

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL  
MEDI NATURAL



**OPTIMIZACIÓN DE LA FERMENTACIÓN CON  
LEVADURAS no-*Saccharomyces*. ESTUDIO DEL  
PERFIL AROMÁTICO DE LOS VINOS.**

**TRABAJO FINAL DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS  
ALIMENTOS**

CURSO 2018/2019

**Autora:** Sara Dehem Cases

**Tutora:** M.<sup>a</sup> José García Esparza

Valencia, mayo 2019





### **Datos del trabajo final de grado (TFG)**

**Título del TFG:** Optimización de la fermentación con levaduras no-*Saccharomyces*. Estudio del perfil aromático de los vinos

**Autora:** Sara Dehem Cases

**Tutora académica:** M.ª José García Esparza

**Lugar y fecha:** Valencia, mayo 2019

### ***Resumen***

El presente trabajo se centra en la reevaluación del papel de las levaduras no-*Saccharomyces* en la vinificación, ya que en recientes estudios se ha destacado su positiva contribución a la composición analítica y sensorial del vino en cultivos mixtos secuenciales junto con *S. cerevisiae*. Para ello, se realiza el aislamiento y la identificación de distintas levaduras autóctonas de la D.O. Pago Chozas Carrascal, para tres variedades de uva: Merlot, Garnacha y Cabernet Sauvignon; donde se seleccionan 15, 9 y 8 cepas, respectivamente. Con ellas se realizan las diferentes microvinificaciones y se analizan los compuestos volátiles de cada uno de los vinos elaborados, mediante cromatografía de gases. Los datos obtenidos se trabajan con tratamiento estadístico con un análisis de varianza (ANOVA) de cada compuesto aromático por cada levadura y variedad; además de un PCA por variedad, para buscar las diferencias entre cepas. Los resultados obtenidos muestran que aquellas levaduras que confieren las mejores características organolépticas e implementan la calidad de los vinos resultantes para la variedad Merlot y Cabernet Sauvignon, son las correspondientes al género no-*Saccharomyces* (40 y 25B). Mientras que, para Garnacha, se observa que *Saccharomyces cerevisiae* es la levadura que mejor responde (T y 55).

**Palabras clave:** levaduras no-*Saccharomyces*, inoculación secuencial, cultivo mixto, compuestos volátiles, aroma, vino tinto.



**Títol:** Optimització de la fermentació amb llevats no-*Saccharomyces*. Estudi del perfil aromàtic del vins.

### **Resum**

El present treball es centra en la revaluació del paper dels llevats no-*Saccharomyces* en la vinificació, ja que en recents estudis s'ha destacat la seua positiva contribució a la composició analítica i sensorial del vi en cultius mixtes seqüencials junt amb *S. cerevisiae*. Per això, es realitza l'aïllament i la identificació de distints llevats autòctons de la D.O. Pago Chozas Carrascal, per a tres varietats de raïm: Merlot, Garnatxa i Cabernet Sauvignon; on es seleccionen 15, 9 i 8 ceps, respectivament. Amb això es realitza les diferents microvinificacions i s'analitzen els compostos volàtils de cada un dels vins elaborats, per mitjà de cromatografia de gasos. Les dades obtingudes es treballen amb tractament estadístic per mitjà d'una anàlisi de varianza (ANOVA) de cada compost aromàtic per cada llevat i varietat; a més d'un PCA per varietat, per a buscar les diferències entre ceps. Els resultats obtinguts mostren que aquells llevats que confereixen les millors característiques organolèptiques i implementen la qualitat dels vins resultants per a la varietat Merlot i Cabernet Sauvignon, són les corresponents al gènere no-*Saccharomyces* (40 i 25B). Mentre que, per a Garnatxa, s'observa que *Saccharomyces cerevisiae* es el llevat que millor respon (T i 55).

**Paraules clau:** llevats no-*Saccharomyces*, inoculació seqüencial, cultiu mixt, compostos volàtils, aroma, vi negre.

**Title:** Optimization of fermentation with non-*Saccharomyces* yeasts. Study of the aromatic profile of the wines.

### **Abstract**

The present work is focused on the re-evaluation of the role of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking, because recent studies have highlighted their positive contribution to the analytical and sensory composition of wine in sequential mixed culture in conjunction with *S. cerevisiae*. For this reason, the isolation and identification of different D.O. Pago Chozas Carrascal autochthonous yeasts has been carried out on three grape varieties: Merlot, Grenache and Cabernet Sauvignon; where 15, 9 and 8 strains have been selected, respectively. With this, different microvinifications are carried out and the volatile compounds of each wine elaborated are analysed by means of gas chromatography. Statistical treatment is applied to the obtained data through a variance analysis (ANOVA) of each aromatic compound for each yeast and variety; as well as a PCA per variety, to look for the differences between the strains. The results obtained show that those yeasts that confer the best organoleptic characteristics and implement the quality of the resulting wines for the variety Merlot and Cabernet Sauvignon, are those corresponding to no-*Saccharomyces* (40 and 25B). While, for Grenache, it is observed that *Saccharomyces cerevisiae* is the yeast that responds better (T and 55).

**Keywords:** non-*Saccharomyces* yeasts, sequential inoculation, mixed culture, volatile compounds, aroma, red wine.



# Índice

1.	INTRODUCCIÓN .....	1
<b>1.1.</b>	<b>Aroma varietal</b> .....	2
<b>1.2.</b>	<b>Aroma fermentativo</b> .....	3
1.2.1.	<i>Compuestos volátiles</i> .....	3
1.2.2.	<i>Levaduras</i> .....	5
2.	OBJETIVOS .....	1
3.	MATERIAL Y MÉTODOS .....	7
<b>3.1.</b>	<b>Materia prima</b> .....	7
3.1.1.	<i>Uva</i> .....	7
3.1.2.	<i>Levaduras</i> .....	7
<b>3.2.</b>	<b>Elaboración del vino</b> .....	9
<b>3.3.</b>	<b>Análisis de los compuestos volátiles</b> .....	10
3.3.1.	<i>Extracción</i> .....	10
3.3.2.	<i>Análisis cromatográfico</i> .....	11
3.3.3.	<i>Tratamiento estadístico</i> .....	12
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS .....	13
<b>4.1.</b>	<b>Influencia de la cepa de levadura sobre el perfil aromático del vino</b> .....	13
4.1.1.	<i>Ácidos</i> .....	13
4.1.2.	<i>Alcoholes</i> .....	16
4.1.3.	<i>Aldehídos</i> .....	19
4.1.4.	<i>Ésteres</i> .....	20
4.1.5.	<i>Lactonas</i> .....	24
<b>4.2.</b>	<b>Análisis de los Componentes Principales</b> .....	25
5.	CONCLUSIONES .....	29
6.	BIBLIOGRAFÍA .....	30

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1:</b> Aromas característicos de cada variedad de uva.....	2
<b>Tabla 2:</b> Compuestos volátiles, descriptor aromático y umbral de percepción.....	4
<b>Tabla 3:</b> Resumen de las propiedades enológicas a destacar de las levaduras empleadas en el ensayo .....	5
<b>Tabla 4:</b> Especies de levaduras seleccionadas en la variedad Merlot.....	7
<b>Tabla 5:</b> Especies de levaduras seleccionadas en la variedad Garnacha.....	7
<b>Tabla 6:</b> Especies de levaduras seleccionadas en la variedad Cabernet Sauvignon.....	8
<b>Tabla 7:</b> Nomenclatura de las levaduras utilizadas en el ensayo.....	8
<b>Tabla 8:</b> Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos volátiles de la variedad Merlot, para cada levadura y familia de ácidos (mg/L).....	14
<b>Tabla 9:</b> Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos volátiles de la variedad Garnacha, para cada levadura y familia de ácidos (mg/L).....	15
<b>Tabla 10:</b> Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos volátiles de la variedad Cabernet Sauvignon, para cada levadura y familia de ácidos (mg/L).....	15
<b>Tabla 11:</b> Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos volátiles de la variedad Merlot, para cada levadura y familia de alcoholes (mg/L).....	17
<b>Tabla 12:</b> Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos volátiles de la variedad Garnacha, para cada levadura y familia de alcoholes (mg/L).....	18
<b>Tabla 13:</b> Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos volátiles de la variedad Cabernet Sauvignon, para cada levadura y familia de alcoholes (mg/L).....	18
<b>Tabla 14:</b> Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos volátiles de la variedad Merlot, para cada levadura y familia de aldehídos (mg/L).....	19
<b>Tabla 15:</b> Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos volátiles de la variedad Garnacha, para cada levadura y familia de aldehídos (mg/L).....	19
<b>Tabla 16:</b> Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos volátiles de la variedad Cabernet Sauvignon, para cada levadura y familia de aldehídos (mg/L).....	20
<b>Tabla 17:</b> Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos volátiles de la variedad Merlot, para cada levadura y familia de ésteres (mg/L).....	21
<b>Tabla 18:</b> Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos volátiles de la variedad Garnacha, para cada levadura y familia de ésteres (mg/L).....	22
<b>Tabla 19:</b> Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos volátiles de la variedad Cabernet Sauvignon, para cada levadura y familia de ésteres (mg/L).....	23

<b>Tabla 20:</b> Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos volátiles de la variedad Merlot, para cada levadura y familia de lactonas (mg/L).....	24
<b>Tabla 21:</b> Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos volátiles de la variedad Garnacha, para cada levadura y familia de lactonas (mg/L).....	24
<b>Tabla 22:</b> Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos volátiles de la variedad Cabernet Sauvignon, para cada levadura y familia de lactonas (mg/L).....	25

nd: no detectable

## Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Diagrama de flujo del proceso de elaboración del vino tinto .....	10
<b>Figura 2:</b> Gráfico de puntuaciones para las cepas de levaduras en la variedad Merlot.....	26
<b>Figura 3:</b> Gráfico de cargas para los compuestos volátiles en la variedad Merlot.....	26
<b>Figura 4:</b> Gráfico de puntuaciones para las cepas de levaduras en la variedad Garnacha.....	27
<b>Figura 5:</b> Gráfico de cargas para los compuestos volátiles en la variedad Garnacha.....	27
<b>Figura 6:</b> Gráfico de puntuaciones para las cepas de levaduras en la variedad Cabernet Sauvignon.....	28
<b>Figura 7:</b> Gráfico de cargas para los compuestos volátiles en la variedad Cabernet Sauvignon.....	28



# 1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, el sector vitivinícola está experimentando modificaciones en los procedimientos de elaboración, debido a que cada vez es un sector más competitivo y debe satisfacer la creciente demanda. Es por ello, que se está empezando a introducir nuevos vinos en el mercado, enfocados en su papel como fuente de placer sensorial: más complejos y atractivos desde el punto de vista aromático (Luan *et al.*, 2018; Piñeiro, 2005; Rodríguez y Climent, 2017).

El aroma es uno de los atributos más importantes que contribuye a la calidad final del vino (Englezos *et al.*, 2018), y es el resultado de infinitas variaciones en la producción, que va desde la selección de las uvas, a la utilización de diversas técnicas para producir vinos con perfiles de sabor específicos (Swiegers *et al.*, 2008). Una de estas herramientas es la elección del microorganismo para realizar la fermentación (Luan *et al.*, 2018).

Tradicionalmente, la fermentación alcohólica del mosto se producía de manera espontánea, con la microflora presente en el hollejo de la uva y en la bodega, especies pertenecientes al género *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*; obteniendo vinos poco reproducibles, con tiempos de fermentación muy largos y con un elevado riesgo de presentar alteraciones microbiológicas y químicas. Para asegurar el control y aumentar la fiabilidad de la fermentación, se empezaron a emplear inóculos de cepas seleccionadas (Escribano-Viana *et al.*, 2018; Languet *et al.*, 2005; Santos, 2016). De este modo, se consigue obtener los beneficios de las fermentaciones espontáneas sin asumir el riesgo que éstas implican (Belda, 2017).

En un principio, el predominio de *Saccharomyces*, especialmente la especie *S. cerevisiae*, en el proceso de vinificación, y la creencia de que ciertas levaduras no-*Saccharomyces* podían producir altos niveles de compuestos no deseados, ha llevado a que las casas comerciales desarrollaran inóculos puros exclusivamente en torno a esta especie. Estas inoculaciones se emplean en la producción de vino a gran escala debido a la facilidad de control y homogeneidad de las fermentaciones, pero esto ha derivado en una cierta similitud organoléptica en los vinos obtenidos. Sin embargo, las fermentaciones espontáneas aportan complejidad aromática y variabilidad (Arslan *et al.*, 2018; Balerdi, 2016; Escribano *et al.*, 2018).

En la actualidad, como alternativa a ambas prácticas de fermentación, se están empleando nuevas cepas de levaduras autóctonas seleccionadas, con el fin de mejorar la calidad y proporcionar variación, además de conseguir vinos con caracteres únicos. Este requerimiento de cepas de levadura mejoradas y adaptadas a diferentes estilos de vino puede llevarse a cabo con el uso de levaduras del género no-*Saccharomyces*. La levadura no-*Saccharomyces* es un vocablo utilizado en el mundo de la enología para referirse a muchas especies diferentes de levadura (Jolly *et al.*, 2014; Medina *et al.*, 2013; Padilla *et al.*, 2016).

Por esta razón, para simular la fermentación natural del mosto y potenciar el *terroir*, se está empezando a estudiar el uso de cultivos mixtos con inoculaciones secuenciales de levaduras seleccionadas de no-*Saccharomyces* y cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. El efecto sobre el perfil sensorial de las especies no-*Saccharomyces* ha sido subestimado al no ser bien conocidas, pero existen referencias de que mejora la composición analítica y el perfil del aroma del vino, proporcionando tipicidad regional (Chen *et al.*, 2018; Marcon *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018).

Como es sabido, la fermentación es el proceso clave en la obtención del vino (Varela, 2016), e implica dos procesos de transformación biológica. La primera, la fermentación alcohólica, en la que las levaduras tienen un papel esencial, implica la conversión de los azúcares del mosto en etanol y dióxido de carbono, donde, entre otros, aparecen también una gama de metabolitos volátiles secundarios, que contribuyen al aroma final del vino. La segunda, la

fermentación maloláctica, se basa en la degradación del ácido málico en láctico, por acción de las bacterias lácticas y que, por tanto, permite una modificación sutil del vino, mejorando el perfil organoléptico (Englezos *et al.*, 2018; Padilla *et al.*, 2016; Swiegers *et al.*, 2008).

Las levaduras del género no-*Saccharomyces* desempeñan una labor importante en las primeras etapas de la fermentación alcohólica, pues poseen un alto potencial para producir enzimas y metabolitos secundarios, entre los que se encuentran los compuestos volátiles, que se traducen en importantes modificaciones del perfil organoléptico, influyendo en el aroma primario y secundario (Claus, 2009; García *et al.*, 2016; Padilla *et al.*, 2016). Sin embargo, presentan el inconveniente de que tienen una capacidad fermentativa limitada y sufren una muerte prematura al cabo de los 2-3 días (Luyt, 2015), debido a su sensibilidad al aumento de la concentración de etanol ( $\approx 5^\circ\text{A}$ ), a la presencia de anhídrido sulfuroso y a las condiciones anaeróbicas (Hu *et al.*, 2018). Además, esta desaparición temprana también puede deberse a la limitación de nutrientes o al efecto supresor que puede ejercer la dominancia del inóculo de *Saccharomyces cerevisiae*, aunque existen estudios que demuestran que *S. cerevisiae* se esfuerza por coexistir con levaduras no-*Saccharomyces* (Comitini *et al.*, 2011). Después, toma el control la cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, que completa la fermentación como levadura dominante, ya que es alcohógena y de gran pureza fermentativa (Luyt, 2015; Ocón, 2014).

Por tanto, el presente trabajo se centra en la reevaluación del papel de las levaduras no-*Saccharomyces* en la vinificación, ya que en recientes estudios se ha destacado su positiva contribución a la composición analítica y sensorial del vino. Incluso, hay investigaciones que demuestran que, a parte de su capacidad de producir enzimas y metabolitos secundarios, también liberan manoproteínas y glicerol, disminuyen el contenido en etanol y contribuyen a la estabilidad del color (Comitini *et al.*, 2011).

El aroma del vino se puede subdividir en tres bloques: el aroma primario o varietal, el aroma secundario o fermentativo y el terciario o de envejecimiento. Como se ha mencionado anteriormente, las levaduras no-*Saccharomyces* pueden influir en los dos primeros (Padilla *et al.*, 2016).

### 1.1. Aroma varietal

El aroma primario es aquel que procede de la uva y se forma durante su maduración, es decir, son sustancias olorosas ligadas a la variedad, cuya contribución al aroma final del vino es una característica a considerar (Gamero, 2011).

Los aromas característicos de las variedades Merlot, Garnacha y Cabernet Sauvignon se muestran en la Tabla 1:

Tabla 1: Aromas característicos de cada variedad de uva. Referencias: <sup>1</sup>Enominer, 2015; <sup>2</sup>Ribera del Duero, 2017; <sup>3,4,5</sup>Vitivinicultura, 2012.

Variedad de uva	Aromas
Merlot	Frutos negros: grosellas y moras <sup>2</sup> .
	Matices de frutos secos, violeta, trufa y cuero <sup>3</sup> .
Garnacha	Fresa madura <sup>2</sup> .
	Vinos jóvenes: pimienta recién molida <sup>4</sup> .
	Vinos de envejecimiento: manzana con toques minerales <sup>4</sup> .
Cabernet Sauvignon	Grosella y violeta <sup>1</sup> .
	Vinos jóvenes: pimienta verde, aceitunas y menta <sup>5</sup> .
	Vinos de envejecimiento: chocolate y tabaco <sup>5</sup> .

## 1.2. Aroma fermentativo

El aroma secundario aparece durante el proceso de fermentación, por lo que la concentración de los compuestos volátiles depende del tipo de levadura y de las condiciones fermentativas (Santos, 2016).

### 1.2.1. Compuestos volátiles

Los principales grupos de compuestos que contribuyen al aroma del vino son: ácidos orgánicos, alcoholes superiores, ésteres y aldehídos. El perfil aromático es el resultado de la combinación e interacción entre éstos, aunque los que otorgan calidad e intensidad aromática al vino son mayoritariamente alcoholes y ésteres (Lambert, 2017).

El grupo de compuestos aromáticos más importante es el de los alcoholes, pues tienen función como precursores en la formación de ésteres. Elevadas concentraciones de alcoholes contribuyen negativamente al aroma de los vinos, porque pueden disfrazar los aromas aportados por los ésteres; mientras que, en concentraciones moderadas, son parte fundamental de la complejidad aromática. En general se consideran aromas desagradables, salvo el 2-feniletanol, que es el alcohol aromático más significativo. Individualmente, la mayor parte está en cantidades por debajo de los umbrales de percepción olfativa (Gamero, 2011; Lambrechts y Pretorius, 2000; Vilanova y Oliveira, 2012).

Los ácidos no inciden directamente en el aroma de los vinos, pero son clave porque se esterifican con los distintos alcoholes presentes en el medio, dando lugar a los ésteres, que son generalmente considerados como agradables. Los ácidos grasos se juzgan como desagradables, aunque no es común que sobrepasen sus umbrales (Alarcón, 2016).

Así, los ésteres presentes en los vinos son muy variados y contribuyen de modo significativo en el aroma, a pesar de no encontrarse en elevadas concentraciones. Los ésteres aportan a los vinos un aroma fresco y afrutado (Ivit *et al.*, 2018). Se pueden dividir en ésteres etílicos o de acetato. Estos últimos, derivan del acetato y de un grupo alcohol (normalmente el etanol), y los más abundantes son: acetato de etilo (a concentraciones elevadas tiene un aroma desagradable a disolvente y se considera como un defecto en el vino, mientras que a concentraciones muy bajas aporta aroma frutal), acetato de isoamilo (olor a plátano, tiende a monopolizar el aroma de los vinos en concentraciones elevadas) y 2-feniletacetato (aromas florales). Por otro lado, los ésteres etílicos se componen de etanol y un grupo acilo, como son el hexanoato y octanoato de etilo, que aportan aromas frutales (Alarcón, 2016; Belda, 2017; Holt *et al.*, 2012; Saerens *et al.*, 2010).

Los aldehídos le confieren al vino aromas a manzana o frutos secos, dependiendo de la estructura química que posean. El compuesto mayoritario es el acetaldehído, llegando a suponer el 90% del total de aldehídos presentes en los vinos (Alarcón, 2016; Santos, 2016).

A grandes rasgos, se puede clasificar los compuestos volátiles en dos grupos: los activos, que se encuentran en una mayor concentración y, por tanto, por encima del umbral de percepción; y los inactivos, que al estar por debajo del umbral no se pueden percibir (Montalvá, 2017).

Los compuestos volátiles a estudiar se muestran en la Tabla 2:

Tabla 2: Compuestos volátiles, descriptor aromático y umbral de percepción. Referencias: <sup>1</sup>Culleré *et al.*, 2004; <sup>2</sup>Englezos *et al.*, 2018; <sup>3</sup>Ferreira *et al.*, 2000; <sup>4</sup>Francis, 2013; <sup>5</sup>Gambetta *et al.*, 2014; <sup>6</sup>Hu *et al.*, 2018; <sup>7</sup>Jiang y Zhang, 2010; <sup>8</sup>Lambert, 2017; <sup>9</sup>Marcon *et al.*, 2018; <sup>10</sup>Vilanova y Oliveira, 2012; <sup>11</sup>Zea *et al.*, 2001.

Familia	Compuesto volátil	Descriptor aromático	Umbral de percepción (mg/L)	
Ácidos	Ácido butírico	Rancio, queso <sup>4</sup>	0,173 <sup>1</sup>	
	Ácido decanoico	Rancio, graso <sup>4</sup>	1 <sup>2</sup>	
	Ácido 2-etilhexanoico	No encontrado	No encontrado	
	Ácido hexanoico	Rancio, queso, graso <sup>7</sup>	0,42 <sup>6</sup>	
	Ácido isobutírico	Rancio, queso <sup>4</sup>	2,3 <sup>4</sup>	
	Ácido isopentanoico	No encontrado	No encontrado	
	Ácido octanoico	Rancio, mantequilla <sup>7</sup>	0,5 <sup>9</sup>	
Alcoholes	Alcohol isoamílico	Alcohol <sup>11</sup> , whiskey <sup>6</sup>	30 <sup>2</sup>	
	Alcohol bencílico	Almendra <sup>8</sup>	10 <sup>5</sup>	
	2,3-butanodiol	Mantequilla <sup>7</sup>	120 <sup>2</sup>	
	1-butanol	Alcohol, medicinal <sup>7</sup>	150 <sup>6</sup>	
	2-feniletanol	Rosa, lila <sup>4</sup> , polen <sup>7</sup>	14 <sup>6</sup>	
	1-heptanol	Frutal, dulce <sup>7</sup>	1 <sup>7</sup>	
	Cis-3-hexenol	Herbáceo <sup>11</sup>	0,4 <sup>2</sup>	
Aldehídos	1-propanol	Alcohol, fruta madura <sup>5</sup>	306 <sup>5</sup>	
	Acetaldehído	Manzana <sup>11</sup> , herbáceo <sup>7</sup>	0,5 <sup>1</sup>	
	Benzaldehído	Almendra <sup>8</sup>	2 <sup>8</sup>	
	Dietil acetal	No encontrado	No encontrado	
Ésteres	Siringaldehído	No encontrado	50 <sup>1</sup>	
	Acetato de etilo	Frutal, disolvente <sup>4</sup>	7,5 <sup>2</sup>	
	Acetato de hexilo	Manzana <sup>5</sup> , pera <sup>7</sup>	0,67 <sup>9</sup>	
	Acetato de isoamilo	Plátano <sup>4</sup> , pera <sup>8</sup>	0,03 <sup>8</sup>	
	Acetato de metilo	No encontrado	No encontrado	
	Butirato de etilo	Manzana, fresa <sup>6</sup>	0,02 <sup>6</sup>	
	Decanoato de etilo	Frutal, miel <sup>7</sup>	0,2 <sup>2</sup>	
	Dietil glutarato	No encontrado	No encontrado	
	Etil isovalerato	Banana, frutal <sup>6</sup>	0,003 <sup>6</sup>	
	2-feniletacetato	Rosa, miel <sup>4</sup>	0,25 <sup>9</sup>	
	Hexanoato de etilo	Manzana, fresa <sup>5</sup> , piña <sup>8</sup>	0,014 <sup>2</sup>	
	Lactato de etilo	Lácteo, fresa <sup>6</sup>	155 <sup>7</sup>	
	Octanoato de etilo	Piña, pera, floral <sup>7</sup>	0,005 <sup>2</sup>	
	Succinato de dietilo	Caramelo <sup>5</sup>	200 <sup>5</sup>	
	Lactonas	γ-butirolactona	Coco, ciruela, caramelo <sup>5</sup>	0,035 <sup>1</sup>
		β-damascenona	Melocotón, manzana <sup>5</sup>	0,00005 <sup>2</sup>
		Decalactona	Melocotón <sup>1</sup>	0,088 <sup>3</sup>
		α-ionona	Violeta <sup>10</sup>	0,0026 <sup>3</sup>
		γ-octalactona	Melocotón <sup>4</sup>	0,4 <sup>1</sup>
		Pantolactona	No encontrado	No encontrado

### 1.2.2. Levaduras

Las levaduras vínicas se pueden clasificar dependiendo de su aparición a lo largo del proceso fermentativo: las de bajo poder fermentativo comprenden a levaduras pertenecientes a diferentes géneros englobadas en la denominación de levaduras no-*Saccharomyces*; y a las cepas de *S. cerevisiae*, como las de alto poder fermentativo (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006; Suárez y Morata, 2015). Como se ha comentado, a pesar de crecer únicamente durante los primeros días de la etapa fermentativa, las levaduras no-*Saccharomyces* producen y secretan gran cantidad de enzimas, como la  $\beta$ -glucosidasa, que es relevante por su capacidad para transformar los compuestos no volátiles en compuestos volátiles a través de su acción enzimática, contribuyendo a mejorar el perfil aromático (Ivit *et al.*, 2018; Lambert, 2017; Luan *et al.*, 2018).

Además, las cepas autóctonas seleccionadas poseen también mayor efectividad frente a las levaduras comerciales, tanto a nivel de implantación como de adecuación al medio durante la fermentación, ya que se encuentran en un área específica, por lo que están adaptadas a las condiciones climáticas de ésta y poseen la capacidad de ajustarse a las particularidades de la materia prima, potenciando así el carácter del *terroir* al contribuir en el carácter regional del vino (Arslan *et al.*, 2018; Lambert, 2017; Zhang *et al.*, 2018).

En este sentido, la selección de las cepas no-*Saccharomyces* es muy importante para la elaboración de nuevos cultivos iniciales, puesto que son capaces de producir varios compuestos secundarios que pueden tener una influencia positiva en la calidad final del vino (Garofalo *et al.*, 2016).

Algunas investigaciones muestran la contribución en el vino de la utilización de las levaduras no-*Saccharomyces* objeto de estudio (Tabla 3):

Tabla 3: Resumen de las propiedades enológicas a destacar de las levaduras empleadas en el ensayo. Referencias: <sup>1</sup>Andorrà *et al.*, 2010; <sup>2</sup>Arslan *et al.*, 2018; <sup>3</sup>Azzolini *et al.*, 2015; <sup>4</sup>Belda, 2017; <sup>5</sup>Chen *et al.*, 2018; <sup>6</sup>Englezos *et al.*, 2016; <sup>7</sup>Englezos *et al.*, 2018; <sup>8</sup>Escribano *et al.*, 2018; <sup>9</sup>Escribano-Viana *et al.*, 2018; <sup>10</sup>Garofalo *et al.*, 2016; <sup>11</sup>Gobbi *et al.*, 2013; <sup>12</sup>Hu *et al.*, 2018; <sup>13</sup>Jara *et al.*, 2016; <sup>14</sup>López *et al.*, 2014; <sup>15</sup>Luan *et al.*, 2018; <sup>16</sup>Moreira *et al.*, 2008; <sup>17</sup>Moreira *et al.*, 2011; <sup>18</sup>Sadoudi *et al.*, 2012; <sup>19</sup>Tristezza *et al.*, 2016; <sup>20</sup>Tofalo *et al.*, 2012; <sup>21</sup>Velázquez *et al.*, 2015; <sup>22</sup>Velázquez *et al.*, 2017; <sup>23</sup>Wang y Liu, 2013; <sup>24</sup>Xu *et al.*, 2006.

Levadura	Propiedades
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	Aumento de la producción de 1-propanol y 2-feniletacetato <sup>17</sup> . Liberación de 1-butanol, hexanoato de etilo, acetato de metilo y ácido isopentanoico <sup>16,17</sup> . Disminución de acetato de etilo <sup>16</sup> . Reducción del contenido total de alcoholes superiores <sup>16</sup> . Aromas a frutas de hueso y tropicales <sup>13</sup> .
<i>Hanseniaspora meyeri</i>	Aumento en la concentración de 2-feniletanol <sup>14</sup> . Aromas a frutas de hueso y tropicales <sup>13</sup> .
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	Incremento de la síntesis y producción de alcoholes superiores, como el 2-feniletanol <sup>15</sup> . Aumento de la concentración de acetato de etilo <sup>14,23</sup> . Aromas a frutas de hueso y tropicales <sup>13</sup> . Larga persistencia <sup>23</sup> .

Levadura	Propiedades
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Aumento en la concentración de acetaldehído y acetato de isoamilo <sup>1,9</sup> . Incremento del contenido total de alcoholes, como 2-feniletanol <sup>14</sup> . Aumento de la producción de ésteres de etilo, como 2-feniletacetato <sup>12,14</sup> . Disminución de acetato de etilo <sup>9</sup> . Aromas a frutas de hueso y tropicales <sup>13</sup> . Muy abundante y predominante al inicio de la fermentación <sup>10</sup> .
<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	Incremento de la concentración de ésteres etílicos, como acetato de etilo y 2-feniletacetato <sup>24</sup> . Reducción del contenido total de alcoholes superiores <sup>24</sup> .
<i>Lachancea thermotolerans</i>	Mayor efectividad en la producción de alcoholes, como 2-feniletanol, 1-propanol y 1-hexanol <sup>5,8,11</sup> . Mayor producción de acetato de etilo y exceso de lactato de etilo <sup>5,8</sup> . Obtención de vinos con atributos “ácidos” o “picantes” <sup>4</sup> . Alto nivel de competitividad y permanencia <sup>9,11</sup> .
<i>Starmerella bacillaris</i>	Potenciación de 2-feniletanol y 2-feniletacetato <sup>1,6,7</sup> . Incremento en la producción de ésteres, excepto de acetato de etilo y hexanoato de etilo <sup>6,7</sup> . Fuerte productora de lactonas <sup>18</sup> . Disminución de la producción de ácidos, aldehídos y alcoholes, como alcohol isoamílico y 2-octanol <sup>1,4,7</sup> . Cinética fermentativa más lenta <sup>20</sup> .
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Liberación de 2-feniletanol, 1-propanol y $\gamma$ -butirolactona <sup>2,3,21</sup> . Disminución de la concentración de ácidos grasos y ésteres, como ácido decanoico, acetato de isoamilo y octanoato de etilo <sup>3,22</sup> . Mayor producción de acetato de etilo <sup>2,5</sup> . Mayor efectividad en la producción de alcoholes, como alcohol isoamílico <sup>2,5</sup> . Disminución de la astringencia <sup>3</sup> . Cinética fermentativa más lenta, factor <i>killer</i> y alta permanencia <sup>9,21,22</sup> .

## 2. OBJETIVOS

Este proyecto se encuentra englobado en uno de mayor amplitud en el que se desea valorar la contribución y el potencial de las levaduras del género no-*Saccharomyces*, en cultivos mixtos con inoculación secuencial junto con *Saccharomyces cerevisiae*, en vinos elaborados a partir de las variedades de uva Merlot, Garnacha y Cabernet Sauvignon.

El objetivo de este trabajo consiste en caracterizar químicamente la síntesis de componentes aromáticos, llevada a cabo por levaduras seleccionadas del género no-*Saccharomyces*, a partir de mostos de las variedades Merlot, Garnacha y Cabernet Sauvignon. En aras de evaluar el perfil de los compuestos volátiles de los vinos tintos obtenidos de las microvinificaciones, con las distintas variedades de uva y con las respectivas levaduras, para poder seleccionar aquellas que confieran las mejores características organolépticas e implementen la calidad de los vinos resultantes.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Materia prima

##### 3.1.1. Uva

Se ha utilizado uva procedente de la bodega D.O. Pago Chozas Carrascal, de tres variedades diferentes: Merlot, Garnacha y Cabernet Sauvignon.

La uva se vendimió de forma manual en octubre de 2016, depositando los racimos en cajas de plástico de unos 12 kg, para evitar aplastamientos y el mosteo de las uvas. Se llevaron directamente a la bodega, donde se refrigeraron en cámaras, hasta su posterior transporte al Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (IIAD) perteneciente a la UPV, donde se congelaron hasta su futuro uso.

##### 3.1.2. Levaduras

###### 3.1.2.1. Género no-Saccharomyces

Los microorganismos de estudio fueron diversas cepas del género no-Saccharomyces aisladas a partir de la flora propia para cada variedad de uva, que fueron identificadas y seleccionadas por el departamento de Microbiología del laboratorio ENOLAB de la Universitat de València. Para cada una de las cepas, se realizaron estudios previos: cinética de fermentación, tasa de crecimiento, degradación de glucosa y fructosa, etc., con el objetivo de seleccionar aquellas con mejores características enológicas.

Finalmente, se seleccionaron 15 cepas de levaduras para la variedad Merlot, 9 para Garnacha y 8 para Cabernet Sauvignon; cuyos ensayos se realizaron por triplicado. En las siguientes tablas se muestran las cepas de levaduras no-Saccharomyces de cada variedad con sus correspondientes nomenclaturas:

Tabla 4: Especies de levaduras seleccionadas en la variedad Merlot.

<b>Especie</b>	<b>Aislados</b>
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	42B, 42E, 42F
<i>Hanseniaspora opuntiae/guilliermondii</i>	15F
<i>Hanseniaspora opuntiae/uvarum</i>	1G
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	15C, 15D, 15E, 15H, 15I, 40, 42D, 42K, 42L
<i>Hanseniaspora uvarum/opuntiae/meyeri</i>	42C
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	T

Tabla 5: Especies de levaduras seleccionadas en la variedad Garnacha.

<b>Especie</b>	<b>Aislados</b>
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	47F
<i>Hanseniaspora opuntiae/uvarum</i>	47B
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	21C, 47C, 47E, 48D, 48E, 49C, 52
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	55, T

Tabla 6: Especies de levaduras seleccionadas en la variedad Cabernet Sauvignon.

<b>Especie</b>	<b>Aislados</b>
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	25B, 52
<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	30A
<i>Lachancea thermotolerans</i>	58C
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	55, T
<i>Starmerella bacillaris</i>	54
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	26D, 58A, 58E

Para comprobar y corroborar que se implantaron las levaduras inoculadas, se tomaron diversas muestras en diferentes momentos de la fermentación y se reconocieron mediante la extracción, amplificación e identificación del ADN mitocondrial mediante PCR, que efectivamente las levaduras seleccionadas para realizar el estudio eran las que habían llevado a cabo la fermentación del mosto. Este proceso también lo llevó a cabo el departamento de Microbiología de la Universitat de València.

### 3.1.2.2. Género *Saccharomyces*

La cepa de *S. cerevisiae* empleada para este estudio, procede de otros ensayos anteriormente realizados, de los que se partió de 27 levaduras de las cuáles únicamente se seleccionaron 3, y de donde una de ellas fue la elegida, por ser la que mejores características enológicas presentaba. No se le ha asignado ningún nombre a esta cepa porque se ha aislado de los mostos propios de la bodega.

A continuación, se muestran las levaduras utilizadas en el ensayo:

Tabla 7: Nomenclatura de las levaduras utilizadas en el ensayo.

<b>Muestra</b>	<b><i>Merlot</i></b>	<b><i>Garnacha</i></b>	<b><i>Cabernet Sauvignon</i></b>
<b>1</b>	T	T	T
<b>2</b>	1G	55	55
<b>3</b>	15C	21C	25B
<b>4</b>	15D	47B	26D
<b>5</b>	15E	47C	30A
<b>6</b>	15F	47E	52
<b>7</b>	15H	47F	54
<b>8</b>	15I	48D	58A
<b>9</b>	40	48E	58C
<b>10</b>	42B	49C	58E
<b>11</b>	42C	52	
<b>12</b>	42D		
<b>13</b>	42E		
<b>14</b>	42F		
<b>15</b>	42K		
<b>16</b>	42L		

El código T hace referencia al testigo analizado para cada una de las variedades de uva, que se ensayó en paralelo para actuar como un control, y fue inoculado únicamente con *Saccharomyces cerevisiae*.

Como se puede observar, tanto en la variedad Garnacha como en la de Cabernet Sauvignon, hubo un error en la identificación inicial de las levaduras y se inoculó la cepa 55, correspondiente a *S. cerevisiae*, como no-*Saccharomyces*. Con las diversas pruebas realizadas por el laboratorio ENOLAB, se pudo comprobar este fallo, pero se ha estudiado igualmente como control, a parte del testigo. Para ambos casos, tanto para T como 55, también se realizaron microvinificaciones por triplicado.

### 3.2. Elaboración del vino

El proceso de elaboración de los vinos a partir de las diferentes variedades de uva se realizó en la planta piloto del IIAD, en la Universitat Politècnica de València, según el esquema representado en la Figura 1.

Tras descongelar las uvas a temperatura ambiente, se seleccionaron y desgranaron manualmente los racimos, separando las bayas del raspón y eliminando los pedicelos. Después de un ligero estrujado manual, se distribuyeron 1,4 kg de uva por cada tarro de 2L, para poder realizar microvinificaciones con cada una de las levaduras a partir de cada variedad. Como todos los ensayos se realizaron por triplicado, se llenaron un total de 48 botes para la variedad Merlot, 33 para la variedad Garnacha y 30 para Cabernet Sauvignon. Se colocó encima de cada bote una tapa, sin llegar a cerrarla herméticamente, con el fin de permitir la salida del CO<sub>2</sub> liberado.

Seguidamente, se bazuqueó 3 veces y se adicionó dicarbonato de dimetilo (DMDC) a razón de 20 mg/L, un antiséptico empleado para eliminar las posibles levaduras existentes que podrían contaminar las muestras y asegurar el posterior crecimiento de las cepas de levaduras no-*Saccharomyces* seleccionadas para el ensayo, las cuales se inocularon con un volumen de colonias de 10<sup>6</sup> ufc/mL. A los dos días (≈3-4<sup>o</sup>A) de la inoculación de las cepas no-*Saccharomyces*, se sembró la cepa de levadura de *S. cerevisiae*, también a razón de 10<sup>6</sup> ufc/mL.

Durante la fermentación alcohólica, se realizaron 10 bazuqueos diarios para favorecer el contacto de los hollejos con el mosto y una distribución uniforme de las levaduras. También se realizó un seguimiento de la temperatura (≈25-26°C) y de la densidad, para comprobar que el proceso se estaba desarrollando correctamente.

La fermentación alcohólica duró 10 días y, cuando el valor de la densidad era próximo a 990 g/L, se realizó un prensado del contenido de cada uno de los botes, mediante una prensa hidráulica de laboratorio a una presión de 2 kg/cm<sup>2</sup>, durante un minuto y medio. El vino resultante se pasó a botes estancos de 0,5 L y 0,25 L; y en el caso de haber espacio de cabeza, se añadieron canicas para aumentar el volumen y evitar la presencia de O<sub>2</sub>.

Una vez terminada la fermentación alcohólica, se inocularon las bacterias lácticas y, para controlar la fermentación maloláctica, se realizaron determinaciones del ácido málico por cromatografía en papel, hasta que todo el ácido málico se hubo transformado en ácido láctico. Tras este proceso, se realizaron trasiegos de todos los botes y se le añadió metabisulfito potásico en polvo (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) a razón de 50 g/hL, para asegurar su conservación hasta el momento de realizar su análisis.

Finalmente, los vinos fueron almacenados a 4°C de temperatura y a humedad controlada, para su correcta conservación, y evitando que pudieran sufrir cualquier alteración.

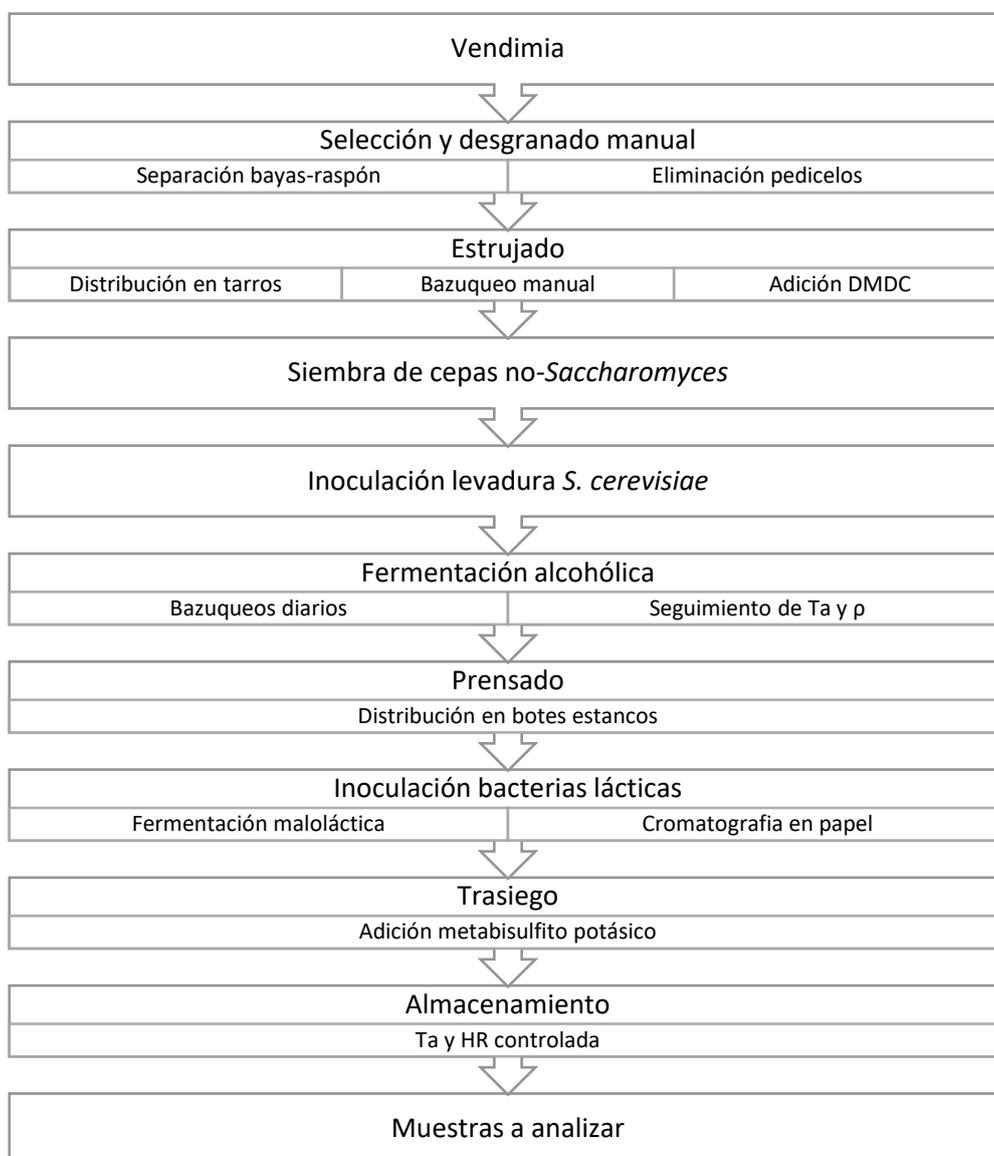


Figura 1: Diagrama de flujo del proceso de elaboración del vino tinto.

### 3.3. Análisis de los compuestos volátiles

#### 3.3.1. Extracción

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

El protocolo a seguir para la extracción de los compuestos volátiles fue el siguiente:

En tubos de 15 mL, se añade, de forma secuencial:

- 4,05 g de sulfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 2,7 mL de vino (introducidos con pipeta)
- 6,3 mL de agua miliQ (con pipeta)
- 0,25 mL de diclorometano  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (con jeringuilla de plástico de 1 mL)
- 40  $\mu\text{L}$  de patrón interno (con jeringuilla de vidrio de 50  $\mu\text{L}$ ; PI: 2-butanol, 4-metil-2-pentanol y 2-octanol en etanol)

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

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

Esta fase se extrajo de debajo de la capa de sal mediante jeringuilla de vidrio de 1 mL, y se depositó en un vial de 2 mL con microinserto.

### 3.3.2. *Análisis cromatográfico*

Debido a la gran variedad de compuestos que intervienen en el aroma de los vinos, el estudio de los compuestos volátiles es complicado, en especial cuando se pretende determinar componentes minoritarios que se presentan en concentraciones muy débiles. El análisis de estos compuestos requiere de una técnica que sea capaz de diferenciar e identificar el mayor número posible de sustancias presentes. La técnica que por el momento permite la determinación de compuestos volátiles tanto mayoritarios como minoritarios es la cromatografía de gases.

Por tanto, se utilizó un cromatógrafo de gases HP-6890 dotado de detector de ionización de llama, equipado con una columna capilar HP-INNOWax (Crosslinked Polyethylene Glycol) de 60 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y  $\text{H}_2$  como gas portador.

Las condiciones de trabajo fueron:

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

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

### 3.3.3. Tratamiento estadístico

El tratamiento estadístico de los resultados obtenidos se realiza mediante el Análisis de la Varianza clásica (ANOVA). Se estudia el predominio de cada levadura seleccionada del género no-*Saccharomyces* y de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en las diferentes variedades de uva, para cuantificar e interpretar la influencia de los compuestos volátiles sobre el perfil aromático. Se calculan las diferencias mínimas significativas (LSD) con un nivel de significación de P-Value < 0,05. Además, se muestran los resultados del tratamiento estadístico mediante tablas con letras (generalmente: a, b, c, etc.), de tal forma que letras distintas indican diferencias significativas.

También se realiza el Análisis de Componentes Principales (PCA) con la utilización del paquete informático Statgraphics Plus 5.1. Se emplea para explicar la variabilidad de los datos con el objetivo de buscar relaciones existentes entre compuestos volátiles y las cepas de levaduras. Dicho análisis es uno de los métodos pioneros del análisis multivariante. Es una técnica que permite la reducción de la dimensión que describe la información de un conjunto de variables más pequeñas denominados componentes principales, que son combinaciones lineales de las variables de partida.

El primer componente principal es la dirección del espacio, que recoge la mayor parte de la variabilidad, que es una combinación de todas las variables iniciales que se ha tomado para describir el conjunto de datos. En cambio, la segunda componente, recoge la mayor parte de la información que todavía queda por explicar, y también es una combinación lineal de todas las variables que se han tomado inicialmente para describir el conjunto de datos.

El gráfico de puntuaciones (*scores*), que hace referencia a los componentes principales, muestra la distribución de las cepas de las levaduras en la matriz. Mientras que, el gráfico de cargas (*loading*), que indica el peso de los componentes, muestra la disposición de los distintos compuestos volátiles en el plano, en función de los dos ejes principales (Componente 1 y Componente 2). Las distintas levaduras y compuestos aromáticos se sitúan aleatoriamente a lo largo de los ejes principales, tanto en su parte positiva como en su parte negativa.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Se ha determinado un total de 29 compuestos volátiles en los vinos, agrupados en 5 familias: 6 ácidos, 7 alcoholes, 4 aldehídos, 9 ésteres y 3 lactonas. El resto de los compuestos analizados: ácido octanoico, 1-heptanol, acetato de etilo, etil isovalerato, hexanoato de etilo, succinato de dietilo,  $\beta$ -damascenona,  $\alpha$ -ionona y  $\gamma$ -octalactona, no se han incluido en los análisis estadísticos al no salir representativos.

Como se ha comentado en apartados anteriores, el perfil aromático de un vino es el resultado de la combinación e interacción entre los distintos grupos de compuestos aromáticos. Por lo que, para analizar mejor el efecto de las levaduras no-*Saccharomyces*, se ha realizado el estudio atendiendo a las diferentes familias de compuestos volátiles, ya que como el aroma de los compuestos de un mismo grupo es igual o similar, el resultado es que en el vino puede percibirse la nota aromática característica de la familia. Asimismo, tienen gran influencia sobre el perfil aquellos compuestos volátiles que se encuentran por encima de su umbral de percepción y, por tanto, también se ha tenido en cuenta esta información.

### 4.1. Influencia de la cepa de levadura sobre el perfil aromático del vino

Así pues, los resultados del análisis ANOVA de los compuestos aromáticos con el factor tipo de levadura para las variedades estudiadas: Merlot, Garnacha y Cabernet Sauvignon, se muestran en las siguientes tablas, agrupados por familias odorantes.

#### 4.1.1. Ácidos

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

Como se puede observar en la Tabla 8 y en la Tabla 10, las mayores productoras de ácidos son la cepa 15F para la variedad Merlot y, la cepa 25B, para Cabernet Sauvignon, que se distinguen significativamente del resto de levaduras. Además, se pone de manifiesto que la levadura *S. cerevisiae* (T y 55) es la menor productora de estos compuestos. En cambio, en el caso del vino obtenido de la variedad Garnacha (Tabla 9), ocurre el efecto contrario, obteniendo mejores resultados para el cultivo puro que para los mixtos con levaduras no-*Saccharomyces*.

Es necesario destacar también que, aunque el total de los ácidos no supera la concentración establecida para considerar que tienen un impacto negativo sobre el aroma del vino, algunos de los compuestos volátiles superan su umbral de percepción, pudiendo otorgar perfiles rancios. Es el caso del ácido butírico para la cepa 55 (0.2122 mg/L) y la cepa 47B (0.1749 mg/L) de la variedad Garnacha, y del ácido hexanoico para la levadura 30A (0.6298 mg/L) de Cabernet Sauvignon.

Tabla 8: Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos volátiles de la variedad Merlot, para cada levadura y familia de ácidos (mg/L).

MERLOT							
Levadura	Ác. Butírico	Ác. Decanoico	Ác. 2-etilhexanoico	Ác. Hexanoico	Ác. Isobutírico	Ác. Isopentanoico	ÁCIDOS
<b>T</b>	0,0857 ± 0,0094 ab	0,0421 ± 0,0049 ab	0,0132 ± 0,0034 d	0,0930 ± 0,0559 a	0,1235 ± 0,0086 ab	0,0746 ± 0,0690 abc	0,4315
<b>1G</b>	0,0895 ± 0,0036 abc	0,0318 ± 0,0241 a	0,0012 ± 0,0005 a	0,0860 ± 0,0400 a	0,1479 ± 0,0212 bcde	0,0507 ± 0,0663 abc	0,4070
<b>15C</b>	0,0883 ± 0,0144 ab	0,1043 ± 0,0277 f	0,0018 ± 0,0009 abc	0,1987 ± 0,0328 cdef	0,1150 ± 0,0288 a	0,0032 ± 0,0005 a	0,5114
<b>15D</b>	0,0767 ± 0,0139 a	0,0790 ± 0,0194 cde	0,0014 ± 0,0006 ab	0,2144 ± 0,0403 def	0,1454 ± 0,0297 bcde	0,0029 ± 0,0009 a	0,5197
<b>15E</b>	0,0990 ± 0,0029 bc	0,0338 ± 0,0023 a	0,0023 ± 0,0005 abc	0,1890 ± 0,0155 bcde	0,1502 ± 0,0048 bcde	0,0035 ± 0,0015 a	0,4778
<b>15F</b>	0,1334 ± 0,0058 e	0,1591 ± 0,0182 g	0,0031 ± 0,0021 c	0,2619 ± 0,0451 f	0,1618 ± 0,0247 cdef	0,1089 ± 0,1200 c	0,8282
<b>15H</b>	0,1238 ± 0,0022 de	0,0856 ± 0,0211 def	0,0018 ± 0,0005 abc	0,1766 ± 0,1051 bcde	0,1650 ± 0,0129 def	0,0011 ± 0,0013 a	0,5539
<b>15I</b>	0,0980 ± 0,0026 bc	0,1085 ± 0,0156 f	0,0016 ± 0,0006 abc	0,2395 ± 0,0107 ef	0,1452 ± 0,0032 bcde	0,0036 ± 0,0008 a	0,5964
<b>40</b>	0,1386 ± 0,0142 e	0,0672 ± 0,0180 cde	0,0021 ± 0,0008 abc	0,3560 ± 0,1032 g	0,1343 ± 0,0101 abc	0,0749 ± 0,1088 c	0,7731
<b>42B</b>	0,1082 ± 0,0117 cd	0,0360 ± 0,0147 a	0,0028 ± 0,0023 bc	0,1829 ± 0,0884 bcde	0,2033 ± 0,0458 g	0,0036 ± 0,0025 ab	0,5367
<b>42C</b>	0,1358 ± 0,0094 e	0,0916 ± 0,0169 ef	0,0016 ± 0,0005 abc	0,1861 ± 0,0655 bcde	0,1537 ± 0,0033 cde	0,0016 ± 0,0015 a	0,5704
<b>42D</b>	0,0930 ± 0,0039 abc	0,0551 ± 0,0214 abc	0,0018 ± 0,0006 abc	0,1771 ± 0,0287 bcde	0,1723 ± 0,0114 ef	0,0019 ± 0,0021 a	0,5012
<b>42E</b>	0,1350 ± 0,0485 e	0,0633 ± 0,0380 bcd	0,0022 ± 0,0014 abc	0,1382 ± 0,0690 abc	0,1634 ± 0,0387 def	0,0030 ± 0,0011 a	0,5051
<b>42F</b>	0,1248 ± 0,0278 de	0,0350 ± 0,0129 a	0,0021 ± 0,0006 abc	0,1430 ± 0,0625 abcd	0,1883 ± 0,0362 fg	0,0807 ± 0,0920 c	0,5740
<b>42K</b>	0,0892 ± 0,0071 ab	0,0364 ± 0,0229 a	0,0016 ± 0,0004 abc	0,1239 ± 0,0684 ab	0,1402 ± 0,0110 abcd	0,0826 ± 0,0765 bc	0,4738
<b>42L</b>	0,1317 ± 0,0158 e	0,1074 ± 0,0344 f	0,0030 ± 0,0016 c	0,2617 ± 0,0826 f	0,1667 ± 0,0523 def	0,0374 ± 0,0793 abc	0,7079

Letras distintas indican diferencias significativas. nd: no detectable.

Tabla 9: Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos volátiles de la variedad Garnacha, para cada levadura y familia de ácidos (mg/L).

GARNACHA							
Levadura	Ác. Butírico	Ác. Decanoico	Ác. 2-etilhexanoico	Ác. Hexanoico	Ác. Isobutírico	Ác. Isopentanoico	ÁCIDOS
T	0,1426 ± 0,0227 cd	0,0651 ± 0,0196 e	0,0164 ± 0,0076 bcd	0,0841 ± 0,0175 bc	0,1582 ± 0,0124 g	0,2290 ± 0,1567 c	0,6954
55	0,2122 ± 0,0786 e	0,0431 ± 0,0173 cd	0,0240 ± 0,0088 d	0,1211 ± 0,0383 ef	0,1425 ± 0,0305 fg	0,1290 ± 0,0857 bc	0,6719
21C	0,0948 ± 0,0251 ab	0,0288 ± 0,0036 ab	0,0132 ± 0,0029 abc	0,1228 ± 0,0070 ef	0,1165 ± 0,0090 de	0,0302 ± 0,0629 a	0,4063
47B	0,1749 ± 0,0157 de	0,0494 ± 0,0041 d	0,0077 ± 0,0021 a	0,0732 ± 0,0076 b	0,1248 ± 0,0041 ef	0,1153 ± 0,0141 abc	0,5453
47C	0,0816 ± 0,0152 a	0,0326 ± 0,0006 abc	0,0100 ± 0,0041 ab	0,1124 ± 0,0168 de	0,0990 ± 0,0172 bcd	0,0833 ± 0,0569 abc	0,4189
47E	0,1329 ± 0,0118 bc	0,0284 ± 0,0042 ab	0,0179 ± 0,0081 cd	0,0903 ± 0,0109 bc	0,0815 ± 0,0052 ab	0,0697 ± 0,0465 ab	0,4207
47F	0,1014 ± 0,0422 ab	0,0461 ± 0,0077 d	0,0156 ± 0,0047 bc	0,1568 ± 0,0072 g	0,0993 ± 0,0190 cd	0,1080 ± 0,0238 abc	0,5272
48D	0,0855 ± 0,0319 a	0,0384 ± 0,0025 bcd	0,0069 ± 0,0030 a	0,0979 ± 0,0050 cd	0,0867 ± 0,0060 abc	0,0818 ± 0,0036 abc	0,3972
48E	0,1326 ± 0,0332 bc	0,0323 ± 0,0170 abc	0,0138 ± 0,0081 abc	0,0291 ± 0,0021 a	0,0784 ± 0,0092 a	0,0860 ± 0,0131 abc	0,3764
49C	0,1566 ± 0,0185 cd	0,0221 ± 0,0012 a	0,0158 ± 0,0072 bc	0,0956 ± 0,0125 cd	0,0840 ± 0,0092 abc	0,0980 ± 0,0110 abc	0,4721
52	0,0861 ± 0,0233 a	0,0473 ± 0,0051 d	0,0174 ± 0,0097 bcd	0,1400 ± 0,0397 fg	0,1105 ± 0,0252 de	0,0366 ± 0,0503 a	0,4379

Letras distintas indican diferencias significativas. nd: no detectable.

Tabla 10: Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos volátiles de la variedad Cabernet Sauvignon, para cada levadura y familia de ácidos (mg/L).

CABERNET SAUVIGNON							
Levadura	Ác. Butírico	Ác. Decanoico	Ác. 2-etilhexanoico	Ác. Hexanoico	Ác. Isobutírico	Ác. Isopentanoico	ÁCIDOS
T	0,1101 ± 0,0274 bcd	0,0365 ± 0,0246 a	0,0215 ± 0,0164 bc	0,1581 ± 0,0160 a	0,1840 ± 0,0864 cde	0,1309 ± 0,0168 a	0,6411
55	0,1402 ± 0,0265 d	0,0323 ± 0,0150 a	0,0360 ± 0,0116 d	0,0843 ± 0,0599 a	0,2156 ± 0,0325 ef	0,1617 ± 0,0114 a	0,6701
25B	0,1280 ± 0,0258 cd	0,0394 ± 0,0322 a	0,0257 ± 0,0048 c	0,0300 ± 0,0117 a	0,2167 ± 0,0216 ef	1,8617 ± 1,0931 b	2,3015
26D	0,1367 ± 0,0103 cd	0,0404 ± 0,0311 a	0,0415 ± 0,0127 d	0,0207 ± 0,0048 a	0,1333 ± 0,0863 abc	0,1512 ± 0,0146 a	0,5238
30A	0,0713 ± 0,0424 a	0,0624 ± 0,0340 ab	0,0115 ± 0,0052 a	0,6298 ± 0,4222 b	0,0913 ± 0,0109 a	0,1171 ± 0,0511 a	0,9834
52	0,1322 ± 0,0111 cd	0,0623 ± 0,0491 ab	0,0222 ± 0,0018 bc	0,0255 ± 0,0029 a	0,2656 ± 0,0149 f	0,1149 ± 0,0073 a	0,6227
54	0,1325 ± 0,0147 cd	0,1443 ± 0,0557 bc	0,0200 ± 0,0025 abc	0,0246 ± 0,0019 a	0,2193 ± 0,0090 ef	0,1160 ± 0,0326 a	0,6567
58A	0,0828 ± 0,0166 ab	0,2865 ± 0,0739 d	0,0148 ± 0,0032 ab	0,1533 ± 0,0363 a	0,1163 ± 0,0359 ab	0,1443 ± 0,0284 a	0,7980
58C	0,1056 ± 0,0629 bc	0,3036 ± 0,1779 d	0,0110 ± 0,0029 a	0,1146 ± 0,0311 a	0,1540 ± 0,0708 bcd	0,1250 ± 0,0358 a	0,8138
58E	0,0898 ± 0,0105 ab	0,1715 ± 0,0994 c	0,0195 ± 0,0038 abc	0,1515 ± 0,0265 a	0,2136 ± 0,0647 def	0,1428 ± 0,0231 a	0,7887

Letras distintas indican diferencias significativas. nd: no detectable.

#### 4.1.2. Alcoholes

Los alcoholes superiores aportan a los vinos caracteres vegetales y herbáceos considerándose desagradables, por lo que causan efectos negativos cuando se encuentran en concentraciones excesivas superando los 400 mg/L, pudiendo enmascarar los aromas aportados por los ésteres; o cuando superan su umbral de percepción (Zhang *et al.*, 2018), donde cabe destacar que para ninguna de las variedades se ha dado este caso.

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

En la Tabla 11 y la Tabla 13, se recogen los resultados obtenidos para las variedades Merlot y Cabernet Sauvignon, respectivamente. En la primera, la mayor productora de este grupo de compuestos es la cepa 40 y, para la segunda, la 25B. Al mismo tiempo, se puede ver, como sucede con la familia de los ácidos, que la menor productora de alcoholes superiores son las cepas correspondientes a la levadura *S. cerevisiae*, lo que pone de manifiesto que la inoculación secuencial con cepas de levaduras no-*Saccharomyces* contribuye de forma positiva en el perfil aromático de los vinos resultantes. Por el contrario, en el caso de la variedad Garnacha (Tabla 12), los cultivos puros con *S. cerevisiae* consiguen una mayor concentración total de alcoholes superiores (T y 55).

Dentro de los alcoholes, el compuesto volátil más importante es el 2-feniletanol, pues contribuye de forma positiva en el perfil aromático al aportar notas dulces y florales, a rosa y lila. Aunque en ninguno de los casos el umbral de percepción ha sido superado, es importante resaltar cuáles han sido las levaduras que mayor concentración de este compuesto han liberado.

En este sentido, tanto para la variedad Merlot como para la variedad Garnacha, las mayores productoras de 2-feniletanol han sido las cepas correspondientes a la levadura *Hanseniaspora uvarum*. Para Merlot (cepa 40), se ha duplicado (0.2621 mg/L frente a 0.1299 mg/L) la concentración de este compuesto en comparación con los cultivos puros de *S. cerevisiae* y, para Garnacha (cepa 21C), se llega a quintuplicar (0.5032 mg/L frente a 0.1281 y 0.1632 mg/L), obteniendo para ambas diferencias significativas.

En cuanto al Cabernet Sauvignon, los resultados obtenidos no se corresponden con las otras dos variedades, sino que las cepas que presentan diferencias significativas en la producción de 2-feniletanol son la levadura T y 58A (0.0635 y 0.0686 mg/L, respectivamente), aunque a concentraciones muy inferiores a las obtenidas por las otras dos variedades de uva.

Además, estos resultados concuerdan con los mostrados por López *et al.* (2014) en su estudio sobre *H. uvarum* (cepas 40, 25B y 21C), que respalda que esta especie de levadura incrementa el contenido total de alcoholes, especialmente del 2-feniletanol. Lo mismo sucede con los resultados de los estudios de Arslan *et al.* (2018); Azzolini *et al.* (2015) y Velázquez *et al.* (2015), sobre la levadura *T. delbrueckii* (cepa 58A), con alta producción de alcoholes y liberación de 2-feniletanol.

En las siguientes tablas se recogen los datos obtenidos para los alcoholes superiores:

Tabla 11: Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos volátiles de la variedad Merlot, para cada levadura y familia de alcoholes (mg/L).

MERLOT								
Levadura	Alcohol isoamílico	Alcohol bencílico	2,3-butanodiol	1-butanol	2-feniletanol	Cis-3-hexenol	1-propanol	ALCOHOLES
<b>T</b>	0,0686 ± 0,0374 ab	0,0971 ± 0,0604 ab	0,3358 ± 0,0942 abcd	0,1455 ± 0,0124 ab	0,1299 ± 0,0589 a	0,1067 ± 0,0237 a	0,0612 ± 0,0167 ab	0,9448
<b>1G</b>	0,0674 ± 0,0290 ab	nd	0,3651 ± 0,0376 abcd	0,1655 ± 0,0186 abcde	0,1255 ± 0,0073 a	0,1222 ± 0,0049 ab	0,0699 ± 0,0159 abc	0,9156
<b>15C</b>	0,1826 ± 0,0507 efg	0,1830 ± 0,1000 bc	0,3016 ± 0,0613 a	0,1535 ± 0,0322 abc	0,1301 ± 0,0232 a	0,1574 ± 0,0277 abcd	0,1236 ± 0,0207 def	1,2318
<b>15D</b>	0,1655 ± 0,0314 def	0,2261 ± 0,0665 abc	0,3311 ± 0,0688 abcd	0,1712 ± 0,0346 abcde	0,1427 ± 0,0275 ab	0,1410 ± 0,0384 abc	0,1245 ± 0,0236 def	1,3021
<b>15E</b>	0,1388 ± 0,0044 cde	0,0565 ± 0,0034 a	0,3239 ± 0,0114 abc	0,1669 ± 0,0077 abcde	0,1342 ± 0,0086 a	0,1700 ± 0,0069 bcd	0,0979 ± 0,0065 bcd	1,0882
<b>15F</b>	0,2235 ± 0,0246 gh	nd	0,4489 ± 0,0669 bcd	0,2260 ± 0,0409 f	0,2029 ± 0,0218 c	0,2015 ± 0,0692 d	0,1865 ± 0,0253 gh	1,4893
<b>15H</b>	0,0545 ± 0,0280 a	0,1432 ± 0,0847 ab	0,3569 ± 0,1622 abcd	0,1738 ± 0,0351 abcde	0,1889 ± 0,0763 bc	0,1690 ± 0,0557 bcd	0,0493 ± 0,0193 a	1,1356
<b>15I</b>	0,1911 ± 0,0099 efg	0,0913 ± 0,0543 ab	0,3789 ± 0,0364 abcd	0,1984 ± 0,0071 cdef	0,1742 ± 0,0078 abc	0,1972 ± 0,0080 cd	0,1584 ± 0,0062 fg	1,3895
<b>40</b>	0,2503 ± 0,1204 h	0,0912 ± 0,0494 ab	0,6129 ± 0,3213 e	0,2106 ± 0,0871 ef	0,2621 ± 0,1032 d	0,2857 ± 0,1454 e	0,2272 ± 0,1011 h	1,9400
<b>42B</b>	0,1378 ± 0,0605 cde	0,1036 ± 0,0858 ab	0,4582 ± 0,0950 cd	0,2096 ± 0,0449 ef	0,1732 ± 0,0392 abc	0,1301 ± 0,0161 ab	0,1077 ± 0,0385 cde	1,3202
<b>42C</b>	0,1452 ± 0,0507 cdef	0,0987 ± 0,0638 ab	0,3211 ± 0,1363 ab	0,1679 ± 0,0466 abcde	0,1488 ± 0,0483 abc	0,1672 ± 0,0327 bcd	0,1397 ± 0,0318 ef	1,1886
<b>42D</b>	0,1136 ± 0,0216 bcd	0,1495 ± 0,0331 ab	0,3012 ± 0,0323 a	0,1334 ± 0,0151 a	0,1420 ± 0,0116 ab	0,1465 ± 0,0130 abcd	0,0790 ± 0,0139 abc	1,0652
<b>42E</b>	0,1084 ± 0,0531 abcd	0,1429 ± 0,0789 bc	0,4258 ± 0,1342 abcd	0,1828 ± 0,0445 bcdef	0,1490 ± 0,0466 abc	0,1407 ± 0,0356 ab	0,1034 ± 0,0372 cde	1,2530
<b>42F</b>	0,1128 ± 0,0446 bcd	0,1949 ± 0,0862 c	0,4660 ± 0,1045 d	0,2064 ± 0,0456 def	0,1395 ± 0,0679 ab	0,1655 ± 0,0351 bcd	0,1065 ± 0,0286 cde	1,3916
<b>42K</b>	0,0973 ± 0,0493 abc	0,1348 ± 0,1048 abc	0,3281 ± 0,0316 abc	0,1616 ± 0,0115 abcd	0,1226 ± 0,0147 a	0,1245 ± 0,0250 ab	0,0864 ± 0,0245 abcd	1,0553
<b>42L</b>	0,1991 ± 0,0637 fgh	0,0848 ± 0,0630 ab	0,4327 ± 0,1291 abcd	0,2112 ± 0,0661 ef	0,1746 ± 0,0544 abc	0,1598 ± 0,0588 abcd	0,1525 ± 0,0469 fg	1,4146

Letras distintas indican diferencias significativas. nd: no detectable.

Tabla 12: Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos volátiles de la variedad Garnacha, para cada levadura y familia de alcoholes (mg/L).

GARNACHA								
Levadura	Alcohol isoamílico	Alcohol bencílico	2,3-butanodiol	1-butanol	2-feniletanol	Cis-3-hexenol	1-propanol	ALCOHOLES
T	0,1238 ± 0,0510 d	0,0726 ± 0,0297 a	0,4087 ± 0,0421 e	0,1690 ± 0,0153 e	0,1281 ± 0,0194 ab	0,1310 ± 0,0232 e	0,1182 ± 0,0448 d	1,1514
55	0,1606 ± 0,0219 e	0,0444 ± 0,0170 a	0,3590 ± 0,0511 d	0,1849 ± 0,0283 e	0,1633 ± 0,0265 abc	0,1797 ± 0,0263 f	0,1269 ± 0,0178 d	1,2188
21C	0,0858 ± 0,0384 abc	0,0765 ± 0,0053 a	0,2572 ± 0,0156 c	0,1193 ± 0,0068 cd	0,5032 ± 0,0331 d	0,0938 ± 0,0143 abc	0,0749 ± 0,0227 abc	1,2107
47B	0,1084 ± 0,0076 cd	0,2255 ± 0,0558 d	0,2564 ± 0,0253 c	0,1161 ± 0,0108 bcd	0,1008 ± 0,0112 ab	0,1137 ± 0,0091 cde	0,0783 ± 0,0047 bc	0,9992
47C	0,0866 ± 0,0067 abc	0,1557 ± 0,0575 cd	0,2599 ± 0,0528 c	0,1196 ± 0,0134 d	0,2496 ± 0,2320 c	0,1060 ± 0,0126 bcd	0,0831 ± 0,0093 c	1,0605
47E	0,0803 ± 0,0070 ab	0,0806 ± 0,0767 ab	0,1672 ± 0,0060 a	0,0923 ± 0,0058 a	0,1958 ± 0,1803 bc	0,0906 ± 0,0024 ab	0,0639 ± 0,0082 abc	0,7707
47F	0,1016 ± 0,0139 bcd	0,1525 ± 0,0487 bcd	0,2401 ± 0,0113 bc	0,1196 ± 0,0223 d	0,1059 ± 0,0153 ab	0,1189 ± 0,0236 de	0,0779 ± 0,0122 bc	0,9165
48D	0,0761 ± 0,0036 ab	0,0692 ± 0,0806 a	0,1865 ± 0,0356 a	0,0854 ± 0,0076 a	0,0750 ± 0,0078 a	0,0825 ± 0,0046 a	0,0604 ± 0,0053 ab	0,6351
48E	0,0692 ± 0,0339 a	0,0414 ± 0,0148 a	0,2086 ± 0,0389 ab	0,0971 ± 0,0106 ab	0,0790 ± 0,0102 a	0,0826 ± 0,0185 a	0,0563 ± 0,0189 a	0,6342
49C	0,0871 ± 0,0096 abc	0,0489 ± 0,0527 a	0,2051 ± 0,0123 ab	0,1000 ± 0,0094 abc	0,0897 ± 0,0126 a	0,0953 ± 0,0123 abc	0,0644 ± 0,0066 abc	0,6905
52	0,1031 ± 0,0324 bcd	0,0701 ± 0,0564 a	0,2683 ± 0,0617 c	0,1292 ± 0,0315 d	0,1140 ± 0,0330 ab	0,1215 ± 0,0303 de	0,0825 ± 0,0221 c	0,8887

Letras distintas indican diferencias significativas. nd: no detectable.

Tabla 13: Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos volátiles de la variedad Cabernet Sauvignon, para cada levadura y familia de alcoholes (mg/L).

CABERNET SAUVIGNON								
Levadura	Alcohol isoamílico	Alcohol bencílico	2,3-butanodiol	1-butanol	2-feniletanol	Cis-3-hexenol	1-propanol	ALCOHOLES
T	0,0610 ± 0,0224 a	0,1186 ± 0,0376 abc	0,3147 ± 0,0107 a	0,1762 ± 0,0516 bc	0,0635 ± 0,0074 fg	0,1168 ± 0,0062 cd	0,0472 ± 0,0217 a	0,8980
55	0,3019 ± 0,2504 bc	0,2649 ± 0,0994 d	0,4803 ± 0,0639 bc	0,2352 ± 0,0284 de	0,0141 ± 0,0053 ab	0,0236 ± 0,0090 a	nd	1,3200
25B	0,6209 ± 0,1622 e	0,1286 ± 0,0473 abc	0,4590 ± 0,1030 b	0,2081 ± 0,0576 cd	0,0198 ± 0,0154 abc	0,0339 ± 0,0314 a	0,0952 ± 0,0348 bc	1,5655
26D	0,1392 ± 0,0372 ab	0,1485 ± 0,0603 bc	0,4827 ± 0,0631 bc	0,1890 ± 0,0386 bcd	0,0309 ± 0,0251 cd	0,0264 ± 0,0059 a	0,1369 ± 0,0233 d	1,1536
30A	0,6314 ± 0,1690 e	0,0685 ± 0,0491 a	0,2582 ± 0,0421 a	0,1041 ± 0,0160 a	0,0271 ± 0,0079 bcd	0,0879 ± 0,0103 b	0,0533 ± 0,0234 a	1,2305
52	0,3950 ± 0,2985 cd	0,1683 ± 0,0246 c	0,5548 ± 0,1368 c	0,2614 ± 0,0358 e	0,0084 ± 0,0017 a	0,0199 ± 0,0014 a	0,0494 ± 0,0371 a	1,4572
54	0,1305 ± 0,0430 ab	0,1311 ± 0,0398 abc	0,5329 ± 0,0731 bc	0,2070 ± 0,0525 cd	0,0080 ± 0,0011 a	0,0203 ± 0,0006 a	0,0773 ± 0,0464 ab	0,9766
58A	0,5567 ± 0,3570 de	0,0942 ± 0,0236 ab	0,3140 ± 0,0655 a	0,1485 ± 0,0343 ab	0,0686 ± 0,0125 g	0,1236 ± 0,0236 cd	0,0753 ± 0,0108 ab	1,3809
58C	0,0962 ± 0,0339 ab	0,0713 ± 0,0193 a	0,2733 ± 0,0854 a	0,1134 ± 0,0305 a	0,0431 ± 0,0142 de	0,1061 ± 0,0322 bc	0,0747 ± 0,0274 ab	0,7781
58E	0,0524 ± 0,0480 a	0,0936 ± 0,0721 ab	0,3008 ± 0,0479 a	0,2132 ± 0,0681 cde	0,0481 ± 0,0244 ef	0,1357 ± 0,0155 d	0,1218 ± 0,0448 cd	0,9656

Letras distintas indican diferencias significativas. nd: no detectable.

#### 4.1.3. Aldehídos

Los aldehídos dotan a los vinos de perfiles no deseables cuando se encuentran por encima de su umbral de percepción. Como se puede observar en las siguientes tablas, no se supera para ninguno de los compuestos, lo que se considera positivo (Zhang *et al.*, 2018). Así pues, como se viene comentando en apartados anteriores, se ven diferencias entre variedades ya que, para Merlot y Cabernet Sauvignon (Tabla 14 y Tabla 16), las mayores productoras de aldehídos son las levaduras no-*Saccharomyces* correspondientes a las cepas 40 y 26D, respectivamente. Mientras que, para Garnacha, son las levaduras *S. cerevisiae* las que más aldehídos sintetizan.

El compuesto más importante es el acetaldehído, que se considera agradable cuando está a bajas concentraciones, dotando al vino de aromas frutales (Arslan *et al.*, 2018). Por tanto, destacar que la levadura 40 para Merlot, produce 3 veces más este compuesto que el testigo T (0.0863 mg/L frente a 0.0029 mg/L), aportando un aroma a manzana más intenso, correspondiéndose con los resultados obtenidos por Andorrà *et al.* (2010) y Escribano-Viana *et al.* (2018) sobre el aumento de la concentración de acetaldehído gracias a la acción de *H. uvarum*.

Tabla 14: Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos volátiles de la variedad Merlot, para cada levadura y familia de aldehídos (mg/L).

MERLOT			
Levadura	Acetaldehído	Siringaldehído	ALDEHÍDOS
T	0,0029 ± 0,0012 a	0,0034 ± 0,0005 abc	0,0034
1G	0,0399 ± 0,0212 bcd	0,0037 ± 0,0009 abc	0,0436
15C	0,0216 ± 0,0050 abc	0,0035 ± 0,0005 abc	0,0251
15D	0,0199 ± 0,0073 ab	0,0028 ± 0,0006 ab	0,0227
15E	0,0635 ± 0,0040 def	0,0024 ± 0,0004 a	0,0659
15F	0,0593 ± 0,0175 def	0,0048 ± 0,0016 cd	0,0641
15H	0,0755 ± 0,0318 ef	0,0032 ± 0,0011 abc	0,0787
15I	0,0360 ± 0,0148 bcd	0,0033 ± 0,0014 abc	0,0393
40	0,0863 ± 0,0648 f	0,0059 ± 0,0010 de	0,0922
42B	0,0497 ± 0,0270 cde	0,0037 ± 0,0023 abc	0,0534
42C	0,0381 ± 0,0267 bcd	0,0039 ± 0,0011 abc	0,0420
42D	0,0206 ± 0,0058 ab	0,0044 ± 0,0010 bcd	0,0250
42E	0,0428 ± 0,0400 bcd	0,0028 ± 0,0015 a	0,0455
42F	0,0409 ± 0,0110 bcd	0,0060 ± 0,0007 de	0,0469
42K	0,0257 ± 0,0028 abc	0,0024 ± 0,0005 a	0,0281
42L	0,0390 ± 0,0111 bcd	0,0071 ± 0,0037 e	0,0461

Letras distintas indican diferencias significativas. nd: no detectable.

Tabla 15: Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos volátiles de la variedad Garnacha, para cada levadura y familia de aldehídos (mg/L).

GARNACHA					
Levadura	Acetaldehído	Benzaldehído	Dietil acetal	Siringaldehído	ALDEHÍDOS
T	0,0515 ± 0,0224 abc	0,2600 ± 0,0268 d	0,5472 ± 0,0601 b	0,0031 ± 0,0011 bcd	0,8618
55	0,0953 ± 0,0715 cd	0,3631 ± 0,0597 e	0,5468 ± 0,0487 b	0,0024 ± 0,0003 ab	1,0076
21C	0,0514 ± 0,0317 e	0,4214 ± 0,0467 f	nd	0,0025 ± 0,0008 abc	0,4753
47B	0,0480 ± 0,0160 abc	nd	nd	0,0036 ± 0,0010 d	0,0516
47C	0,0813 ± 0,0058 bcd	nd	nd	0,0026 ± 0,0005 abcd	0,0839
47E	0,0368 ± 0,0283 ab	nd	nd	0,0018 ± 0,0009 a	0,0386
47F	0,0637 ± 0,0081 abc	nd	nd	0,0035 ± 0,0011 cd	0,0672
48D	0,0217 ± 0,0079 a	0,1446 ± 0,0216 b	nd	0,0022 ± 0,0005 ab	0,1685
48E	0,0651 ± 0,0469 abc	0,1609 ± 0,0222 bc	nd	0,0023 ± 0,0010 ab	0,2283
49C	0,0591 ± 0,0102 abc	0,1499 ± 0,0122 bc	nd	0,0023 ± 0,0004 ab	0,2113
52	0,1250 ± 0,0327 d	0,1875 ± 0,0696 c	nd	0,0029 ± 0,0012 bcd	0,3154

Letras distintas indican diferencias significativas. nd: no detectable.

Tabla 16: Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos volátiles de la variedad Cabernet Sauvignon, para cada levadura y familia de aldehídos (mg/L).

CABERNET SAUVIGNON					
Levadura	Acetaldehído	Benzaldehído	Dietil acetal	Siringaldehído	ALDEHÍDOS
T	0,0625 ± 0,0120 ab	0,0650 ± 0,0200 b	0,0738 ± 0,0138 ab	0,0046 ± 0,0025 abc	0,2059
55	0,3562 ± 0,1587 d	0,2375 ± 0,0944 b	0,1837 ± 0,0526 b	nd	0,7774
25B	0,1684 ± 0,1092 abcd	0,1151 ± 0,0300 ab	0,1718 ± 0,1761 b	0,0039 ± 0,0025 ab	0,4592
26D	0,1121 ± 0,0212 abc	0,1389 ± 0,0475 b	0,8553 ± 0,1959 e	0,0022 ± 0,0013 ab	1,1085
30A	0,0623 ± 0,0263 a	nd	nd	0,0048 ± 0,0045 bc	0,0671
52	0,2084 ± 0,1027 bcd	0,0999 ± 0,0474 ab	0,0290 ± 0,0043 a	0,0047 ± 0,0018 abc	0,3420
54	0,1031 ± 0,0309 abc	0,1484 ± 0,0265 b	0,1423 ± 0,0135 ab	0,0032 ± 0,0007 ab	0,3970
58A	0,1166 ± 0,0501 abc	nd	0,6609 ± 0,1495 d	0,0071 ± 0,0032 c	0,7846
58C	0,1258 ± 0,0500 abc	0,2667 ± 0,0689 c	0,4961 ± 0,1523 c	0,0029 ± 0,0018 ab	0,8915
58E	0,2408 ± 0,2866 cd	0,1550 ± 0,0677 b	0,0673 ± 0,0383 ab	0,0019 ± 0,0017 a	0,4650

Letras distintas indican diferencias significativas. nd: no detectable.

#### 4.1.4. Ésteres

Los ésteres son el grupo de compuestos volátiles más importante porque contribuye de forma positiva y significativa en el aroma frutal y floral de los vinos (Englezos *et al.*, 2018; Luan *et al.*, 2018). En este caso, la cepa con más capacidad para sintetizar estos compuestos es la 40 para Merlot (Tabla 17) y, la 58C, para Cabernet Sauvignon (Tabla 19), llegando a duplicar los valores obtenidos por las levaduras T y 55. Por otro lado, como se viene observando a lo largo del estudio, para la variedad Garnacha, las cepas más productoras de ésteres son los cultivos puros de *S. cerevisiae* (T y 55), aunque no existe una gran diferencia significativa con respecto a los cultivos mixtos (Tabla 18).

En cuanto a los umbrales de percepción olfativa, éstos han sido superados por cinco compuestos volátiles: acetato de isoamilo, butirato de etilo, decanoato de etilo, 2-feniletacetato y octanoato de etilo.

En primer lugar, para Merlot, todas las cepas sobrepasan el umbral del acetato de isoamilo y del octanoato de etilo, dotando al vino de notas a plátano, pera y piña. La cepa mayor sintetizadora y con resultados más significativos de estos compuestos ha sido la 40. Mientras que, únicamente las levaduras 40 y 42F, han conseguido la mayor concentración de 2-feniletacetato, con aromas a rosa y miel, produciendo dos veces más que las cepas de *S. cerevisiae*. En segundo lugar, el esquema cambia de nuevo para la variedad Garnacha, siendo los cultivos puros los mayores productores de acetato de isoamilo y octanoato de etilo; donde cabe resaltar que en ningún caso se llega a superar el umbral de percepción para el 2-feniletacetato.

Por último, para Cabernet Sauvignon, se consiguen los resultados más significativos y positivos para las levaduras no-*Saccharomyces*. Aunque a nivel general la cepa 58C es la mayor productora de ésteres totales, se puede observar que: el acetato de isoamilo se percibe para todas las cepas, destacando las levaduras 52 y 54; el butirato de etilo supera su umbral para la mayoría, predominando 58C; el decanoato de etilo sólo las cepas 26D, 58E y 52 son significativas; la cepa 26D libera más 2-feniletacetato; y, el octanoato de etilo es mayor para la levadura 52.

Tabla 17: Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos volátiles de la variedad Merlot, para cada levadura y familia de ésteres (mg/L).

MERLOT									
Levadura	Acetato de hexilo	Acetato de isoamilo	Acetato de metilo	Decanoato de etilo	Dietil glutarato	2-feniletacetato	Lactato de etilo	Octanoato de etilo	ÉSTERES
T	0,0129 ± 0,0011 a	0,1023 ± 0,0149 a	0,0867 ± 0,0164 ab	0,0875 ± 0,0022 e	0,1084 ± 0,0683 cd	0,1278 ± 0,0122 a	0,0041 ± 0,0017 a	0,1610 ± 0,0157 a	0,6907
1G	0,0090 ± 0,0019 a	0,1091 ± 0,0103 ab	0,0915 ± 0,0160 abc	0,0822 ± 0,0029 cd	0,1285 ± 0,0271 d	0,1406 ± 0,0136 a	0,0042 ± 0,0007 a	0,1922 ± 0,0146 abc	0,7572
15C	0,0078 ± 0,0016 a	0,1506 ± 0,0277 abcd	0,0955 ± 0,0184 abcd	nd	0,0300 ± 0,0053 ab	0,1323 ± 0,0259 a	0,0046 ± 0,0018 a	0,2001 ± 0,0377 abc	0,6209
15D	0,0077 ± 0,0016 a	0,1508 ± 0,0292 abcd	0,1160 ± 0,0305 cdefg	0,0811 ± 0,0032 d	0,0494 ± 0,0360 ab	0,1487 ± 0,0289 ab	0,0041 ± 0,0009 a	0,2261 ± 0,0427 abcd	0,7839
15E	0,0139 ± 0,0009 a	0,1285 ± 0,0059 abc	0,1045 ± 0,0056 bcdef	nd	0,0301 ± 0,0160 a	0,1508 ± 0,0041 ab	0,0041 ± 0,0002 a	0,2295 ± 0,0154 abcd	0,6613
15F	0,0093 ± 0,0029 a	0,2330 ± 0,0309 e	0,1452 ± 0,0269 h	0,1045 ± 0,0134 g	0,0561 ± 0,0280 abc	0,2199 ± 0,0620 bc	0,0053 ± 0,0011 a	0,2955 ± 0,0351 d	1,0688
15H	0,0135 ± 0,0033 a	0,1460 ± 0,0442 abc	0,1215 ± 0,0077 defgh	0,0987 ± 0,0063 f	0,0625 ± 0,0099 abc	0,1851 ± 0,0335 ab	0,0052 ± 0,0007 a	0,1949 ± 0,0555 abc	0,8274
15I	0,0098 ± 0,0011 a	0,1987 ± 0,0059 de	0,1198 ± 0,0054 b cdefgh	0,0777 ± 0,0021 cd	0,0625 ± 0,0559 abc	0,1862 ± 0,0286 ab	0,0048 ± 0,0002 a	0,2593 ± 0,0091 cd	0,9188
40	0,0264 ± 0,0197 bc	0,2859 ± 0,1352 f	0,1789 ± 0,0402 i	nd	0,0634 ± 0,0516 abcd	0,2656 ± 0,1028 c	0,0227 ± 0,0277 b	0,3776 ± 0,1974 e	1,2205
42B	0,0177 ± 0,0069 ab	0,1496 ± 0,0403 abcd	0,1129 ± 0,0308 bcdefg	0,0954 ± 0,0031 f	0,0476 ± 0,0303 abc	0,1573 ± 0,0156 ab	0,0064 ± 0,0021 a	0,2596 ± 0,0562 cd	0,8467
42C	0,0112 ± 0,0022 a	0,1428 ± 0,0335 abc	0,1273 ± 0,0350 fgh	0,1000 ± 0,0025 fg	0,0777 ± 0,0566 bcd	0,1714 ± 0,0171 ab	0,0041 ± 0,0013 a	0,2165 ± 0,0683 abc	0,8511
42D	0,0302 ± 0,0175 c	0,1009 ± 0,0159 a	0,0702 ± 0,0102 a	0,0775 ± 0,0023 cd	0,0842 ± 0,0620 abc	0,1261 ± 0,0093 a	0,0030 ± 0,0007 a	0,1831 ± 0,0153 ab	0,6753
42E	0,0119 ± 0,0084 a	0,1449 ± 0,0363 abc	0,1353 ± 0,0327 gh	nd	0,0744 ± 0,0524 abcd	0,1528 ± 0,0377 ab	0,0039 ± 0,0006 a	0,2099 ± 0,0397 abc	0,7331
42F	0,0286 ± 0,0201 c	0,1539 ± 0,0328 bcd	0,1263 ± 0,0278 efgh	0,0750 ± 0,0106 c	0,0809 ± 0,0444 cd	0,2775 ± 0,2207 c	0,0047 ± 0,0015 a	0,2444 ± 0,0524 bcd	0,9914
42K	0,0078 ± 0,0011 a	0,1206 ± 0,0173 abc	0,0982 ± 0,0107 abcde	0,0671 ± 0,0023 b	0,0611 ± 0,0329 abc	0,1346 ± 0,0098 a	0,0040 ± 0,0002 a	0,1837 ± 0,0182 ab	0,6770
42L	0,0152 ± 0,0060 a	0,1705 ± 0,0521 cd	0,1295 ± 0,0397 fgh	nd	0,0517 ± 0,0289 abc	0,1853 ± 0,0605 ab	0,0052 ± 0,0017 a	0,2641 ± 0,0824 cd	0,8213

Letras distintas indican diferencias significativas. nd: no detectable.

Tabla 18: Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos volátiles de la variedad Garnacha, para cada levadura y familia de ésteres (mg/L).

GARNACHA									
Levadura	Acetato de hexilo	Acetato de isoamilo	Acetato de metilo	Decanoato de etilo	Dietil glutarato	2-feniletacetato	Lactato de etilo	Octanoato de etilo	ÉSTERES
T	0,0133 ± 0,0019 bcd	0,1136 ± 0,0276 e	0,0746 ± 0,0320 bcd	0,0765 ± 0,0097 d	0,0821 ± 0,0495 abcd	0,1505 ± 0,0102 d	0,0058 ± 0,0030 c	0,1986 ± 0,0232 d	0,7149
55	0,0147 ± 0,0030 cde	0,1643 ± 0,0236 d	0,0974 ± 0,0146 e	0,0815 ± 0,0072 d	0,0030 ± 0,0008 a	0,1820 ± 0,0296 e	0,0043 ± 0,0009 b	0,2324 ± 0,0357 e	0,7795
21C	0,0164 ± 0,0023 e	0,1007 ± 0,0171 bcd	0,0657 ± 0,0075 abc	0,0720 ± 0,0361 cd	0,0673 ± 0,0436 abc	0,1339 ± 0,0243 d	0,0022 ± 0,0007 a	0,1486 ± 0,0142 bc	0,6067
47B	0,0151 ± 0,0013 de	0,0973 ± 0,0051 bcd	0,0726 ± 0,0047 bcd	0,0726 ± 0,0079 d	0,1683 ± 0,0108 d	0,1344 ± 0,0105 d	0,0032 ± 0,0006 ab	0,1513 ± 0,0149 c	0,7148
47C	0,0148 ± 0,0025 de	0,1088 ± 0,0124 cd	0,0869 ± 0,0041 de	0,0981 ± 0,0059 e	0,0995 ± 0,0367 bcd	0,1006 ± 0,0131 bc	0,0032 ± 0,0006 ab	0,1440 ± 0,0182 bc	0,6559
47E	0,0128 ± 0,0007 bc	0,0804 ± 0,0107 ab	0,0486 ± 0,0140 a	0,0443 ± 0,0070 ab	0,1151 ± 0,0597 cd	0,0941 ± 0,0054 abc	0,0027 ± 0,0002 a	0,1163 ± 0,0058 a	0,5142
47F	0,0087 ± 0,0012 a	0,0908 ± 0,0171 abc	0,0764 ± 0,0160 cd	0,0515 ± 0,0029 b	0,0828 ± 0,0597 abcd	0,1092 ± 0,0060 c	0,0030 ± 0,0010 a	0,1507 ± 0,0279 bc	0,5730
48D	0,0125 ± 0,0004 b	0,0754 ± 0,0082 a	0,0506 ± 0,0082 a	0,0367 ± 0,0012 a	0,1035 ± 0,0981 cd	0,0787 ± 0,0077 a	0,0026 ± 0,0004 a	0,1078 ± 0,0066 a	0,4676
48E	0,0122 ± 0,0004 b	0,0749 ± 0,0162 a	0,0629 ± 0,0117 abc	0,0447 ± 0,0034 ab	0,0159 ± 0,0187 a	0,0846 ± 0,0040 ab	0,0027 ± 0,0005 a	0,1158 ± 0,0150 a	0,4137
49C	0,0122 ± 0,0007 b	0,0825 ± 0,0092 ab	0,0569 ± 0,0081 ab	0,0483 ± 0,0033 ab	0,0300 ± 0,0619 ab	0,1023 ± 0,0214 bc	0,0028 ± 0,0005 a	0,1267 ± 0,0145 ab	0,4617
52	0,0120 ± 0,0008 b	0,1079 ± 0,0276 cd	0,0773 ± 0,0183 cd	0,0582 ± 0,0033 bc	0,0439 ± 0,0650 abc	0,1084 ± 0,0258 c	0,0034 ± 0,0005 ab	0,1617 ± 0,0396 c	0,5728

Letras distintas indican diferencias significativas. nd: no detectable.

Tabla 19: Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos volátiles de la variedad Cabernet Sauvignon, para cada levadura y familia de ésteres (mg/L).

CABERNET SAUVIGNON										
Levadura	Acetato de hexilo	Acetato de isoamilo	Acetato de metilo	Butirato de etilo	Decanoato de etilo	Dietil glutarato	2-feniletacetato	Lactato de etilo	Octanoato de etilo	ÉSTERES
T	0,0192 ± 0,0073 ab	0,4484 ± 0,2905 bc	0,0961 ± 0,0190 ab	0,0272 ± 0,0217 a	0,0742 ± 0,0053 a	0,7003 ± 0,6384 bc	0,1076 ± 0,0256 ab	0,0554 ± 0,0172 a	0,1719 ± 0,0125 abc	1,9966
55	0,0114 ± 0,0103 a	0,1505 ± 0,0156 a	0,0844 ± 0,0496 a	0,0464 ± 0,0051 a	0,0707 ± 0,0067 a	0,0683 ± 0,0614 a	0,1742 ± 0,0523 c	0,3444 ± 0,3749 b	0,2577 ± 0,0123 d	1,2080
25B	0,0184 ± 0,0102 ab	0,4765 ± 0,2032 bc	0,2108 ± 0,2037 c	0,0324 ± 0,0132 a	0,0607 ± 0,0128 a	0,0236 ± 0,0089 a	0,1325 ± 0,0305 b	0,0535 ± 0,0148 a	0,1984 ± 0,0733 c	1,2068
26D	0,0295 ± 0,0369 b	0,3771 ± 0,1888 b	0,0985 ± 0,0167 ab	0,0150 ± 0,0005 a	0,6671 ± 0,1192 b	0,3898 ± 0,7375 ab	0,1965 ± 0,0409 c	0,0555 ± 0,0194 a	0,2495 ± 0,0564 d	2,0785
30A	0,0169 ± 0,0104 ab	0,1632 ± 0,1991 a	0,0791 ± 0,0365 a	0,0153 ± 0,0036 a	0,0720 ± 0,0132 a	0,6457 ± 0,4861 bc	0,0935 ± 0,0205 a	0,0365 ± 0,0172 a	0,1211 ± 0,0125 a	1,2433
52	0,0126 ± 0,0097 a	0,6003 ± 0,1348 c	0,1767 ± 0,0294 bc	0,0453 ± 0,0254 a	0,6928 ± 0,0920 b	0,0190 ± 0,0043 a	0,1780 ± 0,0422 c	0,0758 ± 0,0199 a	0,2895 ± 0,0382 d	2,0900
54	0,0095 ± 0,0009 a	0,5979 ± 0,1378 c	0,1229 ± 0,0319 ab	0,0142 ± 0,0022 a	0,0590 ± 0,0022 a	0,0195 ± 0,0027 a	0,1863 ± 0,0160 c	0,0665 ± 0,0034 a	0,2503 ± 0,0653 d	1,3261
58A	0,0043 ± 0,0009 a	0,1103 ± 0,0185 a	0,0889 ± 0,0258 a	0,0138 ± 0,0035 a	0,0966 ± 0,0232 a	1,2796 ± 0,2588 d	0,1172 ± 0,0209 ab	0,0401 ± 0,0073 a	0,1788 ± 0,0375 bc	1,9296
58C	0,0090 ± 0,0074 a	0,0960 ± 0,0325 a	0,0666 ± 0,0163 a	0,6037 ± 0,9051 b	0,0962 ± 0,0478 a	1,1596 ± 0,3544 cd	0,1112 ± 0,0349 ab	0,0233 ± 0,0036 a	0,1397 ± 0,0406 ab	2,3053
58E	0,0046 ± 0,0010 a	0,2877 ± 0,2406 ab	0,1130 ± 0,0511 ab	0,0464 ± 0,0279 a	0,8318 ± 1,0179 b	0,5231 ± 0,7748 ab	0,1267 ± 0,0202 ab	0,0884 ± 0,0597 a	0,1921 ± 0,0326 c	2,2138

Letras distintas indican diferencias significativas. nd: no detectable.

#### 4.1.5. Lactonas

Las lactonas confieren al vino aromas a frutas de hueso. Las no-*Saccharomyces* son las mayores productoras de estos compuestos en las variedades Merlot y Cabernet Sauvignon, cepas 40 y 25B (Tabla 20 y Tabla 22); y, la *S. cerevisiae*, para la Garnacha, cepa T (Tabla 21).

Asimismo, se pone de manifiesto que para la mayoría de variedades y levaduras se supera el umbral de percepción de la  $\gamma$ -butirolactona, proporcionando aromas dulces característicos a coco, ciruela y caramelo. Las cepas con mayor capacidad para sintetizar este compuesto son las correspondientes a la 15H y la 25B, para Merlot y Cabernet Sauvignon, respectivamente. Mientras que, para Garnacha, las de cultivos puros (T y 55). Por último, únicamente para Garnacha, se consigue potenciar el aroma a melocotón, ya que la gran mayoría de sus cepas supera el umbral de percepción de la decalactona, predominando la cepa 48E. Estos resultados entorno a *H. uvarum* (cepas 40, 25B, 15H y 48E) se corresponden a los obtenidos por Jara *et al.* (2016), pues con esta especie de levadura se obtienen vinos con aromas a frutos de hueso.

Tabla 20: Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos volátiles de la variedad Merlot, para cada levadura y familia de lactonas (mg/L).

MERLOT				
Levadura	$\gamma$ -butirolactona	Decalactona	Pantolactona	LACTONAS
T	0,1151 $\pm$ 0,0310 abc	0,0279 $\pm$ 0,0035 j	0,0280 $\pm$ 0,0109 bcde	0,1710
1G	0,1065 $\pm$ 0,0125 ab	0,0082 $\pm$ 0,0021 de	0,0251 $\pm$ 0,0009 bcd	0,1397
15E	0,1113 $\pm$ 0,0074 abc	0,0244 $\pm$ 0,0030 i	0,0283 $\pm$ 0,0031 bcde	0,1640
15C	0,0971 $\pm$ 0,0198 a	nd	0,0281 $\pm$ 0,0056 bcde	0,1253
15E	0,1113 $\pm$ 0,0074 abc	0,0244 $\pm$ 0,0030 i	0,0283 $\pm$ 0,0031 bcde	0,1640
15F	0,1413 $\pm$ 0,0196 bcd	0,0030 $\pm$ 0,0020 b	0,0055 $\pm$ 0,0008 a	0,1498
15H	0,1580 $\pm$ 0,0433 de	0,0065 $\pm$ 0,0012 cd	0,0228 $\pm$ 0,0086 b	0,1933
15I	0,1229 $\pm$ 0,0074 abcd	0,0165 $\pm$ 0,0028 g	0,0362 $\pm$ 0,0022 ef	0,1756
40	0,1892 $\pm$ 0,0534 e	0,0042 $\pm$ 0,0014 bc	0,0317 $\pm$ 0,0212 bcdef	0,2251
42B	0,1479 $\pm$ 0,0524 cd	0,0030 $\pm$ 0,0009 b	0,0252 $\pm$ 0,0033 bcd	0,1761
42C	0,1062 $\pm$ 0,0462 ab	0,0101 $\pm$ 0,0035 e	0,0308 $\pm$ 0,0099 bcdef	0,1471
42D	0,1089 $\pm$ 0,0406 ab	0,0041 $\pm$ 0,0022 bc	0,0242 $\pm$ 0,0010 bc	0,1372
42E	0,1194 $\pm$ 0,0350 abc	0,0188 $\pm$ 0,0035 gh	0,0311 $\pm$ 0,0007 bcdef	0,1692
42F	0,1475 $\pm$ 0,0294 cd	0,0133 $\pm$ 0,0045 f	0,0339 $\pm$ 0,0066 def	0,1946
42K	0,1047 $\pm$ 0,0087 ab	0,0048 $\pm$ 0,0020 bc	0,0247 $\pm$ 0,0049 bcd	0,1342
42L	0,1351 $\pm$ 0,0427 bcd	0,0196 $\pm$ 0,0020 h	0,0391 $\pm$ 0,0122 f	0,1938

Letras distintas indican diferencias significativas. nd: no detectable.

Tabla 21: Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos volátiles de la variedad Garnacha, para cada levadura y familia de lactonas (mg/L).

GARNACHA				
Levadura	$\gamma$ -butirolactona	Decalactona	Pantolactona	LACTONAS
T	0,1469 $\pm$ 0,0320 e	0,1887 $\pm$ 0,0525 de	0,0231 $\pm$ 0,0048 c	0,3587
55	0,1232 $\pm$ 0,0181 d	0,1236 $\pm$ 0,0221 bcd	0,0348 $\pm$ 0,0055 d	0,2817
21C	0,0787 $\pm$ 0,0043 bc	0,1486 $\pm$ 0,0356 cd	0,0211 $\pm$ 0,0030 c	0,2485
47B	0,0755 $\pm$ 0,0022 abc	nd	0,0213 $\pm$ 0,0014 c	0,0968
47C	0,0780 $\pm$ 0,0147 abc	0,2324 $\pm$ 0,0656 e	0,0208 $\pm$ 0,0026 c	0,3312
47E	0,0682 $\pm$ 0,0172 abc	0,0732 $\pm$ 0,0382 b	nd	0,1414
47F	0,0761 $\pm$ 0,0142 abc	0,1275 $\pm$ 0,0173 bcd	0,0216 $\pm$ 0,0039 c	0,2251
48D	0,0635 $\pm$ 0,0078 ab	nd	0,0159 $\pm$ 0,0013 b	0,0794
48E	0,0655 $\pm$ 0,0065 abc	0,2445 $\pm$ 0,1751 e	0,0165 $\pm$ 0,0028 b	0,3266
49C	0,0610 $\pm$ 0,0020 a	0,1001 $\pm$ 0,0226 bc	0,0192 $\pm$ 0,0021 bc	0,1803
52	0,0815 $\pm$ 0,0183 c	0,0834 $\pm$ 0,0320 bc	0,0232 $\pm$ 0,0067 c	0,1881

Letras distintas indican diferencias significativas. nd: no detectable.

Tabla 22: Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos volátiles de la variedad Cabernet Sauvignon, para cada levadura y familia de lactonas (mg/L).

CABERNET SAUVIGNON				
Levadura	$\gamma$ -butirolactona	Decalactona	Pantolactona	LACTONAS
T	0,0482 $\pm$ 0,0394 bc	0,0403 $\pm$ 0,0320 c	0,0257 $\pm$ 0,0026 ab	0,1142
55	0,0151 $\pm$ 0,0018 a	0,0440 $\pm$ 0,0295 c	0,0431 $\pm$ 0,0133 d	0,1022
25B	0,1338 $\pm$ 0,0087 e	0,0346 $\pm$ 0,0200 bc	0,0448 $\pm$ 0,0062 d	0,2132
26D	0,0171 $\pm$ 0,0025 a	0,0156 $\pm$ 0,0055 ab	0,0410 $\pm$ 0,0027 cd	0,0737
30A	0,0622 $\pm$ 0,0105 cd	0,0179 $\pm$ 0,0125 ab	0,0178 $\pm$ 0,0016 a	0,0979
52	0,0206 $\pm$ 0,0029 a	0,0136 $\pm$ 0,0037 a	0,0430 $\pm$ 0,0045 d	0,0772
54	0,0221 $\pm$ 0,0190 ab	0,0189 $\pm$ 0,0073 ab	0,0395 $\pm$ 0,0043 cd	0,0805
58A	0,0953 $\pm$ 0,0210 d	0,0109 $\pm$ 0,0020 a	0,0266 $\pm$ 0,0054 ab	0,1328
58C	0,0770 $\pm$ 0,0235 cd	0,0153 $\pm$ 0,0084 ab	0,0222 $\pm$ 0,0060 a	0,1145
58E	0,0764 $\pm$ 0,0474 cd	0,0250 $\pm$ 0,0134 abc	0,0330 $\pm$ 0,0159 bc	0,1344

Letras distintas indican diferencias significativas. nd: no detectable.

## 4.2. Análisis de los Componentes Principales

Los resultados obtenidos de los perfiles aromáticos para cada variedad fueron analizados mediante Análisis de Componentes Principales (PCA) para explicar la variabilidad de los datos, en aras de buscar relaciones existentes entre los compuestos volátiles y las cepas de levaduras.

Las siguientes figuras muestran los gráficos del PCA obtenidos para la variedad Merlot. En el gráfico de puntuaciones (Figura 2) se ve una clara diferenciación de los vinos a partir de la PC1, ya que la cepa 40 (*H. uvarum*) se sitúa en el extremo del eje derecho, mientras que la mayoría de levaduras se distribuyen a la izquierda del plano, donde la más alejada es la *S. cerevisiae* (T). En el gráfico de cargas (Figura 3) se aprecia que la levadura 40 presenta el mayor contenido en ésteres y alcoholes, como el 2-feniletacetato y el 2-feniletanol, incrementando en el vino el aroma frutal y floral. También cabe resaltar que en el PC2 se ve una distinción entre *H. uvarum* y el resto de las levaduras no-*Saccharomyces*, al situarse en la parte inferior del plano.

En cuanto a la variedad Garnacha, en la Figura 4, el PC1 permite diferenciar claramente las levaduras *S. cerevisiae* (T y 55), que se sitúan a la derecha del plano; mientras que la PC2 separa a *H. uvarum* en la parte superior del plano. En el gráfico de cargas (Figura 5), se observa que las cepas T y 55 se relacionan con la mayor formación de ésteres, alcoholes y lactonas, potenciando el perfil aromático de los vinos resultantes.

Por último, para Cabernet Sauvignon, se pueden hacer 3 distinciones, en función de la distribución en los planos entre PC1 y PC2 (Figura 6 y Figura 7). La cepa 55 (*S. cerevisiae*) se sitúa en la parte derecha de la PC1 e inferior de la PC2 destacando por su síntesis en aldehídos; las cepas 25B, 52 (*H. uvarum*), 54 (*S. bacillaris*) y 26 (*T. delbruekii*) se encuentran también la parte derecha del plano para la PC1, pero en la superior para PC2, con formación de ésteres y alcoholes; mientras que, las cepas 30A, 58A, 58C, 58E y T se distribuyen en el eje izquierdo del plano para la PC1, liberando la mayor concentración de alcoholes y ácidos.

De este modo, estos resultados confirman los datos previos, ya que para las fermentaciones secuenciales en las variedades Merlot y Cabernet Sauvignon se producen más compuestos aromáticos en comparación con los cultivos puros. En cambio, para Garnacha, *S. cerevisiae* da un perfil más deseable que con los cultivos mixtos con levaduras no-*Saccharomyces*.

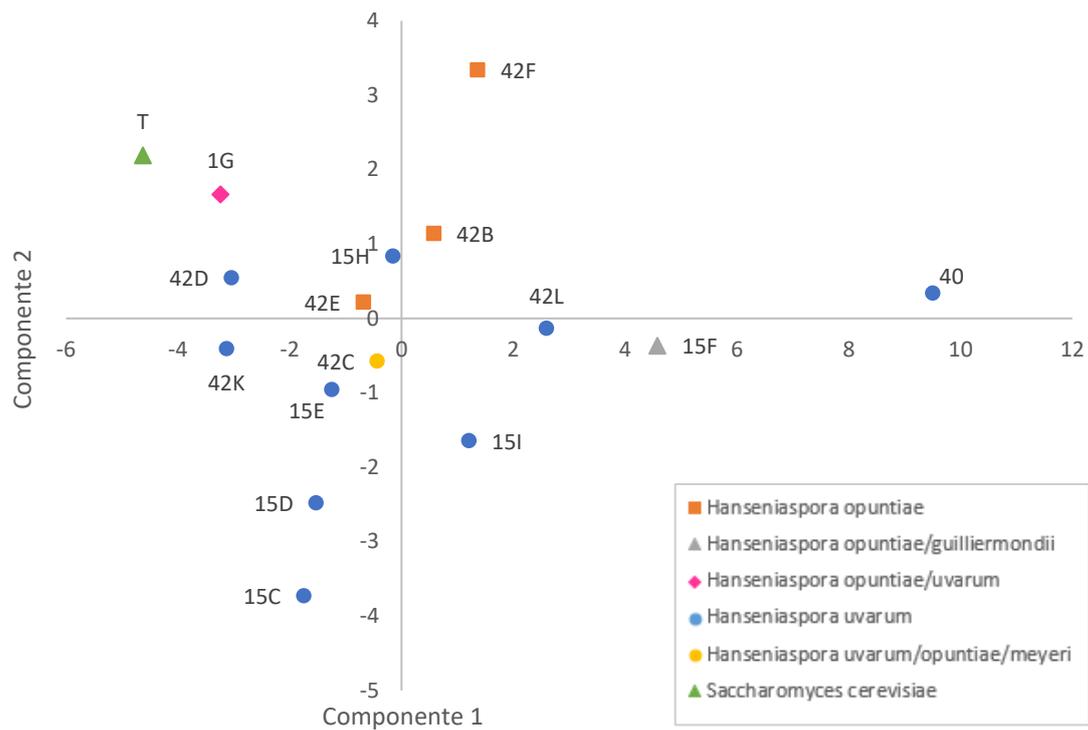


Figura 2: Gráfico de puntuaciones para las cepas de levaduras en la variedad Merlot.

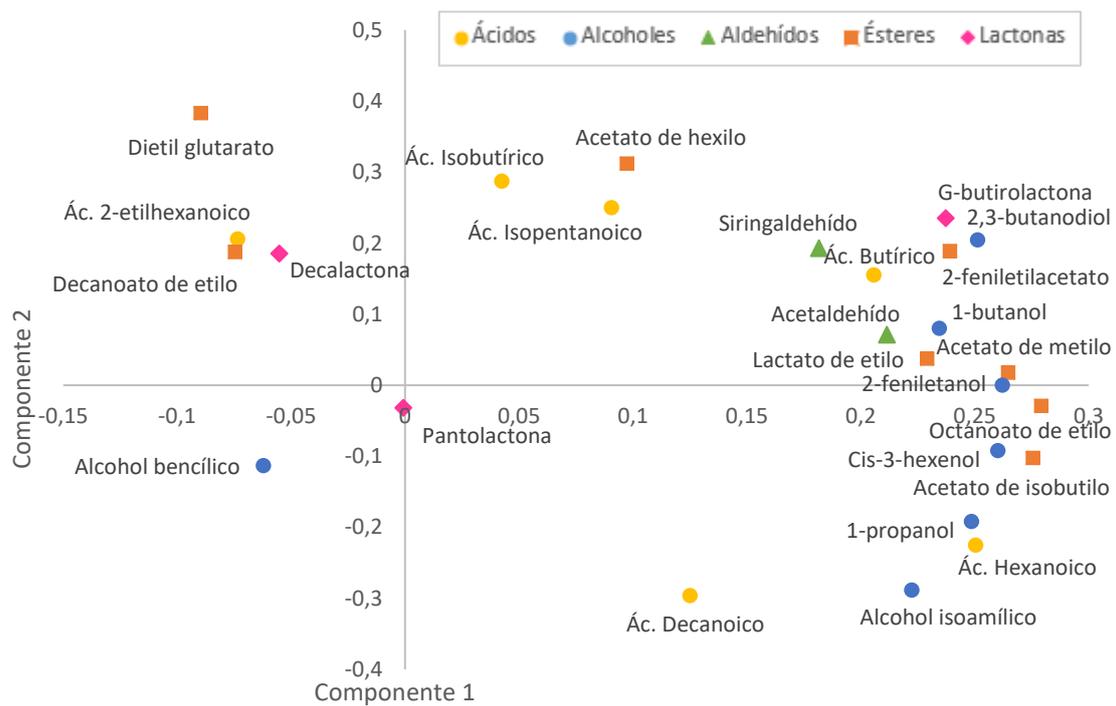


Figura 3: Gráfico de cargas para los compuestos volátiles en la variedad Merlot.

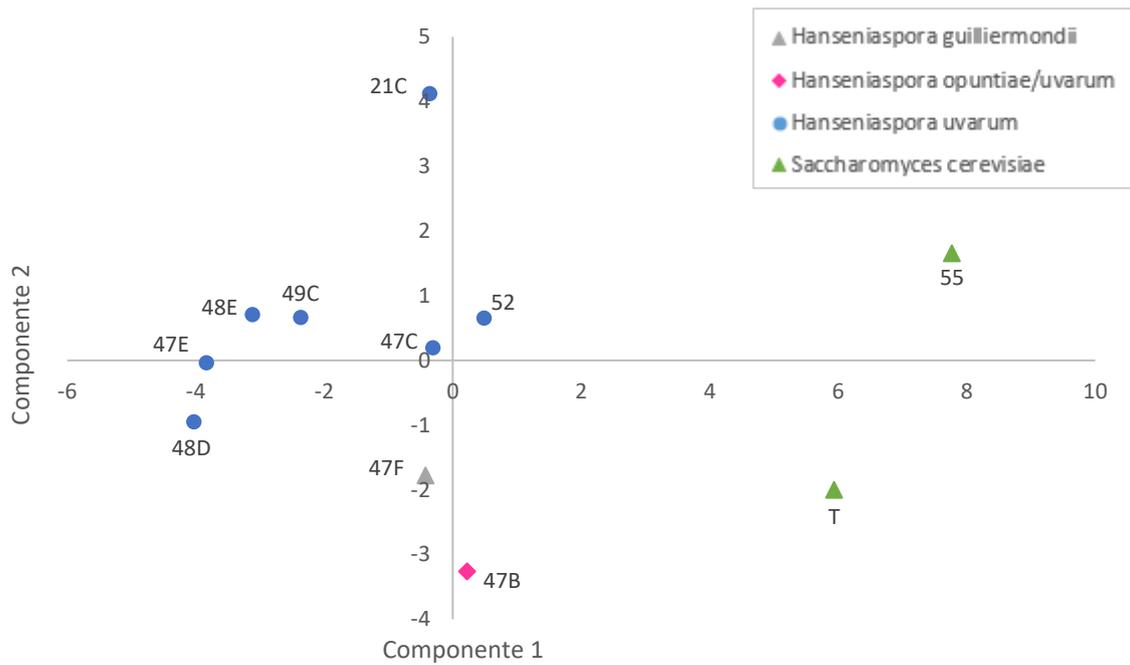


Figura 4: Gráfico de puntuaciones para las cepas de levaduras en la variedad Garnacha.

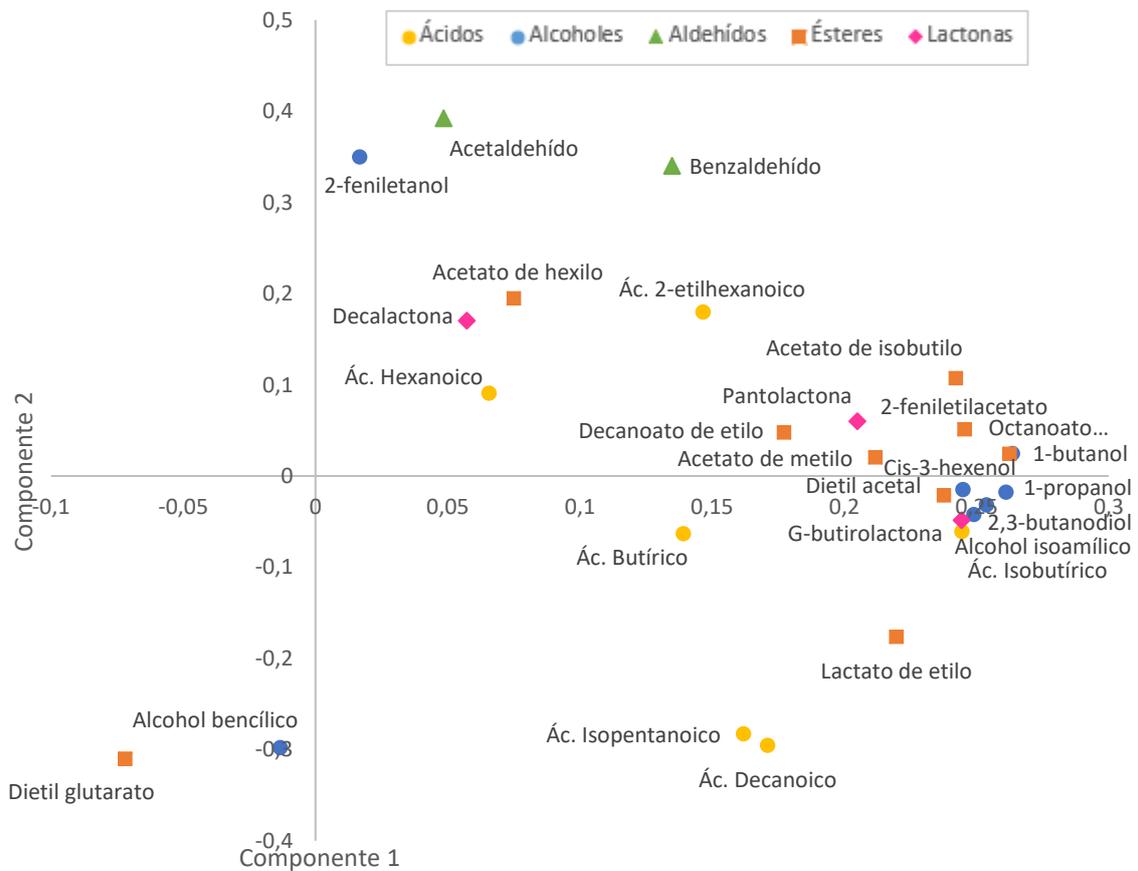


Figura 5: Gráfico de cargas para los compuestos volátiles en la variedad Garnacha.

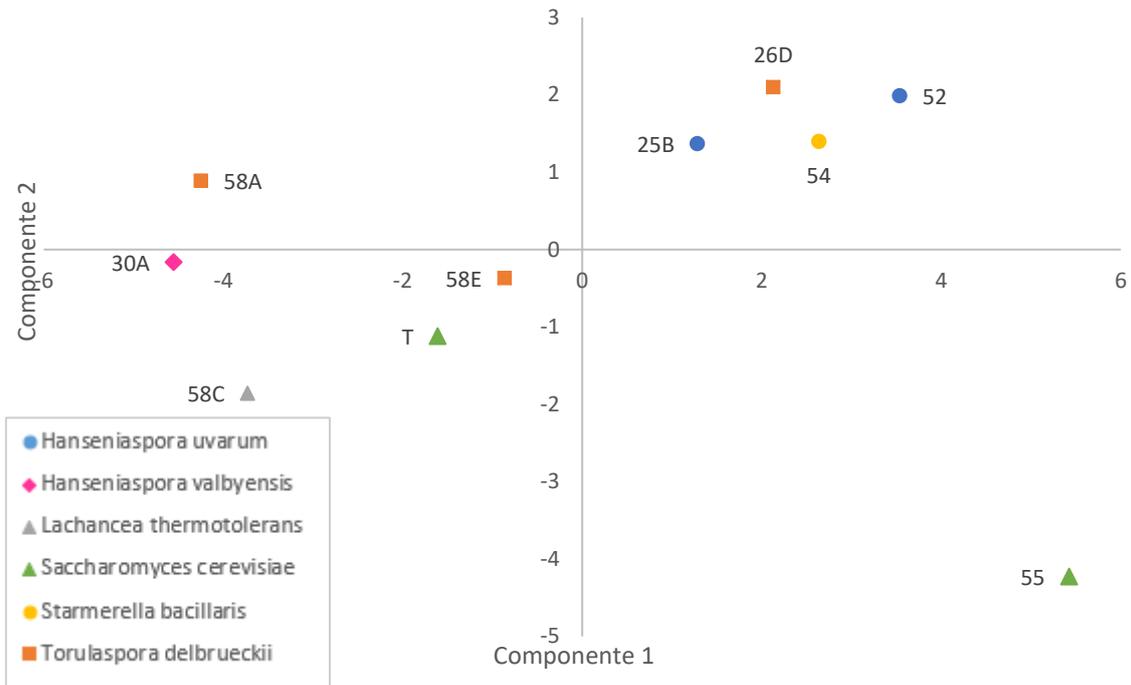


Figura 6: Gráfico de puntuaciones para las cepas de levaduras en la variedad Cabernet Sauvignon.

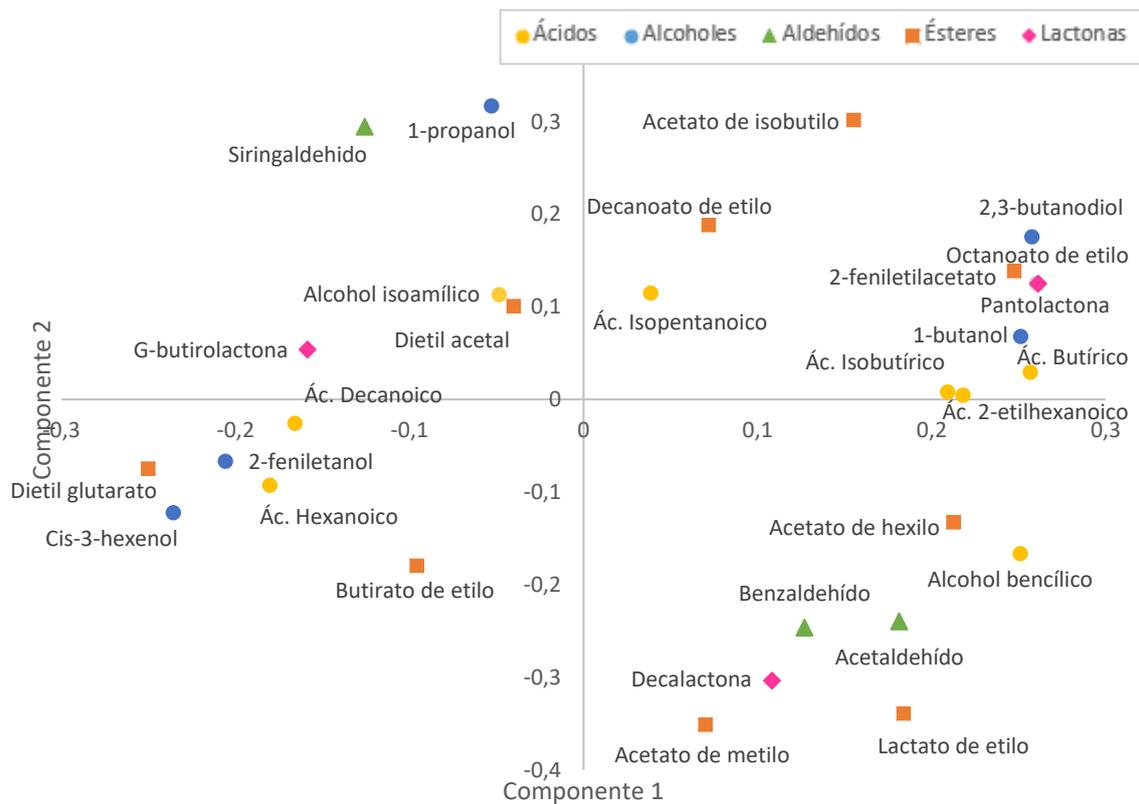


Figura 7: Gráfico de cargas para los compuestos volátiles en la variedad Cabernet Sauvignon.

## 5. CONCLUSIONES

Basándose en los resultados obtenidos de este estudio, se pueden extraer una serie de conclusiones de los efectos que tienen las diferentes cepas de levaduras seleccionadas del género no-*Saccharomyces* sobre los perfiles aromáticos de los vinos de las variedades Merlot, Garnacha y Cabernet Sauvignon.

1. Se pone de manifiesto que la variedad de uva influye de forma significativa en la predominancia de las cepas de levaduras no-*Saccharomyces* y *S. cerevisiae* durante la vinificación y, por tanto, en los perfiles aromáticos más deseables en función de si se trata de cultivos mixtos o puros.
2. Para Merlot, la cepa de levadura que posee una mayor diferenciación es la 40, correspondiente a *H. uvarum*. En el ANOVA se puede observar que destaca en la liberación de ésteres, alcoholes, aldehídos y lactonas. Y, en el PCA, es la cepa mayor productora de: 2-feniletacetato, 2-feniletanol y octanoato de etilo; dotando al vino resultante de aromas afrutados y florales.
3. Para la variedad de uva Garnacha, son pocas las levaduras no-*Saccharomyces* que se diferencian, imponiéndose claramente las dos cepas de *S. cerevisiae* (T y 55) para todas las familias odorantes. Como resultado, se obtienen vinos con mejores perfiles aromáticos con cultivos puros.
4. Para Cabernet Sauvignon, no existe una diferenciación significativa, pero de los resultados obtenidos del tratamiento estadístico se puede ver que la cepa 25B (*H. uvarum*), es la levadura con mayor concentración de síntesis de la mayoría de los compuestos volátiles de cada familia. Además, se observa que claramente se obtienen vinos con mejores aromas con cultivos mixtos.
5. En este sentido, dentro de las no-*Saccharomyces*, la cepa de levadura que más destaca es la especie correspondiente a *Hanseniaspora uvarum*, confiriendo las mejores características organolépticas e implementando la calidad y complejidad de los vinos resultantes.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- ALARCÓN, R. 2016. *Caracterización aromática de vinos de Fondillón de la D.O. Alicante*. Trabajo Final de Grado en Ingeniería Agroalimentaria y del Medio Rural. Universitat Politècnica de València. 27 pp.
- ANDORRÀ, I.; BERRADRE, M.; ROZÈS, N.; MAS, ALBERT.; GUILLAMÓN, J.M.; ESTEVE-ZARZOSO, B. 2010. Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentation. *European Food Research and Technology*, 231: 215-224.
- ARSLAN, E.; ÇELIK, Z.D.; CABAROGLU, T. 2018. Effects of pure and mixed autochthonous *Torulaspota delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on fermentation and volatile compounds of Narince wines. *Foods*, 7:147.
- AZZOLINI, M.; TOSI, E.; LORENZINI, M.; FINATO, F.; ZAPPAROLI, G. 2015. Contribution to the aroma of white wines by controlled *Torulaspota delbrueckii* cultures in association with *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31: 277-293.
- BALERDI, J. 2016. *Perfil aromático de vinos tintos elaborados con levaduras seleccionadas ecológicas de la D.O. Pago Chozas Carrascal*. Trabajo Final de Máster en Enología. Universitat Politècnica de València. 31 pp.
- BELDA, A. 2017. *Estudio filo-funcional de levaduras de interés enológico para su aplicación industrial*. Tesis Doctoral en Ciencias Biológicas. Universidad Politécnica de Madrid. 253 pp.
- CHEN, K.; ESCOTT, C.; LOIRA, I.; DEL FRESNO, J.M.; MORATA, A.; TESFAYE, W.; CALDERON, 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.
- CLAUS, H. 2009. Exoenzymes of wine microorganisms. *Biology of Microorganisms in Grapes, in Must and in Wine*, 14: 259-271.
- 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 Microbiology*, 28: 873-882.
- CULLERÉ, L.; ESCUDERO, A.; CACHO, J.; FERREIRA, V. 2004. Gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality Spanish aged red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 1653-1660.
- ENGLEZOS, V.; RANTSIOU, K.; CRAVERO, F.; TORCHIO, F.; POLLON, M.; FRACASSETTI, D.; ORTIZ-JULIEN, A.; GERBI, V.; ROLLE, L.; COCOLIN, L. 2018. Volatile profile of white wines fermented with sequential inoculation of *Starmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chemistry*, 257: 350-360.
- ENGLEZOS, V.; TORCHIO, F.; CRAVERO, F.; MARENGO, F.; GIACOSA, S.; GERBI, V.; RANTSIOU, K.; ROLLE, L.; COCOLIN, L. 2016. Aroma profile and composition of Barbera wines obtained by mixed fermentations of *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Science and Technology*, 73: 567-575.

- ENOMINER, 2011-2015. *Tipos de uva: Cabernet Sauvignon*, visto el 4 de noviembre de 2017. <http://www.enominer.com/lasuv.html>
- ESCRIBANO, R.; GONZÁLEZ-ARENZANA, L.; PORTU, J.; GARIJO, P.; LÓPEZ-ALFARO, I.; LÓPEZ, R.; SANTAMARÍA, P.; GUTIÉRREZ, A.R. 2018. Wine aromatic compound production and fermentative behaviour within different non-*Saccharomyces* species and clones. *Journal of Applied Microbiology*, 124: 1521-1531.
- ESCRIBANO-VIANA, R.; GONZÁLEZ-ARENZANA, L.; PORTU, J.; GARIJO, P.; LÓPEZ-ALFARO, I.; LÓPEZ, R.; SANTAMARÍA, P.; GUTIÉRREZ, A.R. 2018. Wine aroma evolution throughout alcoholic fermentation sequentially inoculated with non-*Saccharomyces/Saccharomyces* yeasts. *Food Research International*, 112: 17-24.
- FERREIRA, V.; LÓPEZ, R.; CACHO, J.F. 2000. Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1659-1667.
- FRANCIS, L. 2013. Fermentation-derived aroma compounds and grape-derived monoterpenes. *The Australian Wine Research Institute*.
- GAMBETTA, J.M.; BASTIAN, S.E.P.; COZZOLINO, D.; JEFFERY, D.W. 2014. Factors influencing the aroma composition of Chardonnay wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62: 6512-6534.
- GAMERO, A. 2011. *Study of the production and release of aromas during winemaking carried out by different Saccharomyces species and hybrids*. Tesis Doctoral en Ciencia, Tecnología y Gestión Alimentaria. Universitat Politècnica de València. 301 pp.
- GARCÍA, M.; ESTEVE-ZARZOSO, B.; ARROYO, T. 2016. Non-*Saccharomyces* yeasts: Biotechnological role for wine production. *INTECH*, 11: 250-271.
- GAROFALO, C.; TRISTEZZA, M.; GRIECO, F.; SPANO, G.; CAPOZZI, V. 2016. From grape berries to wine: Population dynamics of cultivable yeasts associated to “Nero di Troia” autochthonous grape cultivar. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32:59.
- GOBBI, M.; COMITINI, F.; DOMIZIO, P.; ROMANI, C.; LENCIONI, L.; MANNAZZU, I.; CIANI, M. 2013. *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve to overall quality of wine. *Food Microbiology*, 33: 271-281.
- HERNÁNDEZ-ORTEGA, P.; FRANCO, E.; GONZÁLEZ HUERTA, C.; MARTÍNEZ GARCÍA, J.; CABELLOS, M.; SUBERVIOLA, M.; ORRIOLS, I.; CACHO, J. 2014. Criteria to discriminate between wines aged in oak barrels and macerated with oak fragments. *Food Research International*, 57: 234-241.
- HOLT, S.; CORDENTE, A.G.; CURTIN, C. 2012. *Saccharomyces cerevisiae* STR3 and yeast cystathionine  $\beta$ -lyase enzymes: The potential for engineering increased flavor release. *Bioengineered Bugs*, 3: 180-182.
- HU, K.; JIN, G.J.; MEI, W.C.; LI, T.; TAO, Y.S. 2018. Increase of medium-chain fatty acid ethyl ester content in mixed *H. uvarum/S. cerevisiae* fermentation leads to wine fruity aroma enhancement. *Food Chemistry*, 239: 495-501.

- IVIT, N.N.; LOIRA, I.; MORATA, A.; BENITO, S.; PALOMERO, F.; SUÁREZ-LEPE, J.A. 2018. Making natural sparkling wines with non-*Saccharomyces* yeasts. *European Food Research and Technology*, 244: 925-935.
- JARA, C.; LAURIE, V.F.; MAS, A.; ROMERO, J. 2016. Microbial terroir in Chilean valleys: diversity of non-conventional yeast. *Frontiers in Microbiology*, 7:663.
- JIANG, B.; ZHANG, Z. 2010. Volatile compounds of young wines from Cabernet Sauvignon, Cabernet Gernischet and Chardonnay varieties grown in the Loess Plateau region of China. *Molecules*, 15: 9184-9196.
- JOLLY, N.P.; VARELA, C.; PRETORIUS, I.S. 2014. Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Research*, 14: 215-237.
- LAMBERT, I. 2017. *Evaluación enológica de la co-inoculación de levaduras Saccharomyces y no-Saccharomyces nativas en CV. Cabernet Sauvignon*. Trabajo Final de Grado en Ingeniería Agronómica. Universidad de Chile. 33 pp.
- LAMBRECHTS, M.G.; PRETORIUS, I.S. 2000. Yeast and its importance to wine aroma. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21: 97-129.
- LANGUET, P.; AGUERA, E.; SAMSON, A.; ORTIZ-JULIEN, A.; PALACIOS GARCÍA, A.T.; SALMON, J.M. 2005. Exaltación de las propiedades aromáticas del mosto mediante el uso de especies de levadura no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces*. *Dialnet Unirioja*, 43: 93-102.
- LÓPEZ, S.; MATEO, J.J.; MAICAS, S. 2014. Characterisation of *Hanseniaspora* isolates with potential aroma-enhancing properties in Muscat wines. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 35: 292-303.
- LUAN, Y.; ZHANG, B.Q.; DUAN, C.Q.; YAN, G.L. 2018. Effects of different pre-fermentation cold maceration time on aroma compounds of *Saccharomyces cerevisiae* co-fermentation with *Hanseniaspora opuntiae* or *Pichia kudriavzevii*. *Food Science and Technology*, 92: 177-186.
- LUYT, N.A. 2015. *Interaction of multiple yeast species during fermentation*. Trabajo Final de Máster en Ciencias. Universidad de Stellenbosch. 77 pp.
- MARCON, A.R.; SCHWARZ, L.V.; DUTRA, S.V.; MOURA, S.; AGOSTINI, F.; DELAMARE, A.P.L.; ECHEVERRIGARAY, S. 2018. Contribution of a Brazilian *Torulasporea delbrueckii* isolate and a commercial *Saccharomyces cerevisiae* to the aroma profile and sensory characteristics of Moscato Branco wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 24: 461-468.
- MEDINA, K.; BOIDO, E.; FARIÑA, L.; GIOIA, O.; GÓMEZ, M.E.; BARQUET, M.; GAGGERO, C.; DELLACASSA, E.; CARRAU, F. 2013. Increased flavour diversity of Chardonnay wines by spontaneous fermentation and co-fermentation with *Hanseniaspora vineae*. *Food Chemistry*, 141: 2513-2521.
- MONTALVÁ, L. 2017. *Estudio del perfil sensorial de vinos elaborados con levaduras no-Saccharomyces a partir de la variedad Merlot*. Trabajo Final de Grado en Ingeniería Agroalimentaria y del Medio Natural. Universitat Politècnica de València. 40 pp.
- MOREIRA, N.; MENDES, F.; GUEDES DE PINHO, P.; HOGG, T.; VASCONCELOS, I. 2008. Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora*

*uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. *International Journal of Food Microbiology*, 124: 231-238.

- MOREIRA, N.; PINA, C.; MENDES, F.; COUTO, J.A.; HOGG, T.; VASCONCELOS, I. 2011. Volatile compounds of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum* during red wine vinifications. *Food Control*, 22: 662-667.
- OCÓN, E. 2014. *Diversidad de levaduras no-Saccharomyces en diferentes ecosistemas vitivinícolas*. Tesis Doctoral en Agricultura y Alimentación. Universidad de La Rioja. 177 pp.
- ORTEGA, C.; LÓPEZ, R.; CACHO, J.; FERREIRA, V. 2001. Fast analysis of important wine volatile compounds: Development and validation of a new method based on gas chromatographic-flame ionisation detection analysis of dichloromethane microextracts. *Journal of Chromatography A*, 923: 205-214.
- PADILLA, B.; GIL, J.V.; MANZANARES, P. 2016. Past and future of non-*Saccharomyces* yeasts: From spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity. *Frontiers in Microbiology*, 7:411.
- PIÑEIRO, Z. 2005. *Desarrollo de nuevos métodos de extracción para el análisis de compuestos de interés enológico*. Tesis Doctoral en Ciencias Químicas. Universidad de Cádiz. 284 pp.
- RIBERA DEL DUERO, 2013-2017. *Variedades de uva: Merlot y Garnacha*, visto el 4 de noviembre de 2017.  
<https://riberadelduero.es/es/conocer-la-ribera-del-duero/variedades-de-uva>
- RIBÉREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONÈCHE, B.; LONVAUD, A. 2006. Biochemistry of alcoholic fermentation and metabolic pathways of wine yeasts. *Ed. John Wiley & Sons*, 2: 53-77.
- RODRÍGUEZ, S.E.; CLIMENT, S. 2017. The Spanish wine protected designations of origin in the worlds of production: Disparity of technological and commercial conventions. *Agricultural and Resource Economics*, 17: 101-125.
- SADOUDI, M.; TOURDOT-MARÉCHAL, R.; ROUSSEAU, S.; STEYER, D.; GALLARDO-CHACÓN, J.J.; BALLESTER, J.; VICHI, S.; GUÉRIN-SCHNEIDER, R.; CAIXACH, J.; HERVÉ, A. 2012. Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts. *Food Microbiology*, 32: 243-253.
- SAERENS, S.M.; DELVAUX, F.R.; VERSTREPEN, K.J.; THEVELEIN, J.M. 2010. Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Biotechnology*, 3: 165-177.
- SANTOS, M.C. 2016. *Evaluación enológica de co-inoculación de levaduras Saccharomyces y no-Saccharomyces en vinos chilenos*. Trabajo Final de Grado en Ingeniería Química. Universidad Politécnica de Madrid. 144 pp.
- SUÁREZ, J.A.; MORATA, A. 2015. *Levaduras para vinificación en tinto*. AMV Ediciones. Madrid. 71 pp.

- SWIEGERS, J.H.; BARTOWSKY, E.J.; HENSCHKE, P.A.; PRETORIUS, I.S. 2008. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11: 139-173.
- TRISTEZZA, M.; TUFARIELLO, M.; CAPOZZI, T.; SPANO, G.; MITA, G.; GRIECO, F. 2016. The oenological potential of *Hanseniaspora uvarum* in simultaneous and sequential co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for industrial wine production. *Frontiers in Microbiology*, 7:670.
- TOFALO, R.; SCHIRONE, M.; TORRIANI, S.; RANTSIOU, K.; COCOLIN, L.; PERPETUINI, G.; SUZZI, G. 2012. Diversity of *Candida zemplinina* strains from grapes and Italian wines. *Food Microbiology*, 29: 18-26.
- VARELA, C. 2016. The impact of non-*Saccharomyces* yeasts in the production of alcoholic beverages. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100: 9861-9874.
- VELÁZQUEZ, R.; ZAMORA, E.; ÁLVAREZ, M.L.; HERNÁNDEZ, L.M.; RAMÍREZ, M. 2015. Effects of new *Torulaspota delbrueckii* killer yeasts on the must fermentation kinetics and aroma compounds of white table wine. *Frontiers in Microbiology*, 6:1222.
- VELÁZQUEZ, R.; ZAMORA, E.; ÁLVAREZ, M.L.; LÓPEZ, A.; HERNÁNDEZ, L.M.; RAMÍREZ, M. 2017. Utilidad de *Torulaspota delbrueckii* en la elaboración de vino tinto. *La Semana Vitivinícola*, 3501: 1462-1467.
- VILANOVA, M.; OLIVEIRA, J.M. 2012. Application of gas chromatography on the evaluation of grape and wine aroma in Atlantic viticulture (NW Iberian Peninsula). *INTECH*, 7: 109-146.
- VITIVINICULTURA, 2012. *Uvas de vino tintas: Variedad de Vid: Merlot, Garnacha y Cabernet Sauvignon*, visto el 4 de noviembre de 2017.  
<http://www.vitivinicultura.net/ugas-de-vino-tintas-merlot.html>  
<http://www.vitivinicultura.net/viticultura-de-la-garnacha-tinta.html>  
<http://www.vitivinicultura.net/ugas-de-vino-tinto-cabernet-sauvignon.html>
- WANG, C.; LIU, Y. 2013. Dynamic study of yeast species and *Saccharomyces cerevisiae* strains during the spontaneous fermentations of Muscat blanc in Jingyang, China. *Food Microbiology*, 33: 172-177.
- XU, Y.; ZHAO, G.A.; WANG, L.P. 2006. Controlled formation of volatile components in cider making using a combination of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora valbyensis* yeast species. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33: 192-196.
- ZEA, L.; MOYANO, L.; MORENO, J.; CORTES, B.; MEDINA, M. 2001. Discrimination of the aroma fraction of Sherry wines obtained by oxidative and biological ageing. *Food Chemistry*, 75: 79-84.
- ZHANG, B.Q.; LUAN, Y.; DUAN, C.Q.; YAN, G.L. 2018. Use of *Torulaspota delbrueckii* co-fermentation with two *Saccharomyces cerevisiae* strains with different aromatic characteristic to improve the diversity of red wine aroma profile. *Frontiers in Microbiology*, 9:606.

