el punto de vista organoléptico. En la elaboración de estos vinos juegan un papel muy importante la cepa o cepas de levaduras que lleven a cabo la fermentación, ya que éstas no solo son responsables de los aromas sintetizados durante la fermentación alcohólica, sino que la actividad enzimática de las levaduras también es responsable de la rotura por hidrólisis de los precursores aromáticos presentes en las uvas y por tanto de la liberación de estos aromas al mosto. Pero además, la cepa o cepas de levadura que lleva a cabo la fermentación tienen un efecto muy importante sobre el contenido y la composición polifenólica de los vinos, ya que no solo pueden ocasionar pérdidas de polifenoles por absorción sobre sus membranas celulares, sino que pueden modificar el estado y estabilidad de los compuestos polifenólicos presentes en la uva.

Por ello, cuando se aborda la selección de las levaduras más adecuadas para elaborar un vino tinto de calidad, resulta imprescindible estudiar el comportamiento de las distintas cepas de levadura fermentativas sobre la composición polifenólica de los vinos, así como establecer su efecto sobre las características organolépticas finales de los vinos, que es lo que va a apreciar el consumidor.

En el presente estudio se va a estudiar y evaluar el potencial de las levaduras no-*Saccharomyces* aisladas de las uvas de Merlot y Cabernet Sauvignon de la bodega Chozas Carrascal, para ser incluidos en cultivos iniciadores mixtos junto a la levadura *Saccharomyces* previamente seleccionada. Esta acción no se realiza sólo con la intención de que se lleve a cabo la fermentación alcohólica, sino que también se pretende un cambio en las características diferenciales de los vinos, buscando una mayor calidad y tipicidad.

Los objetivos parciales a alcanzar se especifican en los siguientes puntos:

Objetivo 1: estudiar el comportamiento tecnológico de las cepas de levaduras no-*Saccharomyces* aisladas de las uvas de Merlot y Cabernet Sauvignon de la bodega Chozas Carrascal, así como la composición polifenólica de los vinos después de la fermentación y las características organolépticas que aportan estas levaduras, para poder seleccionar aquellas que proporcionen a los vinos el mejor perfil polifenólico y las mejores características organolépticas.

Objetivo 2: diseñar cultivos iniciadores mixtos empleando las levaduras no-*Saccharomyces* más favorables para la calidad de los vinos, junto con la levadura *S. Cerevisiae* previamente seleccionada de las uvas de la Bodega Chozas Carrascal.

### **3. Materiales y métodos.**

#### **3.1. Materiales.**

Las cepas de levadura no-*Saccharomyces* fueron aisladas en la Universidad de Valencia, a partir de mostos de las variedades de uva Merlot y Cabernet Sauvignon, de la Bodega Chozas Carrascal.

La cepa *Saccharomyces cerevisiae* 22H fue aislada en la Universidad de Valencia, a partir de mostos de las variedades de uva Merlot y Cabernet Sauvignon, de la Bodega Chozas Carrascal, y seleccionada por sus características tecnológicas y organolépticas en el Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo de la Universidad Politécnica de Valencia.

Las uvas de las variedades Merlot y Cabernet Sauvignon proceden de la Bodega Chozas Carrascal, situada en la población de San Antonio de Requena, a medio camino entre las poblaciones de Requena y Utiel. La bodega fue fundada en el año 1990 por la familia López-Peidro, realizándose la primera vinificación en 2003, la obtención de la certificación de Viñedo Ecológico en 2010, y la Denominación Vino de Pago en 2015.

Las uvas, una vez recolectadas manualmente en cajas de 10 kg, fueron despalladas y congeladas en el Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo. Un día antes de comenzar la elaboración de los vinos, se sacaron de las cámaras para su descongelación y procesado.

#### **3.2. Plan experimental.**

##### **3.2.1. Proceso de elaboración.**

Las uvas despalladas, una vez descongeladas, se separaron en distintos lotes. El despallado manual fue realizado antes de la congelación, para que los taninos presentes en el raspón de las uvas no interfiriesen en el contenido polifenólico de los vinos y no aporten compuestos herbáceos.

El diagrama del proceso de elaboración de los vinos se recoge en la figura 1. El procesado comenzó con el pesado de las uvas en lotes de 1,4 Kg, seguido de un estrujado y encubado en botes y posterior sulfitado a razón de 50 mg/Kg de anhídrido sulfuroso, y de 200 mg/Kg de dimetildicarbonato, con la finalidad de reducir al máximo la carga microbiana del mosto

El DMDC es un aditivo que se utiliza en vinos como germicida, sobre todo en las primeras horas de recolección de la uva y descarga, ya que actúa sobre las propias bacterias y levaduras de la uva, pero tiene un tiempo de degradación corto, de unas 4 horas. Está autorizado desde 2006. La adición de DMDC se realizó entre 1 y 2 horas antes de la inoculación de las levaduras.

Durante la fermentación alcohólica del vino, se realizaban bazuqueos diarios en todos los tarros con microvinificaciones. Este bazuqueo tiene como objetivo principal la extracción de polifenoles, además de favorecer la distribución uniforme de levaduras, evitar la acetificación del sombrero, facilitar el desprendimiento de carbónico y provocar una considerable aireación del mosto.

La temperatura a la que se realizó la fermentación alcohólica fue relativamente baja, 25-26°C, hasta llegar a su fin a los 10 días con una bajaba a los 23°C al final de la fermentación. Una vez concluida esta, se sembraron bacterias lácticas, necesitando los vinos entre 15 y 20 días para concluir la fermentación maloláctica. El seguimiento de esta fermentación se realizó mediante cromatografía de papel, y una vez concluida se trasegaron los vinos y sulfitaron a razón de 30 mg/L de sulfuroso libre, y se embotellaron y se dejaron reposar entre 3 semanas y 1 mes en botella. Posteriormente se realizaron los análisis de compuestos convencionales y polifenólicos.

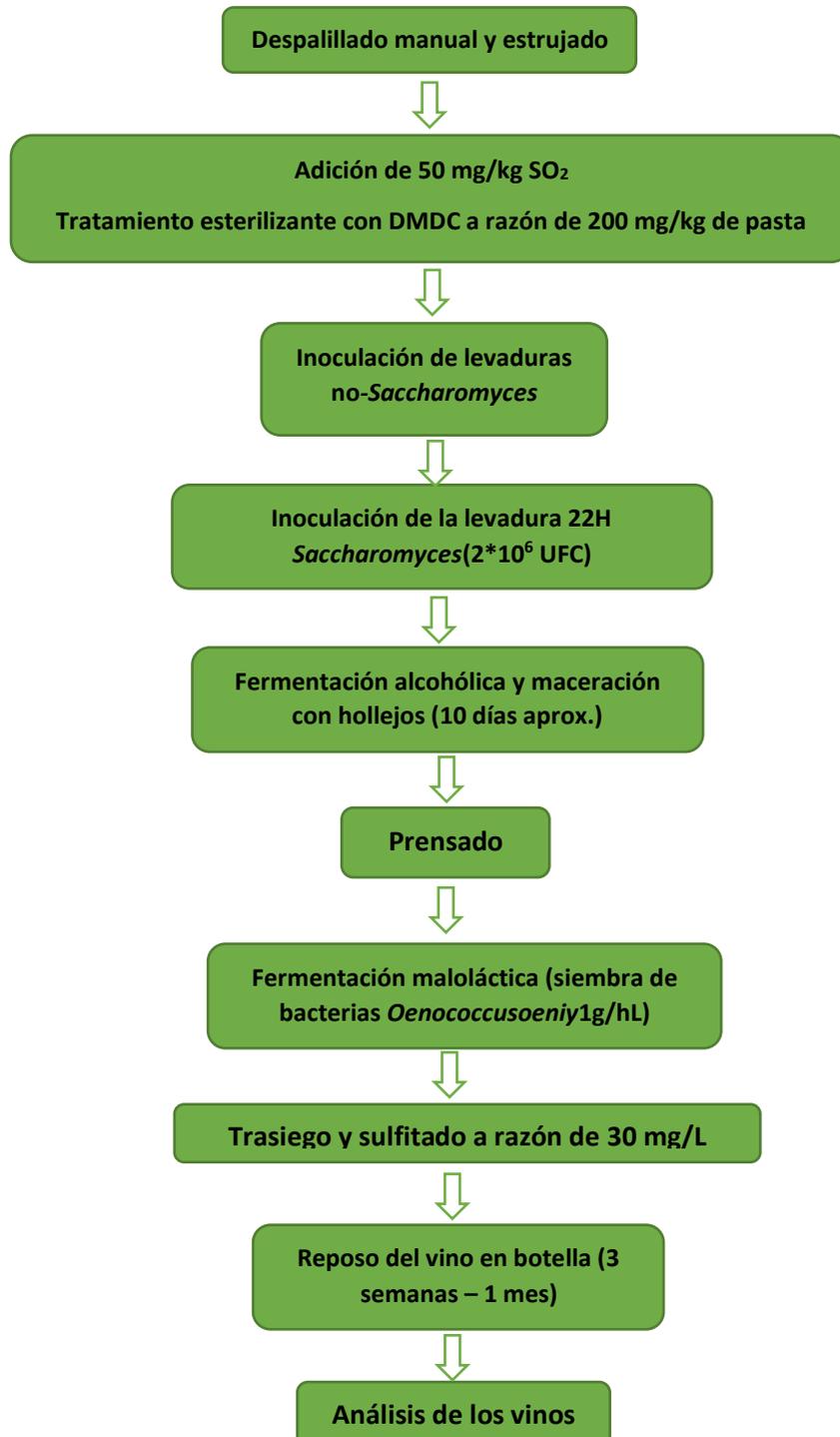


Figura 1. Diagrama del proceso de elaboración.

### 3.2.2. Diseño experimental.

En las Tablas 1 y 2 figuran las cepas de levaduras no-*Saccharomyces* previamente aisladas utilizadas en las microvinificaciones, con la especie a la que pertenecen. Todas ellas fueron aisladas a partir de la flora propia de cada variedad de uva del Pago Chozas Carrascal. Aunque el número de cepas presentes en las uvas fue superior, tras una primera selección mediante pruebas biológicas se decidió vinificar con las cepas referidas a continuación, comprobándose previamente que eran diferentes por el método de ADN mitocondrial.

Se realizaron 16 microvinificaciones (1 de ellas testigo) por triplicado para la variedad Merlot, y 10 microvinificaciones (1 de ellas testigo) por triplicado, para la variedad Cabernet Sauvignon. En total se realizaron 78 microvinificaciones en tarros de vidrio, con 1,4 kg de pasta despalillada.

**Tabla 1.-**Código y especie las levaduras utilizadas en la vinificación de la variedad Merlot.

Cepa	Identificación por secuenciación (especie)
1g	<i>Hanseniaspora opuntiae/uvarum</i>
15c	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
15d	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
15e	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
15f	<i>Hanseniaspora opuntiae/guilliermondii</i>
15h	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
15i	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
40	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
42b	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>
42c	<i>Hanseniaspora uvarum/opuntiae/meyeri</i>
42d	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
42e	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>
42f	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>
42k	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
42l	<i>Hanseniaspora uvarum</i>

**Tabla 2.-**Código y especie las levaduras utilizadas en la vinificación de la variedad Cabernet Sauvignon.

Cepa	Secuenciación (especie)
25b	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
26d	<i>Torulaspota delbrueckii</i>
30a	<i>Hanseniaspora valbyensis</i>
52	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
54	<i>Starmarella bacillaris</i>
55	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
58a	<i>Torulaspota delbrueckii</i>
58c	<i>Lachancea thermotolerans</i>
58e	<i>Torulaspota delbrueckii</i>

Al cabo de 3 días de inoculadas las cepas no-*Saccharomyces*, se inoculó *S. cerevisiae* cepa 22H, que había sido aislada y seleccionada de las uvas de Merlot y Cabernet Sauvignon. Esta *Saccharomyces* es la más abundante en las uvas de la bodega y es la que había dado lugar, en la selección de cepas *Saccharomyces* realizada el año anterior, a los vinos con mejor concentración polifenólica y más valorados organolépticamente.

### 3.3. Métodos analíticos.

#### 3.3.1. Parámetros convencionales.

La determinación de los parámetros convencionales en mostos y vinos se ha realizado siguiendo los métodos que se recogen en el Reglamento Oficial de la Unión Europea (2676/1990):

1. Mediante un refractómetro se realiza la determinación de los **sólidos solubles totales (° Brix)**.
2. El valor de **pH** se determinó mediante un pH-metroCrisón 507.
3. La **Acidez Total** (g/L de Acido tartárico) es la suma de todos los ácidos cuando se lleva el vino a pH 7,0. La medición se realiza mediante una reacción ácido-base realizando valorando los ácidos presentes con hidróxido sódico 0,1 N, hasta pH 7.0, con el PH-metro Crisón 507.
4. La **acidez volátil** es el conjunto de ácidos de la serie acética presentes en el vino. El que se presenta con mayor porcentaje es el ácido acético. Se valora por el método oficial de arraste-destilación y posterior valoración con hidróxido sódico 0,25 N, hasta pH 7.0.
5. El **grado alcohólico** de los vinos se determina por destilación siguiendo el método oficial.
6. Los **azúcares reductores** se determinan al final de la fermentación para comprobar que está terminada. Por legislación, un vino seco debe contener 5g/L o menos de azúcar, considerándose como óptimo entre 2 y 3,5 g/L. El método utilizado fue el Método Fehling.

#### 3.3.2. Parámetros relacionados con el color.

El color del vino tinto depende de la concentración de antocianos libres, de las combinaciones tanino-antociano, de los taninos y también por otros parámetros como pH, temperatura, SO<sub>2</sub> libre y aireaciones.

##### 3.3.2.1. Intensidad Colorante y matiz (Glories, 1978)

Los parámetros que generalmente definen el color son la intensidad colorante (IC) y el matiz o tonalidad, que indica la importancia del color amarillo frente al rojo.

Estos, se determinan mediante la medida de la absorbancia a 420,520 y 620 nm en cubeta de 1 mm frente a un blanco de agua destilada. Se multiplica por 10 por utilizarse esta misma cubeta.

Las fórmulas para el cálculo de los parámetros son:

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

$$\text{Matiz o Tonalidad (T)} = (A_{420} / A_{520}) \times 100$$

##### 3.3.2.2. Concentración de antocianos totales. (Blouin, 1992)

Para esta determinación, se toman 0,2 mL de muestra de vino, previamente centrifugada y se le añaden 3,8 mL de HCl 1 M. Se agita y se deja reposar durante 3 horas. Siempre deben realizarse las medidas de la absorbancia antes de las 24 horas. Estas medidas son a 280,320 y 520 nm con ambas lámparas (deuterio y halógeno) y con una cubeta de 10 mm. El blanco es de HCl 1 M.

Se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Antocianos (mg/L)} = A_{520} \times 20 \times 20 (\text{dilución } 1/20)$$

### **3.3.2.3. Antocianos no decolorables por el sulfuroso (Ribéreau-Gayon, 1979)**

Los antocianos libres son decolorables por el sulfuroso y por tanto varían su color en función del pH. Esta reacción sucede también con una parte de los combinados, aunque hay una fracción que no se decolora. Esta fracción es la que se determina en este método (ya que la determinación de antocianos por variación de pH es muy sensible a la presencia de sulfuroso libre) y representa una estimación de la cantidad total de antocianos.

En el método, se prepara una solución inicial o mezcla con vino, etanol y HCL. Posteriormente, se preparan dos tubos de ensayo, los cuales uno se añade 2,5 mL de mezcla y 1 mL de agua (tubo d<sub>1</sub>) y en el otro 2,5 mL de mezcla y 1 mL de bisulfito de sodio al 15 % (tubo d<sub>2</sub>). Se lee la absorbancia de ambos a 520 nm en una cubeta de 10 mm de vidrio o cuarzo.

La cantidad de antocianos se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{Antocianos (mg/L)} = 875 \times (d_1 - d_2)$$

siendo 875 el coeficiente de extinción molar de la malvidina corregido para dar en mg/L.

### **3.3.2.4. Antocianos copigmentados, polimerizados y libres (Boulton, 2001).**

Para determinar el porcentaje de antocianos copigmentados, libres y polimerizados, se ajustan las muestras a pH 3,60 y se filtran a través de una membrana de 0,45 µm de tamaño de poro. De esta forma no existen condiciones particulares para cada muestra y se obtiene una base racional para comparar los componentes del color. Se añaden 20 µL de una solución de acetaldehído al 10% a 2 mL de muestra. Después de 45 minutos se mide su absorbancia a 520 nm (A<sup>acet</sup>). Por otra parte, se ponen 100 µL de muestra en 1900 µL de solución tampón y después de algunos minutos se mide su absorbancia a 520 nm (A<sup>20</sup>). Por último, se añaden 160 µL de SO<sub>2</sub> a 2 mL de la muestra y se mide su absorbancia a 520 nm (A<sup>SO<sub>2</sub></sup>). Los resultados se expresan en porcentaje, y se calculan según las fórmulas descritas en el método.

## **3.3.3. Parámetros relacionados con la concentración de polifenoles.**

### **3.3.3.1. Índice de Polifenoles Totales (IPT) y CFT (Glories, 1978).**

El IPT proporciona el valor total de los compuestos polifenólicos en el vino por medida de la absorbancia a la longitud de onda que escinde el fenol.

Para ello, se diluye el vino en una proporción 1/50 y se mide la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm con una cubeta de cuarzo frente a agua destilada. Esta longitud de onda es en la cual el núcleo bencénico tiene su máxima.

Por tanto, se expresa así:  $\text{IPT} = A_{280} \times 50$  (dilución)

Se pueden expresar en forma de concentración multiplicando el valor de IPT por 0,08 o 80 que es el factor de corrección para el ácido gálico. Para los compuestos fenólicos totales (CFT) corresponde la siguiente fórmula:

$$\text{CFT (g/L)} = 0,08 \times A_{280} \times 100$$

### **3.3.3.2. Taninos condensados totales (Ribéreau-Gayon, 1979).**

En vinos que no han pasado por madera los taninos existentes son condensados y son resultantes de la polimerización de compuestos fenólicos como catequinas y las proantocianidinas. Las proantocianidinas son capaces de ser transformadas

parcialmente en antocianidinas rojas por calentamiento en medio ácido, cosa que provoca rupturas en algunas uniones y formaciones de carbocationes que se transforman en parte en cianidina y catequinas (reacción de Bete-Smith). Este método consiste en evaluar esta reacción para la detección de los taninos.

El vino previamente centrifugado, se diluye en proporción 1/50 y se coloca 1 mL de dilución en dos tubos. Se añaden a cada uno de ellos 0,5 mL de agua destilada y 3 mL de HCL 12N para producir este medio ácido. Uno de ellos se mete en un baño maría a 100°C durante 30 minutos y se tapa con papel de aluminio (Tubo A<sub>1</sub>) y el otro se deja a temperatura ambiente (A<sub>2</sub>).

Se lee las absorbancias a 550 nm en cubetas de 10 mm, habiendo añadido previamente 0,5 mL de etanol al 96% y utilizando agua destilada como blanco.

Por tanto, el cálculo de la concentración sería:

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

siendo 19,33 el coeficiente de extinción molar de la cianidina obtenida por hidrólisis ácida de los taninos condensados.

### **3.3.3.3. Concentración de catequinas (Pompei y Peri, 1971).**

Las catequinas son compuestos fenólicos presentes en el vino y que, junto a otros polímeros forman el grupo de los taninos. Su polimerización da lugar a proantocianidinas o taninos condensados. Su determinación se fundamenta en el estudio de la capacidad de condensación de las catequinas con compuestos carbonílicos en medio ácido. Este medio ácido lo produce la reacción con HCL al 35 %. El reactivo que se utiliza es la vainillina 1% en metanol por su elevada estabilidad a la acidez.

Se realizan dos tubos de ensayo diferentes, uno con vainillina (A) y otro sin ella (B) y se leen absorbancias a 500 nm.

$$A_{\text{Catequinas}} = A_{\text{TUBO A}} - A_{\text{TUBO B}}$$

La relación catequinas/taninos se obtiene dividiendo ambas absorbancias. A mayor polimerización, menores valores.

### **3.3.4. Parámetros relacionados con la calidad de los taninos.**

#### **3.3.4.1. Índice de Etanol (Glories, 1984).**

Es posible determinar el porcentaje de taninos combinado con polisacáridos, péptidos y proteínas aumentando el grado alcohólico del vino con etanol al 96%.

Este procedimiento consiste en adicionar 4,5 mL de etanol al 96% a 0,5 mL de vino previamente centrifugado y dejar reposar durante 24 horas para que precipite. Posteriormente, se centrifuga y se toma el sobrenadante diluyéndolo con agua destilada en proporción 1/10. La dilución total del vino será 1/100. Se mide la absorbancia a 280 nm en cubeta de 10 mm. Estos valores serán A<sub>2</sub>.

Por otra parte, el valor de A<sub>1</sub> será el del IPT, ya que es la misma medida, pero la dilución se ha hecho totalmente con agua destilada.

Así pues, el índice de etanol se calculará como:

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

Cuanto mayor sea este índice, mayor es la polimerización de los polifenoles con sales, péptidos y polisacáridos.

### 3.3.4.2. 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 el aldehído p-dimetilaminoacetaldehído (DMACH).

El método consiste en diluir 1/20 el vino centrifugado con metanol. Se introduce 0,5 mL de diluido con 2,5 mL de reactivo DMACH y se lee la absorbancia de la mezcla a 640 nm con un blanco de metanol. Esta medida será Dm. A su vez, se realiza un testigo, que será Dt, con una mezcla de 0,5 mL de diluido con 2,5 mL de metanol y se lee la absorbancia con los mismos parámetros. Por tanto:

$$A_{DMACH} = Dm - Dt$$

$$\text{Índice DMACH} = (A_{DMACH} / [\text{Taninos}]) \times 100$$

### 3.3.4.3. Índice de PVPP (Blouin, 1977).

El Índice de Polivinilpirrolidona (PVPP) indica el porcentaje de antocianos combinados con los taninos. La mayor concentración de combinaciones justifica una mayor contribución de los antocianos al color (presentan un rojo más intenso) y sobre todo la estabilidad del color, evitando la oxidación de antocianos.

El método sigue la siguiente fórmula:

$$\text{I.PVPP (\%)} = [(D_{0_0} - D_{0_1}) / D_{0_0}] \times 100$$

Siendo:

- D<sub>0<sub>0</sub></sub>: valor igual a la determinación de IPT.
- D<sub>0<sub>1</sub></sub>: cantidad de polifenoles no fijados por PVPP.
- D<sub>0<sub>0</sub></sub> - D<sub>0<sub>1</sub></sub>: cantidad de antocianos combinados con los taninos en la disolución. Corresponden a los polifenoles fijados por PVPP.

### 3.3.4.4. Índice de Gelatina (Glories, 1978).

El Índice de Gelatina valora el porcentaje de taninos capaces de reaccionar con las proteínas, es decir, los taninos astringentes. A mayor astringencia, mayor valor del Índice. Se prepara una solución de gelatina. En un tubo de ensayo se mezclan 5 mL de vino y 1 mL de la solución de gelatina y se dejan en nevera 3 días. Una vez pasado este tiempo se centrifuga el contenido y se separa el sobrenadante. Se determinan los taninos en el sobrenadante, que serán los que no han precipitado y, por tanto, los NO ASTRINGENTES.

$$\text{Tan. cond. NO ASTRINGENTES (g/L)} = (A_1 - A_2) \times 19,33$$

- A<sub>1</sub>: tubo que se tapa y se protege de la luz con papel de aluminio. Después se mete 30 minutos se lleva a baño maría a 100 °C y se enfría rápidamente.
- A<sub>2</sub>: tubo que se deja a temperatura ambiente.

A ambos tubos se les añade 0,5 mL de etanol absoluto (96%) y se lee absorbancia a 550 nm.

Para conocer los TANINOS ASTRINGENTES utilizamos el valor de los taninos condensados totales, que será el valor multiplicado por 0,833 ya que en el Índice de Gelatina se hace la dilución 5/6 que no se hace para los taninos condensados totales. Así pues:

$$\text{Índice de Gelatina (\%)} = 100 \times (T_{\text{tot}} \times 0,833 - T_{\text{no astringentes}}) / T_{\text{tot}} \times 0,833$$

que corresponde al porcentaje de los taninos condensados que ha precipitado la gelatina y que son los que producen astringencia.

### **3.3. Análisis sensorial de los vinos.**

Los vinos fermentados con las distintas cepas de levaduras *no-Saccharomyces* juntamente con la cepa *Saccharomyces* 22H, fueron catados por un panel de ocho catadores expertos, en una sala de catas estandarizada. Las catas se realizaron independientemente para los distintos vinos varietales, realizándose inicialmente una cata triangular para las tres repeticiones de cada vino, procediéndose a su mezclado cuando no se observaban diferencias entre ellos. La cata descriptiva y cuantitativa se realizó en una sesión con los 16 vinos de Merlot y otra para los 10 de Cabernet, utilizando como referencia los vinos elaborado exclusivamente con la cepa *S. cerevisiae* 22H.

La ficha de cata contempla la valoración cuantitativa de una serie de parámetros sensoriales, que se clasificarán con una puntuación de 0 a 10, tales como matiz e intensidad de color, intensidad y calidad del aroma, aroma a frutas rojas, negras, regaliz, vegetal, floral y especiado, intensidad y calidad del gusto, dulzor, viscosidad, amargor, astringencia, estructura, persistencia aromática y calidad global.

### **3.3 Tratamiento estadístico.**

Los tratamientos estadísticos han consistido en la realización de análisis de la varianza (ANOVA simple), que engloba una serie de métodos estadísticos para contrastar diferencias entre las medias de varios grupos de datos. El propósito era establecer, mediante un contraste de hipótesis y con un nivel de confianza alto (95 %), si el efecto de la cepa de levadura es significativo o no para los grupos de datos estudiados, es decir, si la aportación relativa de cada una de ellas a la variación total es significativa o no. Para ello se estudió parámetro a parámetro la existencia o no de diferencias significativas, en función de las cepas de levaduras utilizadas en la vinificación y en función de la variedad de uva con la que se elaboraron los vinos. Una vez observado esto, se procedió a descartar las que no cumplían con los requisitos previamente establecidos, y a seleccionar aquellas que dieron lugar a vinos de mayor calidad polifenólica y organoléptica.

Todo ello se realizó mediante el “software” estadístico “Statgraphics5. Plus”.

## 4. Resultados y discusión.

A continuación, se exponen los resultados obtenidos al analizar la composición de los vinos elaborados con las cepas *no-Sacharomyces* seleccionadas de la flora indígena de las variedades de uvas Merlot y Cabernet Sauvignon presentes en la bodega Chozas Carrascal de la Denominación de Origen Utiel-Requena.

Para la variedad Merlot se han seleccionado 16 perfiles de levaduras *no-Sacharomyces* y 10 para la variedad para Cabernet Sauvignon. Con cada una de estas cepas se han realizado tres vinificaciones, realizándose también un testigo por triplicado para cada variedad.

En los vinos elaborados se han determinado los parámetros convencionales y polifenólicos, así como la valoración sensorial de los mismos, con el fin de establecer cuáles serían las levaduras *no-Sacharomyces* que dan lugar a los vinos de mayor calidad, para proceder a su multiplicación y utilización como levadura iniciadora, junto con la cepa *S.cerevisiae* 22H previamente seleccionada.

### 4.1. Influencia de las levaduras *no-Saccharomyces* en la variedad Merlot.

En la Tabla 3 se recogen los valores medios de °Baumé, acidez total y pH de los mostos que van a ser posteriormente fermentados. Como puede observarse hay una gran homogeneidad en la composición de los mostos procedentes de las uvas Merlot, lo que resulta imprescindible para poder atribuirle las diferencias en la composición de los vinos a las cepas de levaduras que van a llevar a cabo la fermentación, y no a la distinta composición de los mostos.

**Tabla 3.** Valores medios de los parámetros convencionales de los mostos de la variedad Merlot.

MERLOT	° Baumé	Acidez Total	pH
42 e	12,86 ± 0,76	6,25 ± 0,11	3,61 ± 0,01
15e	12,86 ± 0,70	6,05 ± 0,32	3,74 ± 0,02
1g	12,86 ± 0,47	6,32 ± 0,26	3,71 ± 0,04
42b	12,84 ± 0,28	6,41 ± 0,31	3,69 ± 0,05
42d	12,86 ± 0,41	6,15 ± 0,22	3,73 ± 0,03
42f	12,86 ± 0,40	5,99 ± 0,14	3,65 ± 0,03
42k	12,87 ± 0,46	5,85 ± 0,16	3,72 ± 0,03
42l	12,86 ± 0,30	5,98 ± 0,25	3,83 ± 0,05
42c	12,90 ± 0,10	5,88 ± 0,16	3,75 ± 0,06
40	12,91 ± 0,52	5,95 ± 0,34	3,82 ± 0,05
15c	12,90 ± 0,45	5,99 ± 0,25	3,73 ± 0,03
15d	12,86 ± 0,57	5,81 ± 0,31	3,80 ± 0,03
15f	12,83 ± 0,65	6,32 ± 0,22	3,73 ± 0,04
15h	12,93 ± 0,64	6,03 ± 0,13	3,61 ± 0,05
15i	12,93 ± 0,30	5,74 ± 0,21	3,63 ± 0,06
T	12,87 ± 0,23	6,27 ± 0,32	3,74 ± 0,06
MEDIA	12,875	6,061	3,719

#### 4.1.1. Parámetros convencionales de los vinos de Merlot.

En la tabla 4 se recogen la media, desviación estándar y ANOVA para los parámetros convencionales determinados en los vinos de Merlot.

**Tabla 4.** Medias, desviación estándar y tratamiento estadístico ANOVA de los parámetros convencionales de los vinos de la variedad Merlot.

MERLOT	ACID. TOT(g/L)	pH	ACID. VOL (g/L)	GRADO (% vol/vol)	AZÚCARES (g/L)
42 e	6,08 ± 0,30 bc	3,70 ± 0,02 a	0,67 ± 0,11 bcd	12,83 ± 0,23 bcd	1,63 ± 0,07 b
15e	5,90 ± 0,41 bc	3,94 ± 0,02 d	0,89 ± 0,10 d	12,83 ± 0,15 bcd	1,16 ± 0,11 a
1g	6,15 ± 0,20 d	3,81 ± 0,03 bc	0,60 ± 0,15 ab	12,70 ± 0,20 abc	1,34 ± 0,06 a
42b	6,25 ± 0,11 d	3,81 ± 0,08 abc	0,88 ± 0,07 d	12,80 ± 0,26 abc	1,61 ± 0,05 a
42d	5,81 ± 0,45 bcd	3,87 ± 0,04 bcd	0,63 ± 0,06 bc	12,57 ± 0,12 ab	1,47 ± 0,14 a
42f	5,75 ± 0,16 abc	3,83 ± 0,06 abc	0,60 ± 0,04 ab	12,77 ± 0,12 abc	1,31 ± 0,02 a
42k	5,58 ± 0,19 abc	3,83 ± 0,02 abc	0,63 ± 0,04 abc	12,97 ± 0,23 bcd	1,64 ± 0,18 b
42l	5,40 ± 0,46 ab	3,91 ± 0,10 bc	0,62 ± 0,04 abc	12,67 ± 0,12 a	1,18 ± 0,13 a
42c	5,77 ± 0,19 abc	3,86 ± 0,08 bc	0,68 ± 0,02 abc	12,97 ± 0,23 abc	1,39 ± 0,08 a
40	5,75 ± 0,48 bcd	3,90 ± 0,08 bc	0,54 ± 0,02 ab	12,70 ± 0,35 abc	1,18 ± 0,05 a
15c	5,85 ± 0,27 abc	3,89 ± 0,04 bc	0,56 ± 0,13 ab	12,64 ± 0,12 a	1,43 ± 0,09 a
15d	5,50 ± 0,11 ab	3,93 ± 0,04 d	0,51 ± 0,04 a	13,27 ± 0,15 e	1,39 ± 0,02 a
15f	6,10 ± 0,26 cd	3,85 ± 0,06 bc	0,51 ± 0,04 a	13,10 ± 0,20 de	1,31 ± 0,05 a
15h	5,80 ± 0,19 bcd	3,71 ± 0,22 a	0,66 ± 0,13 abc	12,70 ± 0,26 abc	1,28 ± 0,15 a
15i	5,18 ± 0,27 a	3,77 ± 0,02 ab	0,81 ± 0,06 cd	12,83 ± 0,31 bc	1,54 ± 0,12 ab
T	6,19 ± 0,65 d	3,83 ± 0,13 abc	0,77 ± 0,13 d	13,13 ± 0,75 de	1,48 ± 0,08 ab

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas al 95%

Se puede observar que existen diferencias significativas en los parámetros convencionales de los vinos de Merlot elaborados con las distintas cepas de levaduras no-*Saccharomyces*, pero estas diferencias no son vinculantes, ya que todos los parámetros están dentro de la normalidad y son perfectamente compatibles con un vino tinto de calidad. Podemos observar que las distintas cepas de levaduras dejan los vinos secos, ya que la pequeña cantidad de azúcares reductores presentes se corresponden con azúcares no fermentables. Tanto la acidez total como el pH son adecuados para un vino elaborado en una zona cálida, y las pequeñas diferencias observadas en el grado alcohólico de los vinos pone de manifiesto que el rendimiento en alcohol es diferente según la cepa que se utilice, ya que el grado Baumé inician era similar en todas las vinificaciones. Se puede establecer que, dependiendo de la añada, en vendimias con insuficiente madurez podría interesarnos una levadura con mayor transformación en alcohol, como las cepas 15d y 15f, mientras que en años muy cálidos podría ser interesante una con menor rendimiento, tales como la 42l o la 15c.

Por último, cabría decir que las diferencias encontradas no son de gran relevancia desde el punto de vista enológico. La única cepa no recomendable por la elevada acidez volátil que produce es la cepa de levadura 15e, que, aunque su valor está dentro de lo permitido, tendría impacto negativo desde el punto de vista organoléptico.

#### 4.1.2. Parámetros polifenólicos de los vinos de Merlot.

En las tablas 5, 6, 7 y 8, se recogen los valores medios, desviación estándar y resultados del tratamiento estadístico ANOVA para los parámetros polifenólicos de la variedad Merlot.

**Tabla 5.** Medias, desviación estándar y tratamiento estadístico ANOVA de parámetros relacionados con el color para los vinos de la variedad Merlot.

CEPA	IC	Tono
42 e	6,63 ± 0,91 abc	83,14 ± 9,60 abc
15e	7,21 ± 0,56 bc	75,68 ± 3,25 cde
1g	8,32 ± 0,46 d	61,43 ± 1,60 a
42b	6,53 ± 0,68 ab	77,30 ± 1,76 e
42d	8,14 ± 0,48 d	66,66 ± 3,52 bcd
42f	8,20 ± 0,69 d	69,80 ± 0,99 abc
42k	9,47 ± 0,74 e	65,23 ± 1,72 ab
42l	7,34 ± 0,38 c	74,01 ± 8,15 bcd
42c	6,63 ± 0,58 abc	67,14 ± 3,09 abc
40	7,04 ± 0,77 abc	78,00 ± 4,24 de
15c	7,16 ± 0,57 abc	74,91 ± 3,46 abc
15d	6,67 ± 0,77 abc	74,13 ± 7,20 e
15f	7,18 ± 0,39 bc	63,32 ± 5,96 abc
15h	6,45 ± 0,56 a	68,56 ± 4,32 bcd
15i	7,13 ± 0,49 abc	75,38 ± 2,85 bcd
T	8,82 ± 0,69 de	79,78 ± 3,20 e

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas al 95%

La Intensidad Colorante es un parámetro muy apreciado en el vino, pues nos indica la carga de color que este tiene. La intensidad de color de un vino dependerá de la variedad de uva, del grado de madurez, de las técnicas de extracción de polifenoles durante la fermentación, de las levaduras utilizadas y de la intensidad de las pérdidas de color que tienen lugar durante la fermentación y conservación. En estos vinos, la cepa 42k es la que mantiene mejor el color, no observándose diferencias entre ella y los vinos testigo, también las cepas 42d, 42f y 1g muestran un buen comportamiento en el mantenimiento del color.

El tono o matiz es el parámetro que indica la importancia del color amarillo frente al rojo (Glories, 1978) Así pues, cabe destacar que, a mayor tono, mayores posibilidades existen de que el vino se encuentre alterado u oxidado. Los vinos que mayor tono presentan son los testigos, elaborados exclusivamente con *S. cerevisiae*, así como los vinos elaborados con las cepas 15 d, 15b, 42b y 40. Mientras que podría pensarse que las otras cepas no-*Saccharomyces* pueden proteger a los compuestos del vino de la oxidación, ya que mantienen mejor el color, su IC es elevada, y el valor del tono es inferior, y esto resulta muy interesante en la producción de los vinos.

**Tabla 6.** Medias, desviación estándar y tratamiento estadístico ANOVA de parámetros relacionados con el color para los vinos de la variedad Merlot.

CEPA	ANT TOT (mg/L)	ANT COL (mg/L)	% ANT COPIG	% ANT LIBR	% ANT POLIM
42 e	491 ± 67 abcd	383 ± 48 abc	26,60 ± 7,20 d	53,72 ± 8,64 bc	19,68 ± 2,52 ab
15e	499 ± 53 bcd	412 ± 52 bc	19,67 ± 4,23 cd	56,11 ± 3,32 bc	24,21 ± 2,34 cd
1g	531 ± 81 de	435 ± 55 cd	22,56 ± 3,62 cd	56,60 ± 2,62 C	20,85 ± 2,26 ab
42b	485 ± 52 abc	399 ± 45 ab	26,93 ± 5,68 d	53,45 ± 5,06 bc	19,62 ± 1,88 abc
42d	491 ± 14 bc	401 ± 11 bc	19,84 ± 4,48 d	54,63 ± 4,00 bc	25,54 ± 2,39 d
42f	510 ± 85 bcd	373 ± 19 abc	19,75 ± 2,64 cd	57,86 ± 3,74 cd	22,39 ± 2,81 bcd
42k	495 ± 10 abcd	437 ± 40 bc	21,25 ± 4,86 cd	57,48 ± 4,88 cd	21,27 ± 1,60 bc
42l	507 ± 46 bcd	400 ± 28 abc	17,41 ± 6,97 cd	61,33 ± 5,46 cd	21,25 ± 1,65 bc
42c	550 ± 37 e	447 ± 26 de	16,44 ± 7,68 c	64,75 ± 5,11 D	18,81 ± 3,10 a
40	461 ± 55 ab	384 ± 43 abc	1,58 ± 4,91 a	77,08 ± 2,65 E	21,34 ± 3,20 bc
15c	515 ± 69 bcd	404 ± 21 abc	18,14 ± 5,39 cd	62,25 ± 4,42 cd	19,62 ± 2,96 ab
15d	519 ± 95 de	408 ± 51 abc	10,47 ± 5,06 bc	61,60 ± 3,74 cd	27,93 ± 1,81 e
15f	536 ± 22 de	473 ± 21 e	32,65 ± 8,26 e	45,98 ± 7,34 a	21,37 ± 2,40 bc
15h	457 ± 23 ab	393 ± 9 ab	33,44 ± 5,31 e	43,90 ± 5,57 a	22,66 ± 2,07 cd
15i	464 ± 54 abc	403 ± 34 abc	23,37 ± 3,48 cd	51,61 ± 4,21 B	25,03 ± 2,03 cd
T	444 ± 76 a	351 ± 13 a	21,41 ± 2,68 cd	54,13 ± 4,57 bcd	24,46 ± 2,56 cd

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas al 95%

El color de los vinos va a depender de la concentración de antocianos y del estado en que estos se encuentren. Estos antocianos conviene que sean estables a los distintos agentes reductores, entre ellos el sulfuroso. Esta estabilidad o dificultad para decolorarse va a contribuir al mantenimiento del color durante la conservación de los vinos. Podemos observar que la cepa testigo es la que presenta los valores más bajos, tanto de antocianos totales como de coloreados (no decolorables principalmente por el sulfuroso). En general, los antocianos de estos vinos son bastante estables, ya que los antocianos no decolorables representan un porcentaje muy importante, y aquellos vinos con mayor porcentaje de antocianos coloreadas serán las que presenten mayor estabilidad de color durante la conservación. La capacidad de las membranas de levaduras de atraer electrostáticamente a los polifenoles y absorberlos hace que se reduzca la cantidad de antocianos disponibles y, en consecuencia, obtener vinos con menor Intensidad Colorante (Morata *et al.*, 2005). También la actividad  $\beta$ -glucosidásica de algunas cepas de levaduras puede actuar hidrolizando el enlace glucosídico entre la antocianina y el azúcar correspondiente, dejando libre la antocianidina en forma aglicona y aumentando su desprotección ante la oxidación (Hernández *et al.*, 2003). En los vinos de Merlot elaborados, las cepas testigo, 15 h y 40 serían las que dan lugar a un menor color, quizás porque tengan muy marcado alguno de estos mecanismos que dan lugar a pérdidas de color. El resto de las cepas presentan un mejor comportamiento, bien por tener minimizados estos mecanismos, o bien debido a su capacidad de sintetizar compuestos carbonilo (acetaldehído, ácido pirúvico), pueden actuar como precursores de la formación de piranoantocianos, y que favorecen la condensación entre antocianos y taninos (Dournel *et al.*, 1985).

En cuanto al estado de los antocianos, los libres son los más sensibles a las reacciones de oxidación y decoloración, constituyendo los copigmentados un primer paso en la estabilidad del color, ya que se forman con los copigmentos unas estructuras tipo sándwich que protegen momentáneamente el color, pero son los antocianos polimerizados los que le confieren estabilidad al color de los vinos. De todas las cepas de levaduras ensayadas, son la 42d y la 15d las que permiten una mayor polimerización de los antocianos y por lo tanto las que más contribuyen a la estabilidad de los vinos.

**Tabla 7.** Medias, desviación estándar y tratamiento estadístico ANOVA de los parámetros relacionados con la concentración de polifenoles para los vinos de la variedad Merlot.

CEPA	CATEQUIN (mg/L)	TAN TOT (mg/L)	TAN CON (mg/L)	IPT	POLIF TOT(mg/L)
42 e	385 ± 95 bc	739 ± 197 bcd	473 ± 194 ab	28,7 ± 3,6 ab	1539 ± 298 a
15e	370 ± 96 abc	742 ± 112 bcd	571 ± 142 cd	30,2 ± 2,4 abcd	1726 ± 279 a
1g	347 ± 67 a	822 ± 91 d	509 ± 98 abc	30,6 ± 2,9 abcd	1727 ± 243 a
42b	433 ± 75 d	719 ± 184 bcd	514 ± 122 bc	31,2 ± 2,7 cde	1634 ± 235 a
42d	435 ± 70 cd	845 ± 153 de	497 ± 83 ab	30,1 ± 1,5 abcd	1659 ± 68 bc
42f	329 ± 60 b	833 ± 188 de	413 ± 139 ab	29,4 ± 1,9 abc	1451 ± 193 a
42k	384 ± 74 bc	823 ± 127 d	425 ± 120 a	33,1 ± 2,0 e	1638 ± 236 a
42l	318 ± 23 a	788 ± 175 cd	643 ± 102 d	30,8 ± 1,8 bcd	1763 ± 173 a
42c	387 ± 75 abc	946 ± 58 e	831 ± 78 de	32,0 ± 0,9 de	2106 ± 112 bc
40	378 ± 96 abc	786 ± 183 bcd	885 ± 126 de	29,5 ± 2,9 abc	2016 ± 234 b
15c	395 ± 82 bcd	638 ± 158 bc	913 ± 58 de	31,0 ± 1,1 cde	2113 ± 106 bc
15d	382 ± 65 abc	660 ± 82 bc	912 ± 108 de	30,9 ± 3,3 cde	2132 ± 253 bc
15f	414 ± 53 bc	492 ± 68 a	957 ± 84 e	32,1 ± 1,4 de	2350 ± 144 c
15h	358 ± 69 bc	520 ± 70 ab	915 ± 113 de	28,6 ± 1,3 q	2102 ± 135 bcd
15i	394 ± 64 abc	461 ± 88 a	924 ± 53 de	29,2 ± 1,2 abc	2158 ± 49 bcd
T	495 ± 118 bcd	749 ± 93 cd	995 ± 45 de	33,4 ± 0,6 cd	2213 ± 46 de

Siendo IPT: Índice de polifenoles totales; Tan Tot: Taninos totales y Tan Con: Taninos condensados  
 Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas al 95%

Podemos destacar que las cepas de levadura que llevan a cabo la fermentación influyen en la concentración de flavanoles, tanto en estado de monómeros como en el de taninos condensados, modificando el contenido polifenólico, así como el estado y estabilidad de los compuestos polifenólicos en el vino (Bautista-Ortín *et al.*, 2007; Caboulet *et al.*, 2012). En los vinos de Merlot, son las cepas 15e, 42d, 42c y 15f las que mantienen una mayor concentración de polifenoles, tanto de monómeros como de polímeros, siendo los vinos fermentados por las cepas 42d, 42l, 42k y 15d, presentan una mayor concentración de taninos condensados en detrimento de los monómeros de catequina.

En cuanto a los parámetros relacionados con la calidad de los taninos, hay que destacar su gran interés ya que valoran de forma objetiva aquellas sensaciones que vamos a percibir en la cata, y que van a contribuir al rechazo o aceptación de los vinos.

Así, el Índice de Gelatina mide el porcentaje de taninos astringentes. La reactividad de los taninos del vino con glicoproteínas como la mucina de la saliva, es la causa de la sensación de astringencia, que es mayor cuanto más reactivos sean los taninos. De los vinos de Merlot elaborados, son los fermentados con las cepas 1g, 42b y 15h, los que presentan menos astringencia, inferior incluso a los vinos testigos.

El Índice de Etanol valora los taninos unidos a polisacáridos, y esta unión tiene un efecto contrario al anterior, ya que la unión con los polisacáridos neutraliza la reactividad de los taninos, y por tanto disminuye su astringencia. La cepa de levadura libera polisacáridos durante la fermentación y postfermentación debido a procesos de autólisis (Del Barrio-Galán *et al.*, 2012; González-Royo *et al.*, 2013), y de todas las cepas ensayadas, son la 15d, 42c y 15h, las que mayor cantidad de polisacáridos producen.

**Tabla 8.** Medias, desviación estándar y tratamiento estadístico ANOVA de los parámetros relacionados con la calidad de los taninos para los vinos de la variedad Merlot.

CEPA	I DMACH (%)	I. ETANOL (%)	I. GELATINA (%)	I PVPP (%)
42 e	53,71 ± 8,51 bcd	52,48 ± 2,11 a	57,85 ± 14,16 b	58,68 ± 1,50 cd
15e	52,14 ± 11,28 bcd	51,03 ± 2,98 a	51,78 ± 16,51 bd	58,46 ± 1,01 cd
1g	41,96 ± 4,73 ab	52,34 ± 2,69 a	42,32 ± 10,12 ab	58,85 ± 0,93 cd
42b	55,17 ± 14,65 bcd	55,29 ± 1,44 b	50,93 ± 14,10 bcd	58,68 ± 1,49 cde
42d	47,70 ± 7,35 abc	59,50 ± 1,94 bc	52,29 ± 16,32 bc	59,20 ± 1,41 d
42f	44,30 ± 7,62 ab	58,49 ± 1,78 b	54,78 ± 17,39 cd	60,89 ± 1,43 de
42k	39,48 ± 6,39 a	58,24 ± 1,80 bc	56,14 ± 11,63 cd	62,22 ± 1,01 e
42l	47,88 ± 9,02 ab	58,63 ± 1,59 bc	46,91 ± 10,19 abc	59,38 ± 3,39 cd
42c	45,54 ± 5,69 ab	59,91 ± 2,37 bcd	34,94 ± 11,38 a	56,86 ± 1,46 cd
40	57,39 ± 12,60 dc	61,09 ± 3,59 cd	58,23 ± 10,39 cd	53,90 ± 2,85 cd
15c	76,87 ± 14,58 dc	61,90 ± 3,16 cd	49,32 ± 14,51 abc	53,68 ± 2,41 bc
15d	61,09 ± 8,33 d	66,86 ± 3,76 e	51,37 ± 13,47 bcd	52,32 ± 2,37 c
15f	78,64 ± 12,27 cd	60,93 ± 3,64 bcd	52,35 ± 8,45 bcd	48,59 ± 2,30 b
15h	74,48 ± 18,61 d	63,49 ± 4,98 d	42,02 ± 12,20 ab	43,75 ± 4,65 a
15i	87,26 ± 18,99 e	61,45 ± 2,91 cd	44,12 ± 15,29 ab	41,93 ± 2,52 a
T	60,32 ± 18,65 cd	59,88 ± 3,87 bcd	49,72 ± 16,03 bcd	47,06 ± 6,62 cd

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas al 95%

La polimerización de los taninos entre sí la contempla el índice DMACH. Sus valores se comprenden de 10 a 200 en sentido inverso a la masa molecular de los taninos, y por tanto a su grado de polimerización. El grado de condensación se considera medio cuando el valor es próximo a 50, mientras que valores de 10 a 20 son de vinos muy condensados (Vivas, 1994). En consecuencia, el grado de polimerización de los vinos que han sido fermentados con las cepas, tienen un grado de polimerización que se podría considerar medio, y de todas ellas son las cepas 42d, 42k y 1g las que potencian la polimerización entre los taninos del vino, contribuyendo a su estructura y a la disminución de su astringencia.

Por último, la polimerización de los antocianos con los taninos, valorada por Índice de PVPP, va a ser responsable de la estabilidad del color, así como también de la disminución de la reactividad y por tanto de la astringencia de los taninos a quién se unen. De todas las cepas estudiadas, son la 42d, 42f y 42k, las más favorables para conseguir la estabilidad.

Considerando el conjunto polifenólico de los vinos, podemos establecer que no hay ninguna cepa de levaduras que destaque especialmente sobre las demás, pero hay un pequeño grupo de levaduras que dan lugar a vinos con más polifenoles y con una mayor garantía de estabilidad polifenólica en el tiempo, que son la 1g, la 42d y la 42 k, y que se corresponden con distintos perfiles de *Hanseniaspora uvarum*.

#### 4.1.3. Análisis sensorial de los vinos de Merlot.

Los vinos de Merlot fermentados con las distintas cepas de levaduras *Saccharomyces* juntamente con la cepa *Saccharomyces* 22H, fueron catados por un panel de ocho catadores expertos. Inicialmente se realizó una cata triangular para las tres repeticiones de cada vino, procediéndose a su mezclado cuando no se observaban diferencias entre ellos. La cata descriptiva y cuantitativa se realizó en una sesión con los 16 vinos, utilizando de vino referencia el testigo de Merlot elaborado exclusivamente

con la cepa *S. cerevisiae* 22H, ya que nuestro objetivo es que la siembra secuencial de los dos tipos de levaduras, de lugar a vinos con mejores características organolépticas.

En la tabla 9 se recoge la media y el ANOVA de los parámetros organolépticos de los vinos de Merlot elaborados con las distintas levaduras *no-Saccharomyces* ensayadas, que fueron igual o mejor valorados que con la cepa testigo.

**Tabla 9.** Medias y tratamiento estadístico ANOVA del análisis sensorial de los vinos de Merlot.

MERLOT	42e	1g	42b	42d	42k	42c	15d
MATIZ	6,67 a	7,08 a	7,33 a	6,98 a	7,00 a	7,00 a	6,00 a
INTENSIDAD COLOR	5,57 a	6,00 a	6,00 a	6,52 a	6,64 a	6,43 a	6,57 a
INTENSIDAD AROMA	6,71 b	6,43 a	6,29 a	<b>6,43 b</b>	6,43 b	6,43 b	6,57 b
CALIDAD DEL AROMA	6,12 ab	6,00 a	5,64 a	<b>6,97 b</b>	5,50 a	6,57 ab	6,17 ab
FRUTAS ROJAS	5,71 a	6,00 a	5,83 a	6,33 a	5,33 a	6,00 a	6,00 a
FRUTAS NEGRAS	5,50 a	5,25 a	5,00 a	6,00 a	5,88 a	5,88 a	5,60 a
NOTA REGALIZ	3,00 a	2,00 a	1,50 a	4,00 a	3,50 a	1,00 a	3,00 a
NOTA VEGETAL	4,33 a	4,00 a	4,00 a	2,90 a	3,50 a	4,00 a	2,50 a
NOTA FLORAL	3,75 a	4,33 a	3,33 a	4,00 a	5,00 a	4,50 a	4,00 a
NOTA A ESPECIAS	4,00 a	4,00 a	4,00 a	<b>5,12 ab</b>	5,00 a	4,00 a	5,33 a
INTENSIDAD DEL GUSTO	5,71 a	5,86 a	5,86 a	<b>6,29 b</b>	5,64 a	5,71 a	6,53 a
CALIDAD DEL GUSTO	5,43 a	5,29 a	5,14 a	6,00 a	5,50 a	5,43 a	5,84 a
ACIDEZ	5,43 a	5,57 a	5,33 a	5,71 a	5,86 a	5,29 a	5,86 a
DULZOR	3,83 a	3,67 a	3,33 a	4,33 a	3,29 a	3,83 a	3,17 a
VISCOSIDAD	4,40 a	5,00 a	4,40 a	5,00 a	4,40 a	4,40 a	4,60 a
UNTUOSIDAD	5,40 a	5,60 a	5,40 a	5,40 a	5,17 a	5,20 a	5,00 a
ASTRINGENCIA	4,67 a	4,00 a	4,00 a	4,50 a	4,33 a	4,83 a	4,29 a
AMARGOR	4,43 a	4,29 a	3,92 a	4,83 a	4,33 a	4,00 a	5,00 a
PERSISTENCIA AROMÁTICA	5,43 a	5,67 a	5,33 a	5,29 a	5,60 a	5,60 a	5,56 a
CALIDAD GLOBAL	5,73 b	5,50 a	5,64 a	<b>6,53 c</b>	5,43 a	5,71 a	6,29 a

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas al 95%

En los vinos de Merlot, la mejor valoración organoléptica corresponde a las cepas **42d** y **15d** para los parámetros relacionados con la intensidad y la calidad aromática, la presencia de notas especiadas, la intensidad gustativa y la calidad global, y en tercer lugar la cepa 42e, similar a las anteriores en la intensidad y la calidad aromática, pero inferior en cuanto a la intensidad del gusto.

Como se ha podido observar, la siembra secuencial de las cepas de levadura da lugar a vinos más complejos organolépticamente, y mejor valorados que el vino testigo de referencia, Estos cultivos iniciadores mixtos, llevan a cabo la fermentación y además enriquecen al vino confiriendo compuestos aromáticos y polifenólicos (Liu *et al.*, 2016).

## 4.2. Influencia de las levaduras no-*Saccharomyces* en la variedad Cabernet Sauvignon.

Al igual que en los vinos elaborados con la variedad Merlot, se realizó la evaluación de parámetros convencionales del mosto, mostrando el resultado la tabla 9. En ella observamos los valores de °Baumé, acidez total y pH de los mostos previamente a la inoculación de las cepas aisladas no-*Saccharomyces*. Podemos observar que la uva que va a las distintas vinificaciones tiene toda ella un similar grado de madurez, ya que el que proceda de un mismo viñedo no asegura esa homogeneidad.

**Tabla 10.** Medias y desviación estándar de los parámetros del mosto de la variedad Cabernet Sauvignon.

CABERNET	° Baumé	Acidez Total	pH
30 <sup>a</sup>	13,278 ± 0,626	6,44 ± 0,21	3,34 ± 0,06
25B	13,278 ± 0,455	6,24 ± 0,34	3,41 ± 0,04
26D	13,278 ± 0,364	6,57 ± 0,17	3,38 ± 0,05
52	13,278 ± 0,444	6,37 ± 0,21	3,42 ± 0,11
54	13,278 ± 0,455	6,65 ± 0,17	3,40 ± 0,03
55	13,259 ± 0,116	6,73 ± 0,13	3,38 ± 0,04
58 <sup>a</sup>	13,278 ± 0,200	6,84 ± 0,20	3,39 ± 0,06
58C	13,426 ± 0,361	6,91 ± 0,18	3,29 ± 0,08
58E	13,259 ± 0,225	6,67 ± 0,24	3,32 ± 0,04
T	13,278 ± 0,278	6,79 ± 0,27	3,31 ± 0,07
MEDIA	13,289	6,621	3,364

### 4.2.1. Parámetros convencionales de los vinos de Cabernet Sauvignon.

Una vez acabada la fermentación se analizaron los vinos de Cabernet, recogiendo en la tabla 11 los parámetros convencionales obtenidos.

**Tabla 11.** Medias, desviación estándar y tratamiento estadístico ANOVA de los parámetros convencionales de los vinos de la variedad Cabernet Sauvignon.

CABERNET	ACID. TOT(g/L)	pH	ACID. VOL (g/L)	GRADO (% vol/vol)	AZÚCARES (g/L)
30A	6,18 ± 0,28 b	3,54 ± 0,16 b	0,98 ± 0,08 d	12,70 ± 0,20 a	1,21 ± 0,02 a
25B	6,04 ± 0,30 a	3,50 ± 0,04 ab	0,55 ± 0,00 bc	12,63 ± 0,23 a	1,43 ± 0,07 b
26D	6,47 ± 0,10 bc	3,48 ± 0,09 ab	0,52 ± 0,04 bc	12,80 ± 0,26 a	1,38 ± 0,12 ab
52	6,18 ± 0,23 b	3,53 ± 0,14 b	0,59 ± 0,06 c	12,97 ± 0,50 ab	1,19 ± 0,09 a
54	6,60 ± 0,13 bcd	3,52 ± 0,09 ab	0,68 ± 0,04 c	12,50 ± 0,20 ab	1,27 ± 0,05 a
55	6,93 ± 0,23 cd	3,44 ± 0,05 ab	0,68 ± 0,02 c	12,50 ± 0,35 ab	1,31 ± 0,11 a
58A	6,80 ± 0,26 cd	3,51 ± 0,07 ab	0,49 ± 0,02 b	12,70 ± 0,53 ab	1,34 ± 0,08 a
58C	6,98 ± 0,08 d	3,38 ± 0,06 a	0,45 ± 0,02 a	12,63 ± 0,23 a	1,31 ± 0,07 a
58E	6,38 ± 0,33 bc	3,54 ± 0,05 bc	0,51 ± 0,04 ab	12,90 ± 0,20 ab	1,39 ± 0,05 ab
T	6,63 ± 0,17 bcd	3,48 ± 0,03 ab	0,54 ± 0,02 bc	13,12 ± 0,26 b	1,48 ± 0,04 b

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas al 95%

Podríamos destacar que todos los vinos elaborados con la variedad Cabernet Sauvignon tiene una cinética de fermentación similar, es decir, consumen los azúcares a la vez. Además, el pH y la acidez total son adecuadas. Mientras que, en lo que respecta al rendimiento en alcohol, las cepas 52, 54, 55 y la cepa testigo (elaborada sin levaduras no-*Saccharomyces*), tienen mayor rendimiento que las otras.

La cepa 30A da lugar a vinos con una elevada acidez volátil que, aunque dentro de lo permitido legalmente, es detectable organolépticamente y le confiere unas características desagradables, por tanto, no es adecuada para elaborar estos vinos.

#### 4.2.2 Parámetros polifenólicos de los vinos de Cabernet Sauvignon.

En las tablas 12, 13, 14 y 15 se recoge la composición polifenólica de los vinos obtenidos con la variedad Cabernet Sauvignon.

**Tabla 12.** Medias, desviación estándar y tratamiento estadístico ANOVA de parámetros relacionados con el color para los vinos de la variedad Cabernet Sauvignon.

CEPA	IC	Tono
30A	7,78 ± 1,23 a	50,56 ± 3,14 ab
25B	8,54 ± 0,73 ab	52,02 ± 5,22 b
26D	8,35 ± 0,64 ab	49,84 ± 3,57 ab
52	8,42 ± 0,86 ab	51,47 ± 5,46 ab
54	8,39 ± 1,76 ab	51,21 ± 5,66 ab
55	8,87 ± 0,82 abc	51,53 ± 1,43 ab
58A	8,73 ± 0,91 abc	51,07 ± 1,42 ab
58C	9,49 ± 1,71 bc	47,38 ± 5,33 a
58E	8,76 ± 0,93 abc	51,04 ± 1,26 ab
T	9,81 ± 0,31 c	50,33 ± 1,41 ab

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas al 95%

En cuanto a la intensidad Colorante, las diferencias entre los vinos son pequeñas, siendo los vinos testigo y los elaborados con las cepas 58e y 58 c, los que presentan mayor color. En el tono existen pequeñas diferencias, que, aunque significativas, tienen muy poca repercusión sobre la calidad de los vinos. La variedad Cabernet, debido a que presenta una gran carga polifenólica, con gran poder antioxidante, da lugar a vinos menos sensibles a oxidaciones y otras reacciones indeseables.

La concentración de antocianos es elevada en los vinos de Cabernet Sauvignon y hay pocas diferencias que puedan atribuirse a la cepa de levadura fermentativa, ya que todos los vinos, a excepción del 58 C, tienen una concentración similar en antocianos totales y coloreados o decolorables por el sulfuroso. En cambio, con relación al estado de los antocianos, es la cepa 58E la que tiene un mayor porcentaje de antocianos copigmentados y polimerizados, y un menor porcentaje de antocianos libres, lo que va a asegurar la óptima conservación de los antocianos. La formación mediada por las levaduras de compuestos polifenólicos que favorecen la condensación entre antocianos y taninos podría ser la causa de esta situación (Caboulet *et al.*, 2012; Morata *et al.*, 2016).

**Tabla 13.** Medias, desviación estándar y tratamiento estadístico ANOVA de parámetros relacionados con el color para los vinos de la variedad Cabernet Sauvignon.

CEPA	ANT TOT (mg/L)	ANT COLOR (mg/L)	% ANT COPIG	% ANT LIBR	% ANT POLIM
30A	722 ± 47 ab	574 ± 35 ab	34,18 ± 9,03 a	45,14 ± 5,99 d	20,68 ± 3,84 d
25B	829 ± 48 c	648 ± 41 abc	38,34 ± 0,80 bc	44,76 ± 1,05 bcd	16,89 ± 0,71 ab
26D	833 ± 12 c	631 ± 20 d	39,06 ± 3,76 bc	45,55 ± 3,03 cd	15,39 ± 2,09 ab
52	803 ± 60 c	611 ± 47 cd	36,33 ± 6,10 bc	45,31 ± 4,52 d	18,36 ± 2,66 a
54	793 ± 84 bc	604 ± 77 bc	38,57 ± 3,13 ab	43,56 ± 1,55 abc	17,87 ± 2,34 bc
55	681 ± 59 b	566 ± 28 bc	42,45 ± 3,08 bc	36,22 ± 3,19 cd	21,33 ± 1,80 ab
58A	759 ± 68 b	613 ± 52 cd	41,29 ± 4,73 bc	37,98 ± 5,35 d	20,73 ± 1,63 ab
58C	675 ± 58 a	571 ± 59 a	46,62 ± 3,26 bc	32,50 ± 3,97 bc	20,88 ± 4,78 cd
58E	752 ± 46 b	618 ± 29 abc	40,87 ± 3,25 c	39,35 ± 3,03 a	19,78 ± 0,76 d
T	789 ± 44 b	655 ± 30 abc	43,05 ± 3,01 bc	39,30 ± 1,56 ab	17,65 ± 1,64 d

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas al 95%

Como se pone de manifiesto en la tabla 13, la cepa de levadura afecta a la composición polifenólica de los vinos. De todas las cepas ensayadas, son la 58C y la 30A, las que dan lugar a la más baja concentración en catequinas, taninos y polifenoles en general. En el resto de los vinos se observa un comportamiento similar, aunque podría destacarse la cepa 58E, ya que es el vino que presenta mayor concentración de taninos condensados, con valores muy elevados de taninos totales, y polifenoles.

**Tabla 14.** Medias, desviación estándar y tratamiento estadístico ANOVA de los parámetros relacionados con la concentración de polifenoles para los vinos de la variedad Cabernet Sauvignon.

CEPA	CATEQUIN (mg/L)	TAN TOT (mg/L)	TAN CON (mg/L)	IPT	POLIF TOT (mg/L)
30A	589 ± 58 c	1793 ± 119 abc	1326 ± 87 a	19,73 ± 1,12 ab	3411 ± 91 ab
25B	568 ± 101 bc	1791 ± 58 c	1595 ± 92 a	20,63 ± 0,97 bcd	3592 ± 140 bc
26D	609 ± 109 bc	1781 ± 56 c	1566 ± 137 a	20,21 ± 0,36 d	3535 ± 112 d
52	576 ± 84 c	1768 ± 109 d	1455 ± 258 a	19,78 ± 1,32 bcd	3464 ± 227 cd
54	358 ± 66 c	1791 ± 48 cd	1626 ± 478 a	19,37 ± 0,56 bcd	3471 ± 195 bc
55	447 ± 95 c	1866 ± 111 cd	1377 ± 162 a	19,81 ± 1,19 ab	3476 ± 188 ab
58A	481 ± 99 a	1888 ± 123 d	1285 ± 202 a	19,48 ± 0,87 abc	3611 ± 260 bcd
58C	391 ± 84 a	1504 ± 143 ab	1165 ± 285 a	17,71 ± 1,96 a	3060 ± 229 a
58E	549 ± 91 b	1719 ± 200 bcd	1788 ± 148 b	19,81 ± 0,79 cd	3415 ± 310 cd
T	380 ± 34 bc	1987 ± 46 a	1303 ± 143 a	17,55 ± 1,24 a	3844 ± 103 bc

Siendo IPT: Índice de polifenoles totales; Tan Tot: Taninos totales y Tan Con: Taninos condensados

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas al 95%

Con respecto a los índices de calidad de los taninos, la cepa que presenta un mejor comportamiento es la 30A, porque proporciona a los vinos baja astringencia, y buena polimerización de taninos con polisacáridos y con antocianos. Pero esta cepa no es apta para la vinificación por su elevada acidez volátil, por tanto, del resto de las cepas es la 58E la más favorable por su comportamiento polimerizante frente a polisacáridos y antocianos y su moderada astringencia.

**Tabla 15.** Medias, desviación estándar y tratamiento estadístico ANOVA de los parámetros relacionados con la calidad de los taninos para los vinos de la variedad Cabernet Sauvignon.

CEPA	I. DMACH (%)	I. ETANOL (%)	I. GELATINA (%)	I PVPP (%)
30 <sup>a</sup>	41,04 ± 7,74 c	52,71 ± 2,85 cd	43,63 ± 9,05 a	57,95 ± 1,60 c
25B	25,66 ± 2,63 b	53,04 ± 1,27 cd	62,97 ± 7,96 bc	57,51 ± 1,57 bc
26D	27,25 ± 3,33 a	51,20 ± 2,25 cd	66,68 ± 8,64 bc	57,39 ± 1,88 cd
52	34,35 ± 4,33 ab	45,72 ± 9,82 bc	47,41 ± 11,95 bc	56,17 ± 1,55 bc
54	29,52 ± 10,99 b	49,92 ± 4,07 b	60,31 ± 12,82 bc	53,14 ± 2,37 bc
55	39,71 ± 4,75 bc	55,71 ± 2,17 bc	64,60 ± 9,43 ab	54,26 ± 1,86 bc
58 <sup>a</sup>	45,56 ± 8,43 bc	33,71 ± 1,16 c	68,52 ± 11,43 bc	54,22 ± 1,34 a
58C	41,88 ± 7,66 bc	41,11 ± 4,76 cd	66,75 ± 9,74 bc	52,00 ± 4,62 ab
58E	48,65 ± 5,18 c	41,44 ± 9,88 c	46,46 ± 7,47 bc	56,71 ± 2,96 bc
T	25,11 ± 1,16 b	32,52 ± 4,72 a	76,95 ± 4,89 c	45,70 ± 3,84 ab

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas al 95%

Se podría determinar que la cepa 58E es la que presenta un mayor color y estabilidad de éste, una aceptable cantidad de polifenoles y un óptimo estado de polimerización de sus polifenoles, que le va a permitir realizar una conservación óptima, sin grandes pérdidas polifenólicas,

#### 4.2.3. Análisis sensorial de los vinos de Cabernet Sauvignon.

Los vinos de Cabernet Sauvignon fermentados con las cepas de levaduras no-*Saccharomyces* y la cepa *Saccharomyces* 22H, fueron catados por un panel de ocho catadores expertos.

Inicialmente se realizó una cata triangular para las tres repeticiones de cada vino, procediéndose a su mezclado cuando no se observaban diferencias entre ellos. La cata descriptiva y cuantitativa se realizó con los 10 vinos de Cabernet. El vino referencia fue el testigo de Cabernet, elaborado exclusivamente con la cepa *S. cerevisiae* 22H, ya que nuestro objetivo es que la siembra secuencial de los dos tipos de levaduras, de lugar a vinos con mejores características organolépticas.

En la tabla 16 se recoge la media y el ANOVA de los parámetros organolépticos de aquellos vinos de Cabernet Sauvignon elaborados con las distintas levaduras no-*Saccharomyces* ensayadas, que fueron igual o mejor valorados que con la cepa testigo.

Podemos observar que, para los vinos de Cabernet Sauvignon, la mejor valoración organoléptica corresponde a las cepas 58E, que presentan mayor intensidad y calidad aromática, mayor contenido en frutas negras, mejor intensidad y calidad gustativa y mejor calidad global. En segundo lugar, se valoraron los vinos fermentados con las cepas 54, 58A y 55. No se observan diferencias aparentes en el color de los vinos.

**Tabla 16.** Medias y tratamiento estadístico ANOVA del análisis sensorial de los vinos de Cabernet Sauvignon.

<b>CABERNET</b>	<b>26D</b>		<b>54</b>		<b>58A</b>		<b>58E</b>		<b>55</b>	
Matiz	8,60	a	8,40	a	8,40	a	8,60	a	8,60	a
Intensidad del color	7,20	a	8,20	a	8,50	a	8,60	a	8,40	a
Intensidad del aroma	6,70	a	7,40	ab	7,60	ab	<b>8,40</b>	<b>b</b>	7,30	ab
Calidad del aroma	7,00	a	7,40	ab	7,50	ab	<b>8,00</b>	<b>b</b>	7,20	ab
Frutas rojas	6,25	a	7,20	a	7,25	a	7,80	a	6,60	a
Frutas negras	6,25	a	6,50	a	8,00	ab	<b>8,33</b>	<b>b</b>	7,25	ab
Notas a especias	5,00	a	4,00	a	7,33	a	7,00	a	6,50	a
Intensidad del gusto	6,40	a	7,40	b	7,80	bc	<b>8,40</b>	<b>c</b>	7,70	bc
Calidad del gusto	6,20	a	7,70	b	7,80	bc	<b>8,40</b>	<b>c</b>	7,30	b
Acidez	5,40	a	5,20	a	6,00	a	5,60	a	5,70	a
Dulzor	3,20	a	3,80	a	3,50	a	5,33	a	5,00	a
Untuosidad	6,20	a	7,40	a	6,58	a	6,40	a	6,40	a
Astringencia	4,40	a	4,20	a	5,25	a	5,00	a	4,67	a
Amargor	4,00	a	3,00	a	5,25	a	3,75	a	4,00	a
Persistencia	6,00	a	6,00	a	6,20	a	7,00	a	6,80	a
Calidad global	6,20	a	7,80	bc	7,96	bc	<b>8,50</b>	<b>c</b>	7,20	bc

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas al 95%

## 5. Conclusión.

1. Por lo que respecta a los parámetros fisicoquímicos de los vinos obtenidos con las cepas de levadura no-*Saccharomyces* combinados con la *S.cerevisiae* 22H, cabe destacar su buen comportamiento enológico y su buena adecuación para la elaboración de vinos. Las únicas excepciones que encontramos son las cepas 15e y la 30A que, debido a su valor de acidez volátil, no serían adecuadas ni recomendables para la elaboración de vinos.
2. El hecho de que algunas cepas no-*Saccharomyces* ensayadas puedan influir en la producción de alcohol, podría ser interesante e incluso recomendable su utilización en el momento actual, debido a la demanda de vinos con menor grado alcohólico, ocasionado por el aumento de éste que se observa en estos últimos años debido a las condiciones climatológicas.
3. Tanto en los vinos de la variedad Merlot como en los de la variedad Cabernet Sauvignon, la fermentación secuencial que se lleva a cabo por los cultivos iniciadores mixtos de cepas de levadura no-*Saccharomyces* junto con la *Saccharomyces* 22H, da lugar a un mejor comportamiento polifenólico y a una mejor calidad de sus taninos, respecto a los vinos fermentados únicamente con las cepas de levadura *Saccharomyces*.
4. La cepa 42d, que se corresponde con un perfil de *Hanseniaspora uvarum*, es la más valorada organolépticamente en los vinos de Merlot, y a su vez tiene un buen comportamiento polifenólico, tanto relacionado con el color, como con la concentración de compuestos polifenólicos, y con el grado de polimerización de éstos, especialmente en lo relacionado con la polimerización entre sí de los taninos y la polimerización de los antocianos con los taninos. Debido a ello es la cepa de elección para intervenir en el cultivo secuencial mixto no-*Saccharomyces*-*Saccharomyces* 22H, de los vinos de Merlot.
5. La cepa 58E, cuyo perfil se corresponde con *Torulospora delbrueckii*, es la mejor valorada organolépticamente en los vinos de Cabernet Sauvignon, y además es la que presenta un color mayor y más estable, una aceptable concentración fenólica y un óptimo estado de polimerización de sus polifenoles, que le va a permitir realizar una conservación óptima, sin grandes pérdidas polifenólicas. Por todo ello, constituye la cepa de elección para intervenir en el cultivo secuencial mixto no-*Saccharomyces*-*Saccharomyces* 22H de los vinos de Cabernet Sauvignon

## 6. Bibliografía.

ÁLVAREZ-PÉREZ, J.M.; CAMPO, E.; SANJUAN, F.; COQUE, J.J.; FERREIRA, V.; HERNÁNDEZ-ORTE, P. (2012). Sensory and chemical characterization of the aroma of Prieto Picudo rosé wines: The differential role of autochthonous yeast strains on aroma profiles. *Food Chemistry*, 133: 284-292.

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.

BAUTISTA-ORTÍN, A.B.; ROMERO-CASCALES, I.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, J.I.; LÓPEZ-ROCA, J.M.; GÓMEZ-PLAZA, E. (2007). Influence of the yeast strain on Monastrell wine colour. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8: 322–328.

BLOUIN, J. (1992). Techniques d'analyses des moûtes et des vins, *Ed. Dujardin Salleron*, pg 199-201. Paris.

BLOUIN, J. (1977). Manuel pratique d'analyse des moûts et des vins. *Chambre d'Agriculture de la Gironde*.

BODEGA CHOZAS CARRACAL. [www.chozascarrascal.com](http://www.chozascarrascal.com) visto el 10 de enero de 2018.

BODEGA LAUS. <https://www.bodegalaus.es/blog/uva-merlot> visto el 10 de diciembre de 2017.

BOULTON, R.B. (2001). The copigmentation of Anthocyanin and Its Role in the Color of Red Wine: A Critical Review. *Am. J. Enol. Vitic.* 52, 67-87

BOULTON, R.B.; SINGLETON, V.L.; BISSON, L.F.; KUNKEE, R.F. (2002): *Teoría y práctica de la elaboración del vino*. Acribia. 650 pp.

CABOULET, D.; DUCASSE, M.A.; ROY, A.; SCHNEIDER, R. (2012). Influence de la souche de levure sur les qualités polyphénoliques et aromatiques des vins rouges. *Wine and Viticulture Journal*. 35-42.

CHAMBERS, P.J. Y PRETORIUS, I.S. (2010). Fermenting knowledge: the history of winemaking, science and yeast research. *EMBO Reports*, 11: 914-920.

CHEN, K.; ESCOTT, C.; LOIRA, I.; DEL FRESNO, J.M.; MORATA, A.; TESFAYE, W.; CALDERÓN, F.; SUÁREZ-LEPE, J.A.; HAN, S.; BENITO, S. (2018): Use of non-*Saccharomyces* yeasts and oenological tannin in red winemaking: Influence on colour, aroma and sensorial properties of young wines. *Food Microbiology* 69, 51-63

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 ethanol content of wines. *Front. Microbiol.* 7

COMITINI, F.; GOBBI, M.; DOMIZIO, P.; ROMANI, C.; LENCIONI, L.; MANNAZZU, I.; CIANI, M. (2011). Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* 28, 873-882

DEL BARRIO-GALÁN, R.; PÉREZ-MAGARIÑO, S.; ORTEGA-HERAS, M.; GUADALUPE, Z.; AYESTARÁN, B. (2012). Polysaccharide characterization of commercial dry yeast preparations and their effect on white and red wine composition. *LWT-FoodSci. Technol.* 48, 215-223.

DOURNEL, J.M. (1985). Recherches sur les combinaisons anthocianes-flavonols. Influence de ces réactions sur la couleur des vins rouges. Tesis Doctoral, *Université de Bordeaux II*. 189 pp

FEV: Federación Española del Vino. *Informe económico 2016, cap-2, 18-27* <http://www.fev.es/memoria2016/mobile/index.htm#p=18> visto el 3 de julio de 2017

FLEET, G. H. (2008). Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Research*, 8: 979-995.

GARCÍA, A.; CARCEL, C.; DULAU, L.; SAMSON, A.; AGUERA, E.; AGOSIN, E.; GUNATA, Z. (2002). Influence of a mixed culture with *Debaromyces vanriji* and *Saccharomyces cerevisiae* on the volatiles of a Muscat wine. *J. Food and Science*, 67, 1138-1143

GONZÁLEZ-ROYO, E.; URTASUN, A.; GIL, M.; KONTOUDAKIS, N.; ESTERUELAS, M.; FORT, F.; CANALS, J.M.; ZAMORA, F. Effect of yeast strain and supplementation with inactive yeast during alcoholic fermentation on wine polysaccharides. *Am. J. Enol. Vitic.* 2013, 64, 268-273.

GUTIÉRREZ, I.H.; GARCÍA-ROMERO, E.; DE CALATRAVA, R. (2004): Antocianos 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

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

GLORIES, Y. (1984). La couleur des vins rouges. Les equilibres des anthocyanes et des tannins. *Com. Vigne Vin*, 18(3): 195-217

GLORIES, Y. (1984). La couleur des vins rouges. Mesure, origine et interpretation. *Com. Vigne Vin*, 18(4): 253-271

GONÇALVES, R.; VALÉRIO, E.; CORREIA, C.; DE ALMEIDA, J.; SAMPAIO, J. (2011). Evidence for Divergent Evolution of Growth Temperature Preference in Sympatric *Saccharomyces* Species. *PLoS ONE* 2011; 6 (6): e20739. doi:10.1371, journal. pone. 0020739.

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*.

GUTIÉRREZ, A.R.; SANTAMARÍA, M.P.; LÓPEZ, R.M.; SEVILLA, M.J. (1995). Selección de levaduras vínicas en la Denominación de Origen Calificada Rioja. *Zubía*, 7: 103-111.

HERNÁNDEZ, L.F.; ESPINOSA, J.C.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M.; BRIONES, A. (2003).  $\beta$ -glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *International Journal of Food Microbiology*, 80: 171–176.

HERNÁNDEZ-ORTE, P.; CERSOSIMO, M.; LOSCOS, N.; CACHO, J.; GARCÍA-MORUNO, E.; FERREIRA, V. (2008). The development of varietal aroma from non-floral grapes by yeasts of different genera. *Food Chem.* 107, 1064-1077

HEUX, S.; SABLAYROLLES, J.; CACHON, R.; DEQUIN, S. (2006). Engineering a *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast that exhibits reduced ethanol production during fermentation under controlled microoxygenation conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5822-5828

IVACE: Instituto Valenciano de la Competitividad Empresarial. Visto el 3 de julio de 2017. [http://www.ivace.es/Internacional\\_Informes-Publicaciones/Sectores/VINO\\_CVWEB2015.pdf](http://www.ivace.es/Internacional_Informes-Publicaciones/Sectores/VINO_CVWEB2015.pdf)

LIU, S.W.; LU, Y.; HUANG, D.; LEE, P.R. (2016). Assessment of volatile and non-volatile compounds in durian wines fermented with four commercial non-*Saccharomyces* yeasts. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 96, 1511-1521

LU, Y.; HUANG, D.; LEE, P.R.; LIU, S.W. (2015): Effects of cofermentation and sequential inoculation of *Saccharomyces bayanus* and *Torulaspota delbruckii* on durian wine composition. *International Journal of Food Science and Technology*, 50, 2653-2663

MORATA, A.; GÓMEZ-CORDOVÉS, M.C.; COLOMO, B.; SUÁREZ, J.A. (2005). Cell wall anthocyanin adsorption by different *Saccharomyces* strains during the fermentation of *Vitis vinifera* L. cv Graciano grapes. *European Food Research and Technology*, 220: 341–346.

MORATA, A.; LOIRA, I.; HERAS, J. M.; CALLEJO, M. J.; TESFAYE, W.; GONZÁLEZ, C.; SUÁREZ-LEPE, J. A. (2016). Yeast influence on the formation of stable pigments in red winemaking. *Food Chemistry*, 197: 686–691.

NAGEL, C.W. Y GLORIES, Y. (1991). Use of modified dimethylaminocinnamaldehyde reagent for analysis of flavonols.

OIV: *International Organization of Vine and Wine*: Balance global del sector vitivinícola. <http://www.oiv.int/es/>

POMPEI, C. Y PERI, C. (1971). Determination of catechins in wines. *Vitis*, 9, 312-316

ROSSUM, D Y BAUER, F. (2016): Exploring the phenotypic space of non-*Saccharomyces* wine yeast diversity. *Food Microbiology* 55, 32-46

RIBÉREAU-GAYON, P. Y STONESTREET, E. (1965). Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. *Bull. Soc. Chim.*, 9: 119-142

RIBÉREAU-GAYON, P. (1974). The chemistry of red wine color. *The Chemistry of Winemaking*. A.D. Webb. Washington.

TIAGO, V.; LOUREIRO-DIAS, M.; LOUREIRO, V.; PRISTA, C. (2012) Homeostasis of *Saccharomyces cerevisiae* during the Late Stages of Wine Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 2012; 78 (17): 6302-6308.

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

VARELA, C; BARKER, A; TRAN, T; BORNEMAN, A; CURTIN, C (2017): Sensory profile and volatile aroma composition of reduced alcohol Merlot wines fermented with *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum*. *International Journal of Food Microbiology* 252, 1-9

VIANA, F. (2011). Levaduras no-*Saccharomyces* para modular el aroma secundario de los vinos: incremento del acetato de 2-feniletilo mediante cultivos iniciadores mixtos. *Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Valencia, 2011*.

VIDAL, S.; FRANCIS, L.; GUYOT, S.; MARNET, N.; KWIATKOWSKI, M.; GAWEL, R.; CHEYNIER, V.; WATERS, E. J. (2003). The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83: 564–573.

VITIVINICULTURA, 2012. *Merlot, uvas de vino tintas; características, cultivo, enología, cata*. Visto el 10 de diciembre de 2017. <http://www.vitivinicultura.net/uvas-de-vino-tintas-merlot.html>

VITIVINICULTURA, 2014. *Cabernet Sauvignon: La más extendida por el mundo*. Visto el 12 de diciembre de 2017. <http://www.vitivinicultura.net/uvas-de-vino-tinto-cabernet-sauvignon.html>

VIVAS, N.; GLORIES, Y.; LAGUNE, L; SAUCIER, C. (1994): Estimation du degré de polymerisation des procyanidines du raisin et du vin par la méthode au p-dimethylaminociannamaldehyde. *Journal International des Sciences de la Vigne et du vin* 28, n°4, 319-336.

ZAMORA, F. (2003). *Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos*. Editorial Mundi-Prensa. 225 pp.

ZOECKLEIN, B. W.; FUGELSANG, K.C.; GUMP, B.H.; NURY, F.S. (2001): *Análisis y producción del vino*. Acribia. 613 pp.