

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERÍA AGRONÒMICA I DEL
MEDI NATURAL



**ESTUDIO DEL PERFIL AROMÁTICO DE VINOS OBTENIDOS
CON LEVADURAS SELECCIONADAS *Saccharomyces* Y no-
*Saccharomyces***

**TRABAJO FINAL DE GRADO EN INGENIERÍA AGROALIMENTARIA
Y DEL MEDIO RURAL**

CURSO 2019/2020

Autor: Jordi Checa Tapia

Tutora: M^a José García Esparza

Valencia, octubre 2020

Datos del trabajo final de grado

Título del TFG: Estudio del perfil aromático de vinos obtenidos con levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*

Autor: Jordi Checa Tapia

Tutora: M^a José García Esparza

Lugar y fecha: Valencia, octubre 2020

Resumen

El trabajo tiene como principal objetivo trabajar la fermentación de tres variedades de uva tinta (Merlot, Garnacha y Cabernet Sauvignon), mediante la implementación de cepas de levaduras seleccionadas tanto del género *Saccharomyces* como no-*Saccharomyces* (22H y 58E). Para cada una de las tres variedades, se realiza el ensayo por triplicado, es decir, se realiza la vinificación con tres controles mediante levaduras propias de la uva, tres vinificaciones con *Saccharomyces* y tres vinificaciones con un cultivo mixto de *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*. Una vez terminada la vinificación se realiza una cromatografía de gases para la determinación del perfil aromático. Concluido el análisis mediante la cromatografía, se tratan los resultados estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) y finalmente se estudia cual es la levadura que aporta mejores características organolépticas para cada variedad de uva.

Palabras clave: *Saccharomyces*, no-*Saccharomyces*, aroma, Garnacha, Merlot, Cabernet Sauvignon.

Títol: Estudi del perfil aromàtic de vins obtinguts amb llevats seleccionats *Saccharomyces* i no-*Saccharomyces*

Resum

El treball té com a principal objectiu treballar la fermentació de tres varietats de raïm negre (Merlot, Garnacha i Cabernet Sauvignon), mitjançant la implementació de ceps de llevats seleccionats tant del gènere *Saccharomyces* com no-*Saccharomyces* (22H i 58E). Per a cadascuna de les tres varietats, es realitza l'assaig per triplicat, és a dir, es realitza la vinificació amb tres controls mitjançant llevats propis del raïm, tres vinificacions amb *Saccharomyces* i tres vinificacions amb un cultiu mixt de *Saccharomyces* i no-*Saccharomyces*. Una vegada acabada la vinificació es realitza una cromatografia de gasos per a la determinació del perfil aromàtic. Conclòs l'anàlisi mitjançant la cromatografia, es tracten els resultats estadísticament mitjançant anàlisis de variància (ANOVA) i finalment s'estudia com és el llevat que aporta millors característiques organolèptiques per a cada varietat de raïm.

Paraules clau: *Saccharomyces*, no-*Saccharomyces*, aroma, Garnacha, Merlot, Cabernet Sauvignon.

Title: Study of the aromatic profile of wines obtained with *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts

Summary

The main objective of the work is to work on the fermentation of three varieties of red grapes (Merlot, Garnacha and Cabernet Sauvignon), through the implementation of selected yeast strains of the genus *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* (22H and 58E). For each of the

three varieties, the test is carried out in triplicate, that is, the vinification is carried out with three controls using typical grape yeasts, three vinifications with *Saccharomyces* and three vinifications with a mixed culture of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces*. Once the vinification is completed, a gas chromatography is carried out to determine the aromatic profile. Once the analysis by chromatography is completed, the results are statistically treated by analysis of variance (ANOVA) and finally we study which is the yeast that provides the best organoleptic characteristics for each grape variety.

Keywords: *Saccharomyces*, non-*Saccharomyces*, aroma, Garnacha, Merlot, Cabernet Sauvignon.

Índice

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	AROMA VARIETAL.....	2
1.2.	AROMA FERMENTATIVO. INFLUENCIA DEL TIPO DE LEVADURA EN LA COMPOSICIÓN VOLÁTIL DEL VINO.....	3
2.	OBJETIVOS.....	5
3.	MATERIALY MÉTODOS.....	5
3.1.	MATERIA PRIMA	5
3.1.1.	UVA.....	5
3.1.2	LEVADURAS.....	6
3.2.	ELABORACIÓN DEL VINO.....	6
3.3.	DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CONVENCIONALES	8
3.4.	ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES.....	8
3.4.1	EXTRACCIÓN	8
3.4.2	<i>Análisis cromatográfico</i>	9
3.4.3	<i>Tratamiento estadístico</i>	10
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	10
4.1.	EFFECTO DEL TIPO DE LEVADURA SOBRE LOS PARÁMETROS GENERALES DEL VINO	11
4.2.	INFLUENCIA DEL TIPO DE LEVADURA SOBRE EL PERFIL AROMÁTICO DEL VINO	11
4.2.1	<i>Ácidos</i>	12
4.2.2	<i>Alcoholes</i>	16
4.2.3	<i>Aldehídos</i>	16
4.2.4	<i>Ésteres</i>	17
4.2.5	<i>Lactonas</i>	17
4.3	ANÁLISIS DE COMPUESTOS PRINCIPALES.....	17
5.	CONCLUSIONES.....	23
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	24

Índice de tablas

Tabla 1.	Aromas principales de las variedades utilizadas (Vitivinicultura, 2012).....	3
Tabla 2.	Características fisicoquímicas de los mostos.	7
Tabla 3.	Efecto de la levadura de fermentación sobre los parámetros generales de los vinos..	11
Tabla 4.	Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos volátiles (mg/L) de los vinos elaborados de Merlot con diferentes levaduras (Vinificación Control, Vinificación con <i>S. cerevisiae</i> 22H; vinificación secuencial con <i>T. delbrueckii</i> 58E y <i>S. cerevisiae</i>	13

Tabla 5. Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos volátiles (mg/L) de los vinos elaborados de Cabernet con diferentes levaduras (Vinificación Control, Vinificación con *S.cerevisiae* 22H; vinificación secuencial con *T. delbrueckii* 58E y *S. cerevisiae*. 14

Tabla 6. Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos volátiles (mg/L) de los vinos elaborados de Garnacha con diferentes levaduras (Vinificación Control, Vinificación con *S. cerevisiae* 22H; vinificación secuencial con *T. delbrueckii* 58E y *S. cerevisiae*. 15

Índice de figuras

Figura 1. Componentes del aroma varietal. 2

Figura 2. Depósitos de acero inoxidable utilizados en las experiencias y situados en la planta piloto del Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo, Universitat Politècnica de València. 7

Figura 3. Diagrama de flujo del proceso de elaboración de los vinos tintos. 9

Figura 4. Análisis de Componentes principales (Componente 1 frente a 2) realizado sobre los compuestos volátiles identificados en los vinos de Cabernet fermentados con las levaduras en estudio. a) gráfico de puntuaciones (scores), b) gráfico de cargas (loadings). 20

Figura 5. Análisis de Componentes principales (Componente 1 frente a 2) realizado sobre los compuestos volátiles identificados en los vinos de Garnacha fermentados con las levaduras en estudio. a) gráfico de puntuaciones (scores), b) gráfico de cargas (loading). 21

Figura 6. Análisis de Componentes principales (Componente 1 frente a 2) realizado sobre los compuestos volátiles identificados en los vinos de Merlot fermentados con las levaduras en estudio. a) gráfico de puntuaciones (scores), b) gráfico de cargas (loadings). 22

1. INTRODUCCIÓN

Recientes estudios afirman que el origen de la elaboración de vino se remonta a las más antiguas civilizaciones mediterráneas (año 7000 a.C.) (Terral *et al.*, 2010). Con el conocimiento de que las levaduras eran las responsables de la biotransformación del mosto (compuesto principalmente por glucosa y fructosa) en alcohol y dióxido de carbono, la vinificación comenzó a ser un proceso controlable desde la viña hasta el embotellado (Chambers y Pretorius, 2010). El vino puede definirse (Belda *et al.*, 2014) como la bebida obtenida de la fermentación alcohólica, completa o parcial, de la uva o su mosto. Se trata de un producto que muestra una gran heterogeneidad dependiendo de:

- La uva: variedad de *Vitis vinifera* de la cual procede, grado de maduración y estado fitosanitario.
- Proceso tecnológico de elaboración: referido tanto a las instalaciones bodegueras como a los tratamientos enológicos empleados en el mosto o el vino terminado.
- Agentes fermentativos: fundamentalmente, las levaduras que llevan a cabo la transformación. Pueden proceder de la microflora natural presente en el hollejo de la uva (fermentaciones espontáneas) o de inóculos seleccionados en el caso de fermentaciones biológicas controladas, en las que se conoce la naturaleza y fisiología de las especies y/o cepas que propician el proceso de vinificación.

Durante la fermentación espontánea de los mostos se produce una sustitución secuencial de distintas especies de levaduras. Inicialmente, cuando el grado alcohólico es bajo, predominan las levaduras apiculadas, productoras de bajo grado alcohólico que pueden producir importantes concentraciones de ácidos y otros compuestos volátiles. Predominan los géneros *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Kluyveromyces* y *Pichia* (*Hansenula*) (Fleet y Heard, 1993). Estas levaduras aseguran el inicio de la fermentación, aunque son muy sensibles al anhídrido sulfuroso, de manera que su participación es reducida cuando las vendimias han sido muy sulfitadas. Son las levaduras no-*Saccharomyces*, vocablo utilizado en el mundo de la enología para referirse a muchas especies diferentes de levaduras (Jolly *et al.*, 2014; Medina *et al.*, 2013; Padilla *et al.*, 2016).

Durante este proceso, se favorece el dominio de aquellas especies que presentan el metabolismo fermentativo más eficiente, junto con una mayor resistencia al grado alcohólico, es el caso de *S. cerevisiae*. Por ello, esta especie suele ser la que lleva a cabo la mayor parte del proceso fermentativo (Pretorius, 2000).

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 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).

La selección de cepas de levadura procedentes de viñedos de la zona permite mantener las cualidades de las fermentaciones espontáneas de la zona, con la seguridad y reproducibilidad que requieren las fermentaciones industriales (Álvarez-Pérez *et al.*, 2012). Un proceso de selección adecuado no solo garantizará un proceso de fermentación exitoso, si no que contribuirá a la producción de vinos con características sensoriales marcadas y diferenciadas propias de cada región vitivinícola.

En el mercado global actual del vino, el consumidor demanda nuevos estilos, que no pierdan la identidad del terroir y de la variedad, pero que despierten el interés y las nuevas sensaciones al beber un vino. Dentro de este marco de innovación, el empleo de nuevas levaduras no-*Saccharomyces* se presenta como una herramienta de futuro que otorgue a nuestros vinos una diferenciación para llegar a estos consumidores finales.

El presente trabajo se centra en el estudio del papel de las levaduras no-*Saccharomyces* (*Torulaspota delbrueckii* 58E) en cultivos mixtos junto con *Saccharomyces cerevisiae* (22H) en la vinificación, ya que en recientes trabajos se ha destacado su positiva contribución a la composición analítica y sensorial del vino.

1.1. AROMA VARIETAL

El aroma varietal o 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 relevante (Gamero, 2011). Los compuestos aromáticos procedentes de las uvas juegan un papel decisivo en la calidad y el carácter de los vinos (Canuti *et al.*, 2009).

El aroma varietal depende de varios factores como el tipo de riego, el clima, el suelo... (Blindon *et al.*, 2013). Todos estos factores en conjunto hacen que la uva en el momento de la vendimia presente una determinada concentración de compuestos aromáticos, es por ello que, una misma variedad de uva cultivada en diferentes regiones o países, su mosto no tiene por qué expresar los mismos aromas.

Hay variedades de uva con un aroma varietal muy acentuado que suele estar relacionados con aromas frutales, vegetales y florales. La personalidad aromática, propia de cada una de las cepas de uva, radica en las infinitas combinaciones de las concentraciones de los diferentes compuestos volátiles en los vinos (Riberau-Gayon *et al.*, 2002).

El aroma varietal considera la presencia de tres grandes grupos (Figura 1): el aroma varietal libre que está formado por sustancias volátiles y odorantes, el segundo grupo son los precursores de origen varietal y por último la fracción de aromas pre-fermentativos que en algunos casos también pueden contribuir al aroma varietal. Entre todos los componentes del aroma, los más importantes para la tipicidad y calidad de un vino son los aromas aportados por la variedad (Belancic y Agosin, 2009).

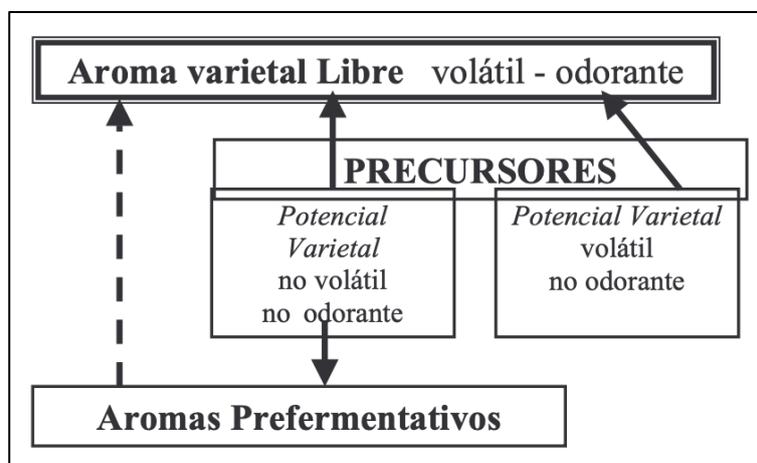


Figura 1. Componentes del aroma varietal.

Los aromas más destacados en las variedades Merlot, Garnacha y Cabernet Sauvignon, objeto del estudio, se muestran en la Tabla 1:

Tabla 1. Aromas principales de las variedades utilizadas (Vitivinicultura, 2012).

Variedad	Aromas
Merlot	Grosellas, moras, frutos secos, violeta y cuero.
Garnacha	Fresa, pimienta recién molida y manzana.
Cabernet Sauvignon	Grosella, violeta, pimienta verde, aceitunas, menta, chocolate y tabaco.

Es importante señalar que prácticamente el total de los compuestos aromáticos de la uva, se encuentran en el hollejo de la baya, aspecto a tener en cuenta en la elaboración del vino ya que el tiempo de contacto del mosto con los hollejos y las técnicas de elaboración influirán en el aroma final.

1.2. AROMA FERMENTATIVO. INFLUENCIA DEL TIPO DE LEVADURA EN LA COMPOSICIÓN VOLÁTIL DEL VINO

El aroma fermentativo o secundario se desarrolla durante la fermentación alcohólica debido a la acción de las levaduras y también durante la fermentación maloláctica mediante la intervención de las bacterias lácticas. Este aporta mayor complejidad al vino, potenciando y haciendo más complejo el aroma varietal (Swiegers *et al.*, 2005).

Para llevar a cabo la vinificación existe la posibilidad de emplear levaduras autóctonas (procedentes de la uva o material de la bodega) o comerciales (levaduras secas activas, LSA) (Bermejo, 2014).

El uso de levaduras comerciales tiene la ventaja de que todo el proceso de fermentación está más controlado, permiten obtener vinos más uniformes, mientras que las levaduras autóctonas son específicas de cada área, están adaptadas a su clima y a la materia prima, proporcionando características únicas al vino (Torija, 2002).

Se ha observado que cuando se utilizan levaduras autóctonas seleccionadas a partir de las uvas o mostos, se obtiene un mayor rendimiento en la vinificación, ya que estas levaduras están adaptadas al medio de la materia prima y fermentan con mayor rapidez, permitiendo obtener vinos con un *terroir* muy marcado y por tanto vinos muy tipificados de la zona de producción (Arslan *et al.*, 2018; Lambert, 2017; Zhang *et al.*, 2018).

Las levaduras además de transformar el azúcar en alcohol también generan nuevos compuestos aromáticos volátiles que dependen de la cepa y de su metabolismo (Jolly *et al.*, 2006). También expresan algunos aromas primarios que en un principio no eran volátiles. Esto se debe a la acción de algunas levaduras no-*Saccharomyces* que son capaces de sintetizar gran cantidad de enzimas como la β -glucosidasa que tiene la capacidad de transformar los compuestos no volátiles en volátiles (Arévalo *et al.*, 2005), transformación que no pueden realizar las levaduras del género *Saccharomyces cerevisiae* (Strauss *et al.*, 2001).

En la actualidad hay mucho interés en la forma de elaborar el vino para tratar de mejorar el perfil aromático del mismo, y por ello ha sido muy cuestionada la fermentación pura con *Saccharomyces cerevisiae*, ya que los vinos elaborados de esta forma no plantean ningún

problema durante la fermentación, pero pierden tipicidad y por lo tanto carácter diferenciador (Viana *et al.*, 2011).

Por otra parte, también se ha observado que la fermentación del mosto mediante un cultivo puro de levaduras no-*Saccharomyces*, no es viable ya que 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) y no son capaces de realizar toda la fermentación por sí solas debido a su bajo poder fermentativo.

La palabra no-*Saccharomyces* es utilizada en el mundo de la enología para referenciar a distintas especies de levaduras que además no pertenecen al género *Saccharomyces* (Jolly *et al.*, 2014; Medina *et al.*, 2013; Padilla *et al.*, 2016). Actualmente es muy habitual crear cultivos mixtos de levaduras de ambos géneros, seleccionadas mediante diferentes estudios, dando lugar a vinos con mayor tipicidad y carácter. Esto es posible gracias a la introducción de cepas no-*Saccharomyces* junto con otras (Chen *et al.*, 2018; Marcon *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018).

Las levaduras no-*Saccharomyces* tienen una gran importancia al principio de la fermentación, debido a que tienen un gran potencial para producir enzimas y demás compuestos entre los que se encuentran los compuestos volátiles, lo que se traduce en vinos con un gran aroma y complejos (Claus, 2009; García *et al.*, 2016; Padilla *et al.*, 2016). No todo son ventajas, ya que estas levaduras cuando el grado alcohólico y las condiciones anaerobias no son adecuados no lo resisten y acaban agotándose (Hu *et al.*, 2018). En cambio, las levaduras del género *Saccharomyces* permiten mucho más grado alcohólico y son utilizadas tanto en cultivos mixtos como puros (Luyt, 2015; Ocón, 2014)

Actualmente, la tendencia es inocular cultivos mixtos de *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*, ambos géneros o también de forma secuencial, es decir, separadas en diferentes etapas de la fermentación (Fleet., 2003). Este sistema de fermentar ha demostrado que la fermentación se realiza sin problemas y además se potencia el aroma primario, así como también se tipifica el vino gracias a la acción de las levaduras no-*Saccharomyces*.

La contribución aromática de la etapa fermentativa ha sido estudiada desde diversas perspectivas, identificando aquellas variables que más influyen en la producción de aromas, comparando rendimientos entre distintas cepas en mostos específicos (Regodón *et al.*, 2006) e interacciones de éstas durante la fermentación alcohólica (Fleet, 2008). Los principales tipos de aromas fermentativos sintetizados son ácidos orgánicos, alcoholes superiores, ésteres, y en menor extensión aldehídos. Los aromas fermentativos pueden aportar características positivas, como aromas frutales o florales (algunos ésteres y alcoholes superiores).

Desde hace algún tiempo, las levaduras no-*Saccharomyces* han sido objeto de numerosos estudios, como los que han demostrado que son buenas productoras de ésteres: isoamil acetato (aroma de plátano) y acetato 2-phenyl-ethyl (sabor frutal y floral), contribuyendo al sabor a fruta en los vinos (Domizio *et al.*, 2011). Su producción de subproductos y su actividad metabólica durante las fermentaciones espontáneas o por inoculación, han desarrollado un gran interés por su contribución a la definición aromática, la mejora de la complejidad y el realce de los vinos (Comitini *et al.*, 2011).

Los estudios sobre los géneros *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Saccharomycodes* y *Zygosaccharomyces* han demostrado su capacidad de utilizar enzimas en la liberación de compuestos aromáticos de precursores no aromáticos en uvas. Aunque, estas levaduras sean consideradas " levaduras de desperdicio ", que afectan negativamente al vino, las investigaciones muestran que su expresión enológica puede ser modulada combinándolas con levaduras *Saccharomyces*. Cuando se fermenta con cultivos mixtos, se observa la producción/reducción de acetaldehído, acetoina y aldehídos y variaciones significativas en la producción de ésteres y de acetato de etilo (Domizio *et al.*, 2011).

Respecto a los alcoholes superiores, la producción aumentada de 2-Feniletanol (compuesto asociado a aromas agradables), ha sido descrita como una característica de *M. pulcherrima* (Clemente-Jiménez et al., 2004), *L. thermotolerans* (Becker Whiteneretal, 2015), y *C. zemplinina* (Andorrà et al., 2010).

En cuanto a los etil ésteres, la producción de caprilato de etilo es característica de *T. delbrueckii* (Viana et al., 2008). El perfil de aroma de la levadura recién descubierta *Kazachstania gamospora* mostró que esta especie produjo más ésteres que la cepa control de la levadura *S. cerevisiae*, pero especialmente de feniletil propionato un éster deseado en los vinos debido a su aroma floral. (Beckner et al., 2015).

Otros estudios han mostrado que *Saccharomyces* se esfuerza por coexistir con levaduras no-*Saccharomyces* durante las fermentaciones naturales. De hecho, los aspectos negativos de no-*Saccharomyces* son inhibidos por las cepas de *Saccharomyces* (Comitini et al., 2011).

El empleo de cultivos mixtos de levaduras seleccionadas no-*Saccharomyces* con las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* representa una alternativa tanto a fermentaciones de vino espontáneas como a inoculadas, aprovechando el papel potencial positivo que la levadura no-*Saccharomyces* juega en las características organolépticas del vino. En este contexto, los cultivos mixtos pueden tener una demanda creciente de cepas de levadura de vino nuevas y mejoradas adaptadas a tipos diferentes y estilos de vino.

2. OBJETIVOS

Este proyecto se encuentra englobado en uno de mayor amplitud en el que se desea valorar la contribución y el potencial de levaduras seleccionadas del género *Saccharomyces cerevisiae* (*Saccharomyces cerevisiae* 22H) y no-*Saccharomyces* (*Torulaspora delbrueckii* 58E) en cultivos mixtos con inoculación secuencial, en vinos elaborados a partir de las variedades de uva Merlot, Garnacha y Cabernet Sauvignon.

El objetivo de este trabajo es caracterizar químicamente la síntesis de compuestos aromáticos por las levaduras seleccionadas a partir de mostos de las variedades Cabernet Sauvignon, Merlot y Garnacha.

Así, el objetivo específico es evaluar el perfil aromático de los vinos tintos elaborados con las distintas variedades y con las dos levaduras seleccionadas, para poder identificar si los cultivos mixtos con *Saccharomyces* y no-*Sacharomyces* mejoran las características organolépticas de los vinos.

3. MATERIALY MÉTODOS

3.1. MATERIA PRIMA

3.1.1. Uva

Para la realización de este estudio se emplearon las variedades de uva tintas Merlot, Garnacha y Cabernet-Sauvignon, las cuales, procedían de los viñedos de la D.O Pago Chozas Carrascal, situada en San Antonio de Requena (Valencia), de la vendimia del año 2019.

Los racimos fueron vendimiados de forma tradicional (manual) en el mes de septiembre de 2019. La uva fue transportada con cajas con un peso aproximado de 10-15 kilogramos desde la propiedad hasta la bodega del Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (IIAD) de la UPV. El motivo del transporte en cajas con un peso acotado se debe a que

de esta forma se evita de forma considerable el aplastamiento y posterior mosteo de las uvas en la propia caja ya que interesa que la uva llegue íntegra a la bodega.

Una vez en la bodega de la UPV, los racimos de las cajas recibidas fueron seleccionados al azar para introducirlos en nuevas cajas con un peso similar en todas ellas para de esta forma eliminar el efecto cepa y asegurar que en cada depósito de fermentación hubiera un volumen de mosto semejante. Con esta selección aleatoria también se consigue eliminar restos de hojas y realizar el destrío de racimos con botrytis.

3.1.2 Levaduras

Se emplearon las cepas 58E de *Torulaspota delbrueckii* y 22H de *Saccharomyces cerevisiae*, aisladas previamente a partir de vinificaciones anteriores de mostos Cabernet-Sauvignon, Garnacha y Merlot, de la bodega Chozas Carrascal y seleccionadas en base a sus características fisiológicas y metabólicas. Además, se elaboró un vino control mediante una vinificación con la microbiota autóctona de los mostos.

Las cepas fueron identificadas y seleccionadas en estudios anteriores, 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.

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. Este proceso también lo llevó a cabo el departamento de Microbiología de la Universitat de València.

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 (Figura 2), en la Universitat Politècnica de València, según el esquema representado en la Figura 3.

En primer lugar, se distribuyeron las cajas con las uvas y se fueron seleccionando racimos sanos al azar de las cajas para colocarlos en otras cajas y de esta forma eliminar el efecto cepa para que el mosto tuviese unas características lo más homogéneas posibles en todos los depósitos.

Las uvas se despallaron y estrujaron. Cada depósito de acero inoxidable se llenó con 35-38L de vendimia estrujada. Se adicionó 4 g/hL de anhídrido sulfuroso (SO₂), que tiene función antioxidante y antimicrobiana.

Las características fisicoquímicas de estos mostos (Tabla 2) se determinaron mediante los métodos oficiales de la OIV (2019). El grado Brix se midió por refractometría utilizando un refractómetro portátil VWR International. El pH se midió con un pHmetro HANNA HI8424.

Tabla 2. Características fisicoquímicas de los mostos.

Mostos	Acidez total	Grado Brix	pH
Merlot	5.1	24.45	3.73
Garnacha	6	24.24	3.46
Cabernet-Sauvignon	7.5	26.22	3.42

Los ensayos realizados con cada una de las tres variedades de uva fueron:

1. Control: vinificación realizada con la microbiota autóctona del mosto.
2. Vinificación realizada con la cepa 22H de *S. cerevisiae* exclusivamente.
3. Vinificación secuencial con la cepa 58E de *Torulaspora delbrueckii* y la cepa 22H de *S. cerevisiae* inoculada 24 horas más tarde que la primera.



Figura 2. Depósitos de acero inoxidable utilizados en las experiencias y situados en la planta piloto del Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo, Universitat Politècnica de València.

Todas las vinificaciones se realizaron por triplicado, de forma que se elaboraron nueve vinos para cada una de las tres variedades de uva. Se realizaron por tanto 27 vinificaciones en depósitos dotados de camisas de frío para controlar la temperatura de fermentación a 25°C.

Seguidamente se procedió a la inoculación de las levaduras correspondientes en cada depósito por parte del departamento de Microbiología del laboratorio ENOLAB de la Universitat de València. Las concentraciones finales de las levaduras en los mostos recién inoculados fueron de 4×10^6 UFC/mL para el caso de la cepa *T. delbrueckii* 58E y de 5×10^6 UFC/mL para *S. cerevisiae* 22H. Cuando se sembraron juntas primero se sembró *T. delbrueckii* 58E y tras 24 h *S. cerevisiae* 22H a las concentraciones mencionadas.

Durante la fermentación alcohólica, que duró 15 días, se realizaron bazuques diarios para favorecer el contacto de los hollejos con el mosto y con las levaduras. Diariamente se realizó un

seguimiento de temperatura y densidad, para comprobar que la fermentación se estaba llevando a cabo correctamente.

Una vez terminada la fermentación alcohólica, el vino se prensó en una prensa hidráulica y 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 vinos y se le añadió metabisulfito potásico en polvo ($K_2S_2O_5$) a razón de 50 g/hL, para asegurar su conservación en botella 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.

3.3. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CONVENCIONALES

La determinación de los parámetros convencionales se ha realizado siguiendo los métodos que se recogen en el Reglamento Oficial de la Unión Europea (OIV, 1979). Se determinó acidez total y volátil, grado alcohólico y pH.

3.4. ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES

3.4.1 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 $(NH_4)_2SO_4$
- 2,7 mL de vino (introducidos con pipeta)
- 6,3 mL de agua miliQ (con pipeta)
- 0,25 mL de diclorometano CH_2Cl_2 (con jeringuilla de plástico de 1 mL)
- 40 μ L de patrón interno (con jeringuilla de vidrio de 50 μ 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.

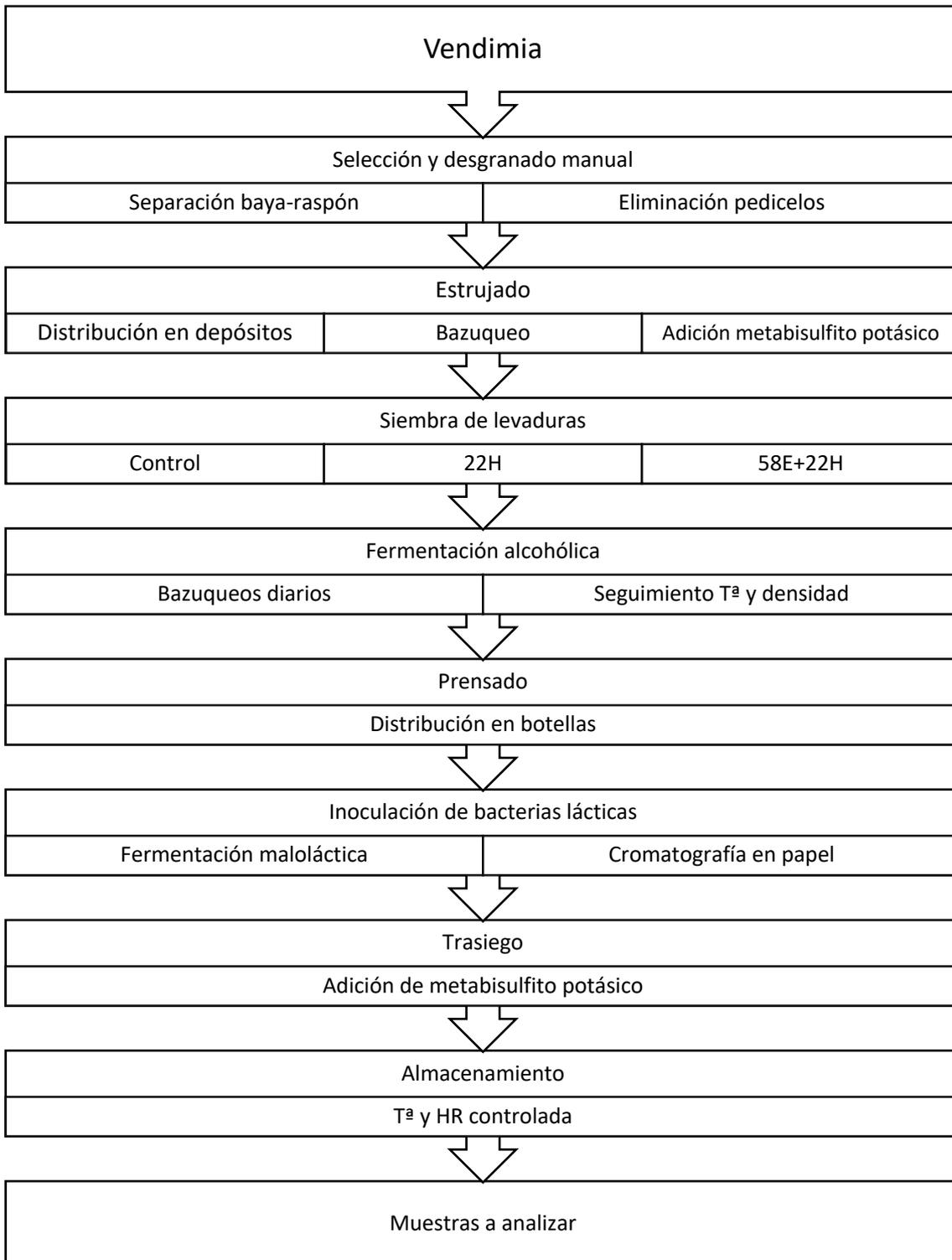


Figura 3. Diagrama de flujo del proceso de elaboración de los vinos tintos.

3.4.2 Análisis cromatográfico

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

Las condiciones de trabajo fueron:

- Temperatura del inyector y detector de 270°C

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

El procedimiento consiste en pinchar un patrón con concentraciones conocidas de los compuestos, y un patrón interno para posteriormente pinchar las muestras, de modo que, a partir de las áreas de los picos del cromatógrafo, se obtiene la concentración de cada compuesto volátil en mg/L. Relación Split de 1:25 (cantidad de muestra que se va a introducir en la columna).

3.4.3 Tratamiento estadístico

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

El análisis de Componentes Principales (PCA) se realizó con el programa SIMCA. El PCA es una herramienta que permite explicar gráficamente la mayor parte de la variación existente entre los datos. 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.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La contribución aromática de la etapa fermentativa ha sido estudiada desde diversas perspectivas, identificando aquellas variables que más influyen en la producción de aromas, comparando rendimientos entre distintas cepas en mostos específicos (Regodón et al., 2006) e interacciones de éstas durante la fermentación alcohólica (Fleet, 2003).

Como ya se ha comentado, en los aromas fermentativos, se distingue entre aromas sintetizados por la levadura, y aromas revelados a partir de precursores no aromáticos por la levadura. Los primeros, son sintetizados a través del metabolismo de la levadura a partir de nutrientes presentes en el mosto y después liberados en el medio. Los segundos, son liberados por procesos de hidrólisis enzimática por acción de la levadura a partir de precursores presentes en el mosto en forma no-volátil, al estar unidos a moléculas de gran tamaño. Estos últimos dependen principalmente de la variedad de uva utilizada para la elaboración del vino, por lo que también forman parte del aroma varietal (Regodón et al., 2006).

Los resultados del análisis ANOVA de los compuestos aromáticos con el factor levadura durante la fermentación se muestran en las Tablas 4 y 5 y 6. Se identificaron un total de 32 compuestos pertenecientes a diferentes familias: aldehídos, ésteres, ácidos, alcoholes y lactonas; con el fin de estudiar el efecto de los diferentes sistemas de elaboración. Tal y como se observa en las tablas, hay un efecto significativo de la levadura *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* en cultivo puro o mixto utilizada en la fermentación, sobre la concentración de la mayoría de los compuestos volátiles analizados en los vinos tintos elaborados.

Diferentes estudios muestran que la contribución al aroma del vino es más bien por familias de odorantes que por compuestos individuales. El efecto de cada componente de una familia de aromas, como por ejemplo las lactonas, es aditivo o sinérgico, por lo que, aunque

individualmente su valor de aroma sea inferior a uno, la suma lo supera a veces claramente. Como el aroma de los compuestos de una misma familia normalmente es igual o similar, y diferente al del aroma base, el resultado es que en el vino puede percibirse la nota aromática característica de la familia. Es por ello por lo que, para analizar mejor el efecto del tipo de levadura utilizada para fermentar los vinos, se ha realizado también un estudio atendiendo a las diferentes familias de compuestos aromáticos (Cacho, 2012). 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. EFECTO DEL TIPO DE LEVADURA SOBRE LOS PARÁMETROS GENERALES DEL VINO

En la Tabla 3 se presentan los valores medios, desviación estándar y ANOVA de los parámetros generales analizados en los vinos tintos elaborados con las levaduras ensayadas a partir de las variedades Merlot, Cabernet y Garnacha.

Los resultados muestran que las diferentes levaduras ensayadas para realizar la fermentación alcohólica, no afectan significativamente al grado alcohólico ni a la acidez volátil del vino, tanto en Merlot como en Cabernet y Garnacha.

Sin embargo, hay un efecto significativo sobre la acidez total en Merlot y Garnacha, que es menor en los vinos Control.

Tabla 3. Efecto de la levadura de fermentación sobre los parámetros generales de los vinos.

Levadura	MERLOT			CABERNET			GARNACHA		
	Control	22H	22H + 58E	Control	22H	22H + 58E	Control	22H	22H + 58E
Acidez volátil	0,56 ± 0,02 a	0,68 ± 0,07 a	0,44 ± 0,06 a	0,47 ± 0,06 a	0,4 ± 0,14 a	0,63 ± 0,13 b	0,5 ± 0,05 a	0,48 ± 0,03 a	0,45 ± 0,03 a
Acidez total	5,12 ± 0,11 a	5,95 ± 0,19 b	5,6 ± 0,27 ab	6,22 ± 0,00 a	6,17 ± 0,04 a	6,17 ± 0,04 a	5,52 ± 0,15 a	5,8 ± 0,08 b	5,6 ± 0,13 ab
pH	3,8 ± 0,02 a	3,75 ± 0,02 a	3,75 ± 0,03 a	3,60 ± 0,01 a	3,71 ± 0,04 b	3,65 ± 0,04 ab	3,7 ± 0,05 a	3,66 ± 0,02 a	3,66 ± 0,03 a
°A	13,41 ± 0,55 a	13,31 ± 0,14 a	13,1 ± 0,22 a	14,67 ± 0,41 a	14,47 ± 0,32 a	14,4 ± 0,30 a	13,83 ± 0,15 a	13,93 ± 0,15 a	13,86 ± 0,05 a

4.2. INFLUENCIA DEL TIPO DE LEVADURA SOBRE EL PERFIL AROMÁTICO DEL VINO

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.

4.2.1 Ácidos

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

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

Como se aprecia en las Tablas 4, 5 y 6, la levadura 22H es la que mayor cantidad de ácidos totales produce, tanto en la variedad Cabernet como Garnacha, mientras que en la variedad Merlot la concentración de ácidos es prácticamente la misma en todos los vinos independientemente de las levaduras que realizan la fermentación.

Hay que resaltar que, aunque la suma total de los ácidos no supera la concentración mínima de 20 mg/L que puede suponer aromas desagradables, hay algunos compuestos que independientemente de la variedad de uva y de la levadura utilizadas en la vinificación, se encuentran por encima del umbral de percepción, es el caso del ácido butírico, ácido hexanoico y ácido octanoico que aportan aromas rancios y queso.

Tabla 4. Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos volátiles (mg/L) de los vinos elaborados de Merlot con diferentes levaduras (Vinificación Control, Vinificación con *S. cerevisiae* 22H; vinificación secuencial con *T. delbrueckii* 58E y *S. cerevisiae*).

Grupo	Compuesto aromático	Umbral percepción (mg/L)	Aroma descriptor	Control	22H	22H + 58E
				Concentración ± DS (mg/L)		
Ácidos	Ac.isobutírico	2,3	Rancio, queso	1,49 ± 0,30 b	1,27 ± 0,28 ab	1,07 ± 0,07 a
	Ac.butírico	0,173	Rancio, queso	0,91 ± 0,16 a	1,68 ± 0,40 b	0,93 ± 0,30 a
	Ac.isopentanoico	No encontrado	No encontrado	3,65 ± 0,77 b	2,53 ± 0,31 a	3,44 ± 0,07 b
	Ac.hexanoico	0,42	Rancio, queso, graso	2,69 ± 0,17 a	2,84 ± 0,47 a	2,93 ± 0,17 a
	Ac.2 etil hexanoico	No encontrado	Herbáceo	0,21 ± 0,03 b	0,26 ± 0,07 b	0,12 ± 0,01 a
	Ac.octanoico	0,5	Queso	2,57 ± 0,54 a	2,69 ± 0,71 a	2,71 ± 0,34 a
	Ac.decanoico	1	Rancio, queso	0,79 ± 0,15 a	0,68 ± 0,27 a	1,19 ± 0,24 b
	Total	-	-	12,31	11,95	12,39
Alcoholes	1 propanol	306	Alcohol, fruta madura	7,25 ± 0,42 a	7,39 ± 0,89 a	7,00 ± 3,34 a
	Alcohol isoamílico	30	Alcohol, whiskey	307,37 ± 59,00 b	251,35 ± 19,05 a	170,50 ± 22,34 a
	Cis-3hexenol	0,4	Herbáceo	0,33 ± 0,04 b	0,17 ± 0,04 a	0,56 ± 0,02 c
	1-heptanol	1	Frutal, dulce	0,15 ± 0,02 b	0,12 ± 0,01 b	0,05 ± 0,05 a
	2,3-butanodiol	120	Mantequilla	1,44 ± 0,10 a	1,95 ± 0,10 b	2,21 ± 0,05 c
	Alcohol benzílico	10	Almendra	1,45 ± 0,18 b	0,98 ± 0,16 a	1,17 ± 5,56 a
	2-fenil etanol	14	Rosa, lila, polen	208,24 ± 65,32 b	158,58 ± 24,06 a	147,99 ± 5,56 a
	Total	-	-	526,23	420,54	329,48
Aldehidos	Acetaldehído	0,5	Manzana, herbáceo	0,20 ± 0,05 a	0,26 ± 0,01 b	0,23 ± 0,03 ab
	Total	-	-	0,20	0,26	0,23
Ésteres	Acetato de metilo	No encontrado	No encontrado	0,72 ± 0,10 a	0,85 ± 0,30 a	1,11 ± 0,48 a
	Acetato de etilo	7,5	Frutal, disolvente	0,32 ± 0,15 b	0,14 ± 0,03 a	0,21 ± 0,01 ab
	Acetato de isobutilo	No encontrado	Disolvente	n.d.	n.d.	n.d.
	Butirato de etilo	0,02	Manzana, fresa	0,36 ± 0,05 a	0,33 ± 0,12 a	0,42 ± 0,02 a
	Isovalierato de etilo	No encontrado	No encontrado	n.d.	n.d.	0,01 ± 0,02 a
	Hexanoato de etilo	0,014	Manzana, fresa, piña	0,31 ± 0,04 a	0,47 ± 0,01 b	0,30 ± 0,03 a
	Acetato de exilo	0,67	Manzana, pera	n.d.	n.d.	n.d.
	Lactato de etilo	155	Lácteo, fresa	13,52 ± 2,74 b	10,28 ± 0,21 a	10,93 ± 0,38 a
	Octanoato de etilo	0,005	Piña, floral,, fresa	0,23 ± 0,05 b	0,24 ± 0,01 b	0,13 ± 0,01 a
	Decanoato de etilo	0,2	Fruta, miel	0,45 ± 0,03 a	0,55 ± 0,05 b	0,66 ± 0,07 c
	Succinato de dietilo	200	Caramelo	0,61 ± 0,06 a	0,61 ± 0,08 a	0,65 ± 0,08 a
	Dietil glutarato	No encontrado	No encontrado	0,25 ± 0,02 b	0,34 ± 0,04 c	0,11 ± 0,01 a
	2-feniletilacetato	0,25	Rosa, miel	0,63 ± 0,11 b	0,37 ± 0,07 a	0,43 ± 0,04 a
	Total	-	-	17,40	14,18	14,96
Lactonas	γ butirolactona	0,035	Coco, ciruela, caramelo	7,87 ± 0,86 a	10,22 ± 0,64 b	8,64 ± 0,55 a
	α ionona	0,0026	Violeta	0,35 ± 0,13 b	0,11 ± 0,07 a	0,39 ± 0,09 b
	Total	-	-	8,22	10,33	9,03

Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Referencias: 1Culleré et al., 2004; 2Englezos et al., 2018; 3Ferreira et al., 2000; 4Francis, 2013; 5Gambetta et al., 2014; 6Hu et al., 2018; 7 Jiang y Zhang, 2010; 8Lambert, 2017; 9Marcon et al., 2018; 10Vilanova y Oliveira, 2012; 11Zea et al., 2001.

Tabla 5. Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos volátiles (mg/L) de los vinos elaborados de Cabernet con diferentes levaduras (Vinificación Control, Vinificación con *S.cerevisiae* 22H; vinificación secuencial con *T. delbrueckii* 58E y *S. cerevisiae*).

Grupo	Compuesto aromático	Umbral percepción (mg/L)	Aroma descriptor	Control	22H	22H + 58E
				Concentración ± DS (mg/L)		
Ácidos	Ac.isobutírico	2,3	Rancio, queso	1,02 ± 0,19 ab	1,16 ± 0,16 b	0,95 ± 0,01 a
	Ac.butírico	0,173	Rancio, queso	1,97 ± 0,14 a	1,77 ± 0,45 a	2,22 ± 0,60 a
	Ac.isopentanoico	No encontrado	No encontrado	4,50 ± 0,53 b	4,87 ± 0,88 b	3,39 ± 0,56 a
	Ac.hexanoico	0,42	Rancio, queso, graso	3,27 ± 0,54 a	4,93 ± 1,25 b	3,64 ± 0,79 a
	Ac.2 etil hexanoico	No encontrado	Herbáceo	0,23 ± 0,01 c	0,06 ± 0,01 a	0,17 ± 0,01 b
	Ac.octanoico	0,5	Queso	2,52 ± 0,62 a	4,01 ± 1,09 b	2,78 ± 0,77 a
	Ac.decanoico	1	Rancio, queso	0,65 ± 0,19 a	0,79 ± 0,02 a	0,66 ± 0,05 a
	Total	-	-	14,16	17,59	13,81
Alcoholes	1 propanol	306	Alcohol, fruta madura	10,22 ± 0,11 a	9,24 ± 0,75 a	10,42 ± 1,57 a
	Alcohol isoamílico	30	Alcohol, whiskey	331,48 ± 16,76 b	264,95 ± 94,71 ab	206,86 ± 53,70 a
	cis-3hexenol	0,4	Herbáceo	0,26 ± 0,02 b	0,09 ± 0,05 a	0,78 ± 0,09 c
	1-heptanol	1	Frutal, dulce	0,20 ± 0,05b	0,20 ± 0,01 b	0,11 ± 0,03 a
	2,3-butanodiol	120	Mantequilla	1,45 ± 0,22 a	1,55 ± 0,25 a	2,33 ± 0,28 b
	Alcohol benzílico	10	Almendra	0,78 ± 18,52 a	1,08 ± 0,22 b	0,80 ± 0,10 a
	2-fenil etanol	14	Rosa, lila, polen	187,52 ± 18,52 b	166,46 ± 34,39 ab	148,09 ± 18,26 a
	Total	-	-	531,91	443,57	369,39
Aldehídos	Acetaldehido	0,5	Manzana, herbáceo	0,20 ± 0,02 a	0,21 ± 0,01 a	0,31 ± 0,07 b
	Total	-	-	0,200	0,21	0,31
Ésteres	Acetato de metilo	No encontrado	No encontrado	0,90 ± 0,04 ab	1,01 ± 0,17 b	0,80 ± 0,17 a
	Acetato de etilo	7,5	Frutal, disolvente	n.d.	0,23 ± 0,04 a	0,24 ± 0,03 a
	Acetato de isobutilo	No encontrado	Disolvente	n.d.	n.d.	n.d.
	Butirato de etilo	0,02	Manzana, fresa	0,48 ± 0,14 a	0,69 ± 0,16 b	0,52 ± 0,20 ab
	Isovalierato de etilo	No encontrado	No encontrado	n.d.	n.d.	n.d.
	Hexanoato de etilo	0,014	Manzana, fresa, piña	0,548 ± 0,12 ab	0,72 ± 0,24 b	0,50 ± 0,12 a
	Acetato de hexilo	0,67	Manzana, pera	0,21 ± 0,03 a	0,29 ± 0,10 b	0,20 ± 0,01 a
	Lactato de etilo	155	Lácteo, fresa	3,20 ± 0,40 a	3,71 ± 0,11 a	3,62 ± 1,77 a
	Octanoato de etilo	0,005	Piña, floral,, fresa	0,19 ± 0,05 a	0,26 ± 0,15 a	0,22 ± 0,01 a
	Decanoato de etilo	0,2	Fruta, miel	0,56 ± 0,18 a	0,90 ± 0,11 b	0,86 ± 0,09 b
	Succinato de dietilo	200	Caramelo	0,39 ± 0,05 a	0,42 ± 0,11 a	0,37 ± 0,06 a
	Dietil glutarato	No encontrado	No encontrado	0,44 ± 0,01 ab	0,53 ± 0,17 b	0,37 ± 0,01 a
	2-feniletacetato	0,25	Rosa, miel	0,44 ± 0,06 a	0,46 ± 0,07 a	0,69 ± 0,08 b
Total	-	-	7,35	9,22	8,39	
Lactonas	γ butirolactona	0,035	Coco, ciruela, caramelo	8,45 ± 0,82 a	9,34 ± 0,37 b	8,20 ± 0,63 a
	α ionona	0,0026	Violeta	0,26 ± 0,10 a	0,42 ± 0,10 b	0,38 ± 0,05 b
	Total	-	-	8,71	9,76	8,58

Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Referencias: 1Culleré et al., 2004; 2Englezos et al., 2018; 3Ferreira et al., 2000; 4Francis, 2013; 5Gambetta et al., 2014; 6Hu et al., 2018; 7Jiang y Zhang, 2010; 8Lambert, 2017; 9Marcon et al., 2018; 10Vilanova y Oliveira, 2012; 11Zea et al., 2001.

Tabla 6. Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos volátiles (mg/L) de los vinos elaborados de Garnacha con diferentes levaduras (Vinificación Control, Vinificación con *S. cerevisiae* 22H; vinificación secuencial con *T. delbrueckii* 58E y *S. cerevisiae*).

Grupo	Compuesto aromático	Umbral percepción (mg/L)	Aroma descriptor	Control	22H	22H + 58E
				Concentración ± DS (mg/L)		
Ácidos	Ac.isobutírico	2,3	Rancio, queso	1,01 ± 0,04 b	0,93 ± 0,05 a	0,92 ± 0,05 a
	Ac.butírico	0,173	Rancio, queso	0,61 ± 0,03 c	0,36 ± 0,02 a	0,40 ± 0,02 b
	Ac.isopentanoico	No encontrado	No encontrado	3,43 ± 0,57 a	6,11 ± 0,49 c	4,79 ± 0,18 b
	Ac.hexanoico	0,42	Rancio, queso, graso	3,85 ± 2,24 a	4,40 ± 0,42 a	3,50 ± 0,25 a
	Ac.2 etil hexanoico	No encontrado	Herbáceo	0,17 ± 0,05 a	0,45 ± 0,05 b	0,18 ± 0,03 a
	Ac.octanoico	0,5	Queso	2,27 ± 0,28 a	3,33 ± 0,16 b	4,65 ± 0,79 c
	Ac.decanoico	1	Rancio, queso	0,66 ± 0,04 a	0,84 ± 0,02 c	0,80 ± 0,02 b
	Total	-	-	12,00	16,42	15,24
Alcoholes	1 propanol	306	Alcohol, fruta madura	5,48 ± 0,33 c	3,58 ± 0,62 a	4,37 ± 0,68 b
	Alcohol isoamílico	30	Alcohol, whiskey	268,63 ± 15,50 a	256,42 ± 108,37 a	282,45 ± 38,79 a
	cis-3hexenol	0,4	Herbáceo	0,27 ± 0,06 a	0,66 ± 0,15 c	0,48 ± 0,13 b
	1-heptanol	1	Frutal, dulce	0,19 ± 0,01 a	0,28 ± 0,01 c	0,23 ± 0,01 b
	2,3-butanodiol	120	Mantequilla	1,84 ± 0,18 a	2,92 ± 0,51 b	2,26 ± 0,32 a
	Alcohol benzílico	10	Almendra	0,62 ± 0,05 a	1,31 ± 0,31 b	0,73 ± 0,12 a
	2-fenil etanol	14	Rosa, lila, polen	164,63 ± 8,56 a	236,5 ± 54,84 b	206,79 ± 26,11 ab
	Total	-	-	441,66	501,67	497,31
Aldehídos	Acetaldehido	0,5	Manzana, herbáceo	0,16 ± 0,07 a	0,20 ± 0,01 ab	0,23 ± 0,01 b
	Total	-	-	0,16	0,20	0,23
Ésteres	Acetato de metilo	No encontrado	No encontrado	0,59 ± 0,06 a	0,81 ± 0,11 b	1,06 ± 0,16 c
	Acetato de etilo	7,5	Frutal, disolvente	0,28 ± 0,05 b	0,34 ± 0,02 c	0,22 ± 0,01 a
	Acetato de isobutilo	No encontrado	Disolvente	n.d.	n.d.	n.d.
	Butirato de etilo	0,02	Manzana, fresa	0,23 ± 0,04 a	0,47 ± 0,17 b	0,67 ± 0,14 c
	Isovalierato de etilo	No encontrado	No encontrado	n.d.	n.d.	n.d.
	Hexanoato de etilo	0,014	Manzana, fresa, piña	0,48 ± 0,26 a	0,70 ± 0,11 b	0,63 ± 0,01 ab
	Acetato de hexilo	0,67	Manzana, pera	0,26 ± 0,06 a	0,53 ± 0,15 b	0,32 ± 0,02 a
	Lactato de etilo	155	Lácteo, fresa	15,12 ± 4,83 a	12,15 ± 0,53 a	13,56 ± 1,16 a
	Octanoato de etilo	0,005	Piña, floral, fresa	0,15 ± 0,05 a	0,26 ± 0,04 b	0,35 ± 0,03 c
	Decanoato de etilo	0,2	Fruta, miel	0,41 ± 0,04 a	1,56 ± 0,20 c	0,71 ± 0,04 b
	Succinato de dietilo	200	Caramelo	0,83 ± 0,07 b	0,70 ± 0,02 a	0,65 ± 0,03 a
	Dietil glutarato	No encontrado	No encontrado	0,31 ± 0,11 a	0,46 ± 0,04 b	0,30 ± 0,11 a
	2-feniletacetato	0,25	Rosa, miel	0,47 ± 0,04 a	0,54 ± 0,06 a	0,56 ± 0,07 a
	Total	-	-	19,13	18,52	19,03
Lactonas	γ butirolactona	0,035	Coco, ciruela, caramelo	10,80 ± 1,15 a	11,78 ± 1,88 a	11,09 ± 0,66 a
	α ionona	0,0026	Violeta	0,35 ± 0,04 a	0,44 ± 0,07 b	0,28 ± 0,07 a
	Total	-	-	11,15	12,22	11,37

Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Referencias: 1Culleré et al., 2004; 2Englezos et al., 2018; 3Ferreira et al., 2000; 4Francis, 2013; 5Gambetta et al., 2014; 6Hu et al., 2018; 7Jiang y Zhang, 2010; 8Lambert, 2017; 9Marcon et al., 2018; 10Vilanova y Oliveira, 2012; 11Zea et al., 2001.

4.2.2 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 400-500 mg/L, pudiendo enmascarar los aromas aportados por los ésteres; o cuando superan su umbral de percepción (Zhang *et al.*, 2018).

En cambio, cuando la concentración total de alcoholes está por debajo de los 300 mg/L, 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).

La síntesis de alcoholes superiores depende de la cepa de la levadura y es función de las concentraciones de nitrógeno amínico y de nitrógeno amoniacal. En general, los factores que favorecen el crecimiento celular de las levaduras estimulan la producción de alcoholes superiores (González., *et al.*, 2010).

Como se aprecia en las Tablas 4 5 y 6, tanto en la variedad Merlot como en Cabernet el vino Control presenta mayor concentración de alcoholes totales. En la variedad Garnacha ocurre lo contrario, los vinos fermentados con la cepa 22H y los inoculados con el cultivo mixto presentan mayor concentración que el vino Control.

En los vinos elaborados con las tres variedades de uva y la diferente inoculación de levaduras, el contenido total de alcoholes se encuentra en el límite del umbral de percepción que aportan aromas desagradables.

De todos los alcoholes determinados, solamente el alcohol isoamílico, cis 3 hexenol y 2 feniletanol, se encuentran en los vinos por encima del umbral de percepción. El alcohol isoamílico es el compuesto mayoritario en todos los vinos analizados, seguido del 2 feniletanol.

En la familia 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 (Cedrón-Fernández, 2004; Díaz-Plaza Martín-Lorente *et al.*, 2002). Se observa que en el vino Control elaborado a partir de las variedades Merlot y Cabernet se produce un aumento significativo de 2 fenil etanol, en la variedad Garnacha este aumento se produce con la cepa 22H.

4.2.3 Aldehídos

Los aldehídos dotan a los vinos de perfiles no deseables cuando se encuentran por encima de su umbral de percepción. El acetaldehído constituye más del 90 % del contenido total de aldehídos, por ello se considera el aldehído de mayor importancia desde el punto de vista de su influencia en el aroma (Hernández *et al.*, 2015).

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

Como se observa en las Tablas 4 5 y 6, en ninguno de los vinos elaborados con las diferentes variedades de uva y levaduras, se supera el umbral de percepción del acetaldehído, con lo cual se espera que aporte aromas agradables al vino.

En las variedades Merlot y Cabernet, los vinos obtenidos en el ensayo de inoculación mixta de las cepas 58E+22H presentan un aumento significativo de este compuesto mientras que en los vinos de Cabernet este efecto se produce con la levadura 22H.

4.2.4 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).

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

Como se aprecia en las Tablas 4 5 y 6, los vinos elaborados con la variedad Garnacha tiene mayor cantidad de ésteres totales, aunque no se observan diferencias atribuibles al efecto levadura.

En los vinos elaborados a partir de la variedad Cabernet se han encontrado las concentraciones totales más bajas de esterres siendo la cepa 22H la más productora.

Los vinos de la variedad Merlot presentan concentraciones totales de esterres un poco inferiores a las de la variedad Garnacha, siendo el vino control el que presenta el valor más alto.

Finalmente, la concentración de la mayoría de los esterres analizados está influenciada significativamente por la levadura que realiza la fermentación en las condiciones del estudio; esto es importante porque casi todos los compuestos superan el umbral de percepción en los vinos elaborados con todas las cepas y variedades objeto del estudio.

4.2.5 Lactonas

Las lactonas son compuestos volátiles que aportan complejidad al perfil aromático del vino y pueden aportar aromas al vino a frutas de hueso.

En todos los vinos elaborados la concentración de γ -butirolactona y α -ionona superan el umbral de percepción, esto es importante para el perfil aromático del vino ya que la γ -butirolactona, proporciona aromas dulces característicos a coco, ciruela y caramelo, y la α -ionona se relaciona con aromas a violeta.

Todos los resultados obtenidos coinciden con los de otros estudios en los que se afirma que los compuestos volátiles del vino dependen de la cepa de levadura utilizada, pero también de la composición del medio, que está asociada a la variedad de uva (Querol y Fleet, 2006).

4.3 ANÁLISIS DE COMPUESTOS PRINCIPALES

Con la finalidad de agrupar los distintos tipos de vinos en función de los compuestos volátiles presentes en ellos, se ha realizado un análisis de los componentes principales o PCA. Se trata de una técnica que permite la reducción de la dimensión que describe la información de un conjunto de variables más pequeñas, denominadas componentes principales, que son

combinaciones lineales de las variables de partida. De esta manera se puede ver cómo esas variables se distribuyen a lo largo de un plano (Alarcón, 2016).

La primera componente principal es la dirección del espacio que recoge la mayor parte de la variabilidad, una combinación de todas las variables iniciales que se ha tomado para describir el conjunto de datos. 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 resultados (Alarcón, 2016).

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 levaduras utilizadas para la fermentación de los mostos de las variedades Merlot, Cabernet y Garnacha, han permitido la obtención de tres tipos de vinos: vino Control fermentado con levaduras autóctonas, vino fermentado con la cepa 22H pura de *Saccharomyces cerevisiae* y Vino fermentado mediante un cultivo mixto de la cepa 22H (*Saccharomyces cerevisiae*) y la cepa 58E *T. delbrueckii* (no-*Saccharomyces*).

Las Figuras 4, 5 y 6 muestran los gráficos del PCA obtenido: gráfico de las puntuaciones (scores) para los distintas levaduras ensayadas en la fermentación de los vinos, con las tres variedades de uva utilizadas y el gráfico de cargas (loading) por densidad de componentes aromáticos.

En los vinos de Cabernet (Figura 4) en el gráfico de puntuaciones (scores), la PC1 no permite diferenciar los vinos fermentados con las diferentes levaduras ensayadas. Sin embargo la PC2 si que permite separar los vinos Control de los fermentados con las cepas 22H +58E. Observando el gráfico de cargas (loading), se aprecia que los vinos fermentados con el cultivo mixto 22H+58E muestran mayor contenido de ácido butírico, acetaldehído 5 metil furfural, 2-3 butanodiol, 1 propanol 2 fenil etanol, acetato de metilo, y lactato de etilo

Desde el punto de vista de los compuestos volátiles, no se ha podido diferenciar los vinos fermentados con levaduras autóctonas (Control) de los fermentados con la cepa 22H (*S. cerevisiae*), esto podría ser debido a que en la flora autóctona de las uvas de Cabernet se presenta un alto grado de levaduras *Saccharomyces*.

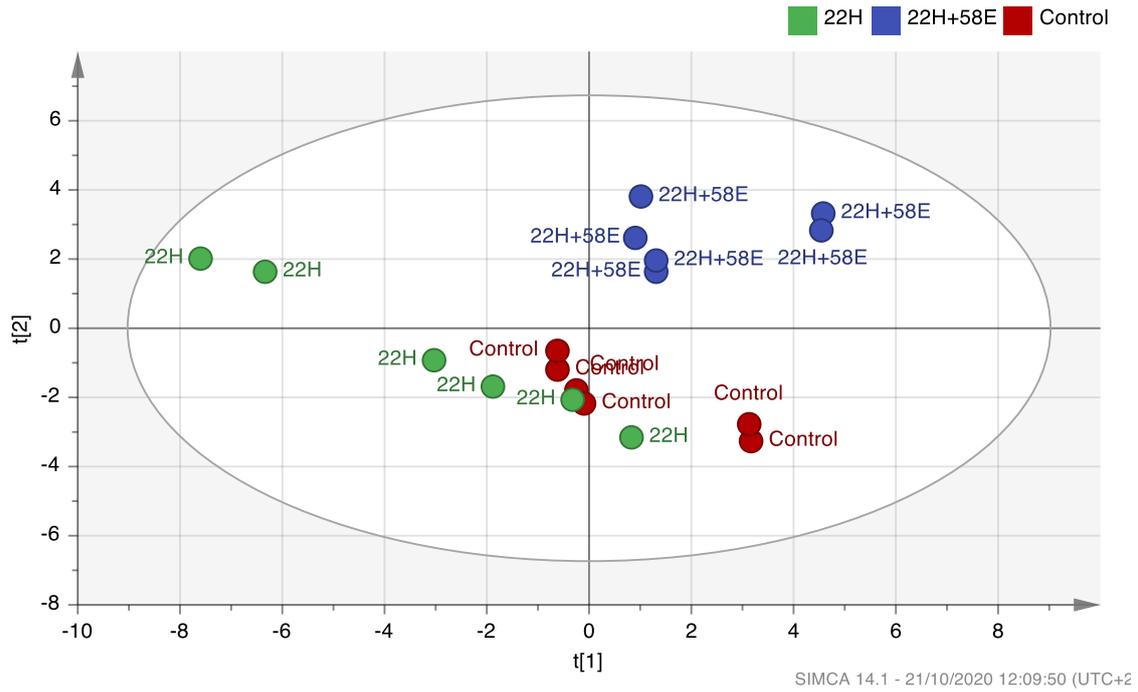
En la Figura 5 se muestran los resultados del PCA de los vinos elaborados a partir de la variedad Garnacha. En el gráfico de scores la PC1, que es la que mejor explica la varianza total, permite diferenciar los vinos Control de los fermentados con la cepa 22H. Observando el gráfico de loadings se aprecia que el vino Control se relaciona con contenidos mayores de lactato de etilo, 1 propanol, ácido butírico, benzaldehído y succinato de etilo. Los vinos fermentados con la cepa 22H se relacionan con los compuestos hexanoato de etilo, dietil glutarato, decanoato de etilo, α -ionona, o acetato de metilo, γ -butirolactona, ácido isobutírico, benzil alcohol.

La PC2 separa claramente el vino procedente de la fermentación con levaduras en cultivo mixto (22H+58E) del vino control y el fermentado únicamente con la cepa 22H. En el gráfico de cargas se observa que las cepas 22H+58E se relacionan con mayor producción de acetaldehído, alcohol isoamílico, ácido octanoico, butirato de etilo, acetato de etilo, 2 feniletacetato, octanoato de etilo.

Los resultados del análisis del PCA realizado con los resultados de los compuestos volátiles obtenidos en los vinos elaborados a partir de la variedad Merlot, se muestran en la Figura 6. En el gráfico de puntuaciones se ve una clara diferenciación de los vinos fermentados solo con *S. cerevisiae* (22H) de los fermentados en cultivo mixto con *S. cerevisiae* y *Torulospira delbrueki* (22H+58E) mediante la PC1. En el gráfico de cargas se aprecia que el vino control presenta mayor concentración de contiene ésteres como el lactato de etilo o el 2 feniletacetato, aldehídos como el benzaldehído, ácidos grasos como el ácido isobutírico y alcoholes superiores como el alcohol isobutírico o el 1 propanol. La cepa 22H se relaciona con mayor producción de aldehídos como el acetaldehído, ácidos como el ácido butírico, ésteres como el hexanoato de etilo y lactonas como la γ -butirolactona.

Por otra parte, la PC2 permite diferenciar el vino control fermentado con las levaduras autóctonas, de los vinos fermentados mediante la siembra de las levaduras ensayadas. El vino control se relaciona con lactato de etilo, ácido isobutírico, benzaldehído, alcohol isoamilico, 2 feniletanol, 2 feniletil acetato y benzilalcohol.

a)



b)

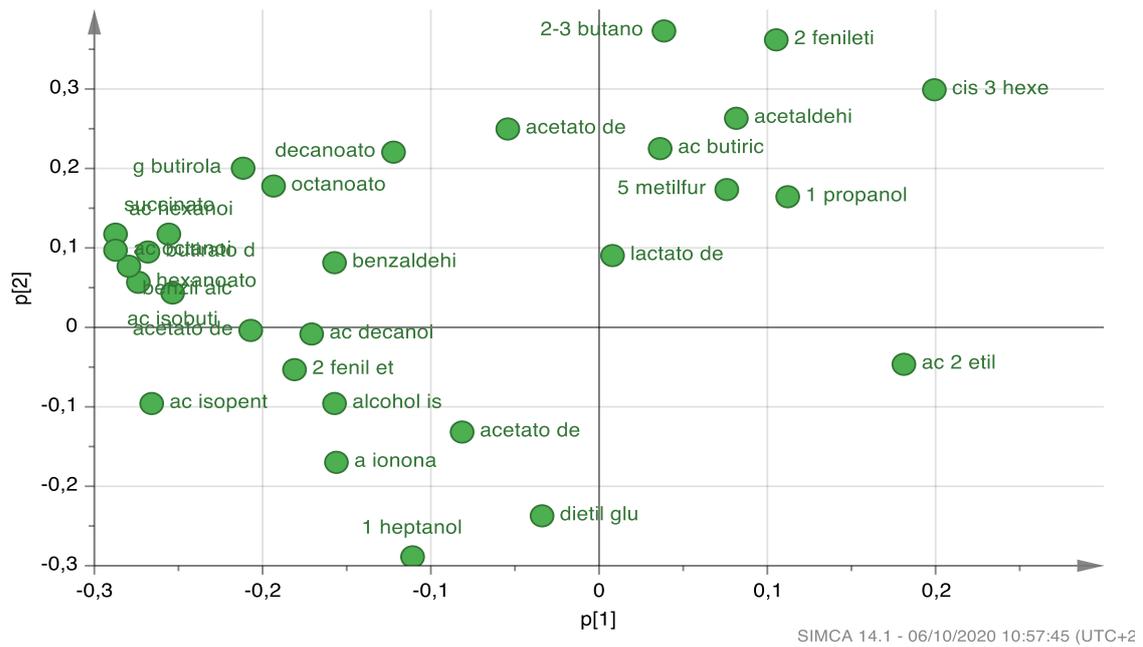
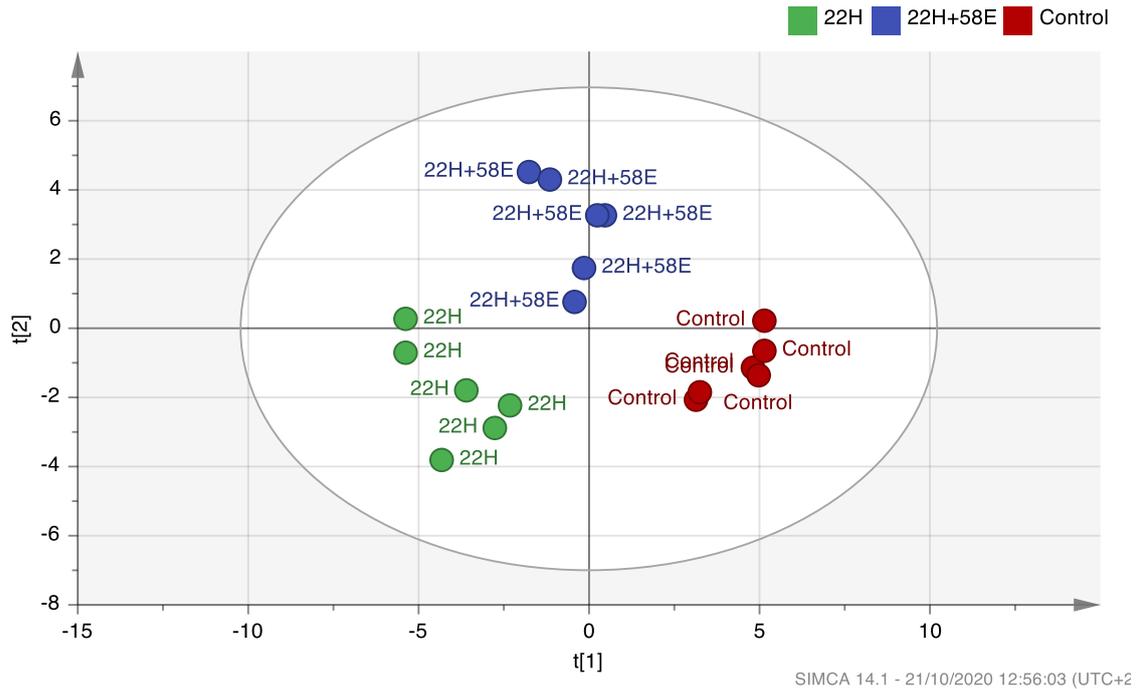


Figura 4. Análisis de Componentes principales (Componente 1 frente a 2) realizado sobre los compuestos volátiles identificados en los vinos de Cabernet fermentados con las levaduras en estudio. a) gráfico de puntuaciones (scores), b) gráfico de cargas (loadings).

a)



b)

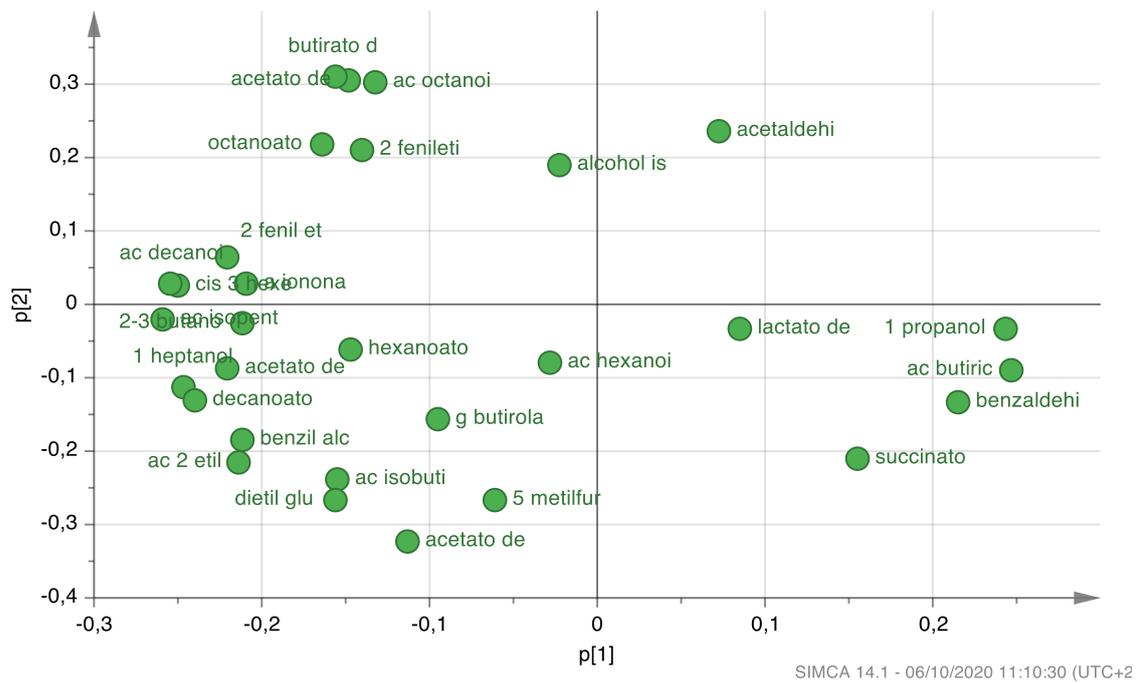
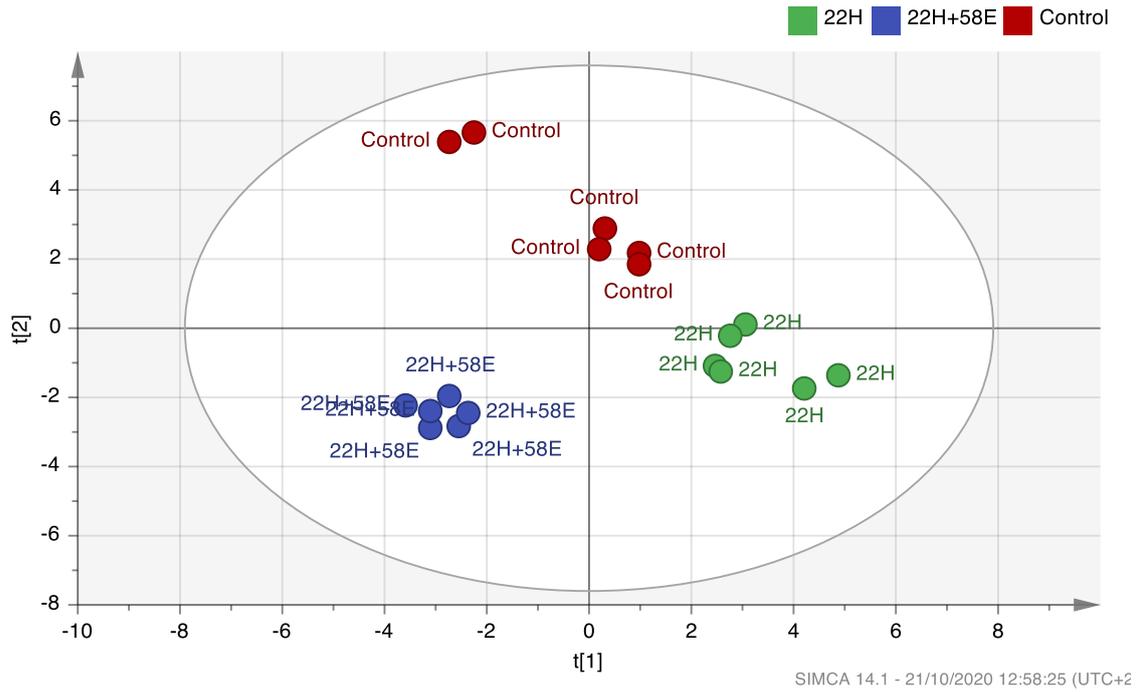


Figura 5. Análisis de Componentes principales (Componente 1 frente a 2) realizado sobre los compuestos volátiles identificados en los vinos de Garnacha fermentados con las levaduras en estudio. a) gráfico de puntuaciones (scores), b) gráfico de cargas (loading).

a)



b)

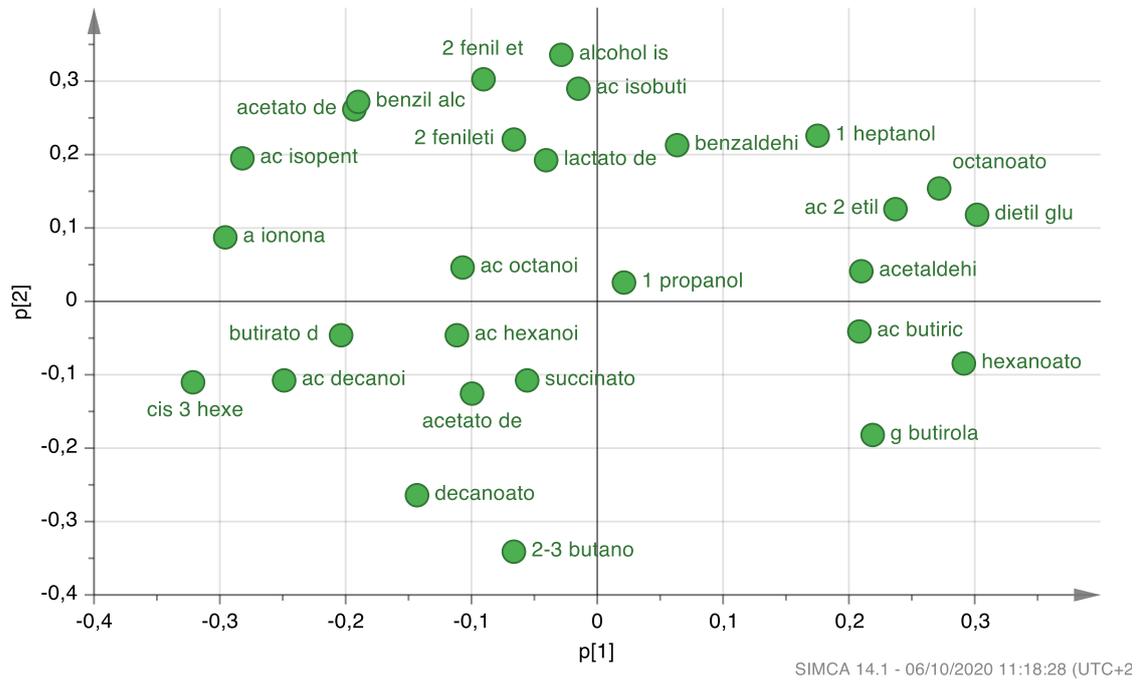


Figura 6. Análisis de Componentes principales (Componente 1 frente a 2) realizado sobre los compuestos volátiles identificados en los vinos de Merlot fermentados con las levaduras en estudio. a) gráfico de puntuaciones (scores), b) gráfico de cargas (loadings).

5. CONCLUSIONES

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

La variedad de uva influye en el desarrollo de las dos levaduras inoculadas *S. cerevisiae* 22H, y *T. delbruekii* 58E, modificando el perfil aromático del vino.

Los resultados muestran que hay un efecto significativo de la levadura sobre las concentraciones de la mayoría de los compuestos volátiles analizados, siendo este efecto diferente dependiendo de la variedad de uva utilizada.

Las concentraciones totales mayores de ácidos se dan en los vinos fermentados en cultivo puro con la cepa 22H en Cabernet y Garnacha, y con el cultivo mixto (22H+58E) en Merlot. El contenido total de alcoholes fue superior en los vinos control en todas las variedades estudiadas.

La concentración total de esteres es semejante en los vinos elaborados con las distintas levaduras y variedad de uva, sin embargo, la concentración de la mayoría de los esteres analizados está influenciada significativamente por la levadura; esto es importante porque casi todos los compuestos superan el umbral de percepción en los vinos elaborados.

El Análisis de componentes principales (PCA) ha permitido diferenciar los vinos de Garnacha y Merlot elaborados con levaduras autóctonas (control), *S. cerevisiae* (22H) en cultivo puro y *S. cerevisiae* (22H) en cultivo mixto con *T. delbruekii*.

En los vinos de Cabernet solo la PC2 ha permitido diferenciar los vinos fermentados con el cultivo mixto (22H+58E) del vino control y el vino fermentado en cultivo puro con la cepa 22H.

Este estudio pone de manifiesto que el empleo de diferentes cepas de levaduras *S. cerevisiae* y *no-Saccharomyces* permite obtener vinos con diferente composición química, así como perfiles sensoriales y aromáticos distintos.

Sería necesario realizar un análisis organoléptico de los vinos para comprobar si estas diferencias encontradas en la composición aromática de los vinos se perciben también a nivel sensorial. Toda esta información permitiría decidir para cada variedad de uva las levaduras más adecuadas para la fermentación.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Alarcón Heredia, R. (2016). Caracterización aromática de vinos de Fondillón de la DO Alicante (Doctoral dissertation).
- Álvarez-Pérez, JM, Campo, E., San-Juan, F., Coque, JJR, Ferreira, V., y Hernández-Orte, P. (2012). Caracterización sensorial y química del aroma de los vinos rosados Prieto Picudo: El papel diferencial de las cepas de levadura autóctonas en los perfiles aromáticos. *Química de los alimentos* , 133 (2), 284-292.
- Andorrà, I., Berradre, M., Rozès, N., Mas, A., Guillamón, JM y Esteve-Zarzoso, B. (2010). Efecto de cultivos puros y mixtos de las principales especies de levaduras enológicas sobre las fermentaciones del mosto de uva. *Investigación y tecnología alimentarias europeas* , 231 (2), 215-224.
- Arévalo Villena, M. (2005). Estudio de la actividad glucosidásica en levaduras vínicas y su aplicación en enología.
- Arslan, E., Çelik, ZD y Cabaroğlu, T. (2018). Efectos de *Torulaspota delbrueckii* y *Saccharomyces cerevisiae* puros y mixtos autóctonos sobre la fermentación y compuestos volátiles de vinos narince. *Alimentos* , 7 (9), 147.
- Arslan, E., Çelik, ZD y Cabaroğlu, T. (2018). Efectos de *Torulaspota delbrueckii* y *Saccharomyces cerevisiae* puros y mixtos autóctonos sobre la fermentación y compuestos volátiles de vinos narince. *Alimentos* , 7 (9), 147.
- Belancic, A., & Agosin, E. (2002). Aromas Varietales: Influencia de ciertas prácticas vitícolas y enológicas. Santiago de Chile, Chile: Centro Tecnológico de Aromas (www.centroaromas.cl).
- Belda, I., Navascués, E., Alonso, A., Marquina, D., & Santos, A. (2014). Microbiología del proceso de vinificación: selección de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* autóctonas con óptimas propiedades enológicas. *Reduca (Biología)*, 7(1).
- Bindon, Keren y col. (2013). Relaciones entre tiempo de cosecha y composición del vino en *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon 1. *Química de la uva y el vino. Química de alimentos* , vol. 138, no 2-3, pág. 1696-1705.
- Canuti, Valentina y col. (2009). Microextracción en fase sólida del espacio de cabeza - cromatografía de gases - espectrometría de masas para perfilar compuestos volátiles libres en uvas y vinos Cabernet Sauvignon. *Journal of Chromatography A* , vol. 1216, no 15, p. 3012-3022.
- Carmona, M., Aramburu, A. Z., Marta, G. L. A. D., & Fernández, M. R. S. (2002). La hidromiel y el vino: comparación de los aromas producidos durante su envejecimiento. *Ensayos: Revista de la Facultad de Educación de Albacete*, (17), 281-290.
- Chambers, PJ y Pretorius, IS (2010). Fermentar el conocimiento: la historia de la enología, la ciencia y la investigación de la levadura. *Informes EMBO* , 11 (12), 914-920.
- Chen, K., Escott, C., Loira, I., del Fresno, JM, Morata, A., Tesfaye, W., ... y Benito, S. (2018). Uso de levaduras no *Saccharomyces* y tanino enológico en la elaboración de vinos tintos: Influencia en el color, aroma y propiedades sensoriales de los vinos jóvenes. *Microbiología alimentaria* , 69 , 51-63.

Claus, H. (2009). Exoenzimas de microorganismos del vino. En *Biología de microorganismos en uvas, mosto y vino* (págs. 259-271). Springer, Berlín, Heidelberg.

Clemente-Jimenez, JM, Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, FJ y Rodríguez-Vico, F. (2004). Caracterización molecular y propiedades enológicas de levaduras enológicas aisladas durante la fermentación espontánea de seis variedades de mosto de uva. *Microbiología de los alimentos* , 21 (2), 149-155.

Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I. y Ciani, M. (2011). Levaduras de vino seleccionadas distintas de *Saccharomyces* en fermentaciones controladas multinivel con *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiología de alimentos* , 28 (5), 873-882.

Culleré, L., Escudero, A., Cacho, J. y Ferreira, V. (2004). Cromatografía de gases - olfatometría y estudio químico cuantitativo del aroma de seis vinos tintos españoles con crianza de primera calidad. *Revista de química agrícola y alimentaria* , 52 (6), 1653-1660.

del Pozo Bayón, M. (2011). Descifrando las claves químicas que explican el aroma del vino. *ACE: Revista de Enología*, 127.

Díaz-Plaza Martín-Lorente, E. M., Reyero Gómez, J. R., Salinas Fernández, M. R., & Pardo Mínguez, F. (2002). Influence of mixtures of Cabernet Sauvignon and Merlot grapes with Monastrell on wines quality and aroma. *Viticultura Enología Profesional (España)*.

Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Comitini, F., Gobbi, M., Mannazzu, I. y Ciani, M. (2011). Esbozando un futuro para las levaduras distintas de *Saccharomyces*: selección de cepas de vino en estado de deterioro putativo que se utilizarán en asociación con *Saccharomyces cerevisiae* para la fermentación del jugo de uva. *Revista internacional de microbiología alimentaria* , 147 (3), 170-180.

Englezos, Vasileios. (2018). Perfil volátil de vinos blancos fermentados con inoculación secuencial de *Starmerella bacillaris* y *Saccharomyces cerevisiae*. *Química de los alimentos* , vol. 257, pág. 350-360.

Englezos, V., Torchio, F., Cravero, F., Marengo, F., Giacosa, S., Gerbi, V., ... y Cocolin, L. (2016). Perfil aromático y composición de los vinos Barbera obtenidos por fermentaciones mixtas de *Starmerella bacillaris* (sinónimo de *Candida zemplinina*) y *Saccharomyces cerevisiae*. *LWT* , 73 , 567-575.

Fernández, M. T. C. (2004). Estudio analítico de compuestos volátiles en vino: caracterización quimiométrica de distintas denominaciones de origen. Universidad de La Rioja.

Ferreira, V., Lopez, R. y Cacho, JF (2000). Determinación cuantitativa de los olores de vinos tintos jóvenes de diferentes variedades de uva. *Revista de ciencia de la alimentación y la agricultura* , 80 (11), 1659-1667.

Fleet, G. M. (1993). Yeasts-growth during fermentation. *WQine Microbiology & Biotechnology*, 27-54.

Querol, A. y Fleet, GH (Eds.). (2006). *Levaduras en alimentos y bebidas*.

Fleet, GH (2008). Levaduras de vino para el futuro. *Investigación de levadura FEMS* , 8 (7), 979-995.

- Flota, G. H. (2003). Interacciones de levadura y sabor a vino. *Revista internacional de microbiología de alimentos* , 86 (1-2), 11-22.
- Francis, L. (2012). Fermentation-derived aroma compounds and grape-derived monoterpenes. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 96, 601-618.
- Fuidio, E. B. (2014). Efecto de la inoculación con levaduras secas activas en la elaboración de vinos con distintas variedades de uva tinta.
- Gambetta, JM, Bastian, SE, Cozzolino, D. y Jeffery, DW (2014). Factores que influyen en la composición aromática de los vinos Chardonnay. *Revista de química agrícola y alimentaria* , 62 (28), 6512-6534.
- Gamero, A. (2011). Study of the production and release of aromas during winemaking carried out by different *Saccharomyces* species and hybrids.
- García, M., Esteve-Zarzoso, B. y Arroyo, T. (2016). Levaduras no *Saccharomyces*: Papel biotecnológico para la producción de vino. *Biotecnología de la uva y el vino* , 11 , 1-25.
- González, J. C., Delgado, M. R., Bencomo, J. R., Valido, H. C., & Trujillo, J. P. (2010). Determinación de volátiles mayoritarios en vinos tintos de las islas canarias. *Aportaciones al conocimiento del vino canario*. La Laguna: Editorial Instituto de Estudios Canarios.
- Hernandez, F. J., Recalde, V. E., & Erazo, A. M. (2015). Determinación de congéneres en alcohol extra neutro rectificado empleado en la elaboración de bebidas alcohólicas. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*, 13(1), 28-37.
- Hernández-Orte, P., Franco, E., Huerta, CG, García, JM, Cabellos, M., Suberviola, J., ... y Cacho, J. (2014). Criterios para discriminar entre vinos envejecidos en barrica de roble y macerados con fragmentos de roble. *Food Research International* , 57 , 234-241.
- Hu, K., Jin, GJ, Mei, WC, Li, T. y Tao, YS (2018). Aumento del contenido de ésteres etílicos de ácidos grasos de cadena media en mezclas de *H. uvarum* / *S. La* fermentación de cerevisiae conduce a una mejora del aroma afrutado del vino. *Química de los alimentos* , 239 , 495-501.
- Jiang, B. y Zhang, Z. (2010). Compuestos volátiles de vinos jóvenes de las variedades Cabernet Sauvignon, Cabernet Gernischet y Chardonnay cultivadas en la región de la meseta de Loess en China. *Moléculas* , 15 (12), 9184-9196.
- Jolly, NP, Augustyn, OPH y Pretorius, IS (2006). El papel y el uso de levaduras distintas de *Saccharomyces* en la producción de vino.
- Jolly, NP, Varela, C. y Pretorius, IS (2014). No es su levadura ordinaria: levaduras no *Saccharomyces* en la producción de vino al descubierto. *Investigación de levadura FEMS* , 14 (2), 215-237.
- Lallemand, P. MANEJO DEL ACETALDEHÍDO Levadura y fermentación alcohólica.
- Lambert Royo, I. (2017). Evaluación enológica de co-inoculación de levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* nativas en cv. Cabernet Sauvignon.
- Lambert Royo, I. (2017). Evaluación enológica de co-inoculación de levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* nativas en cv. Cabernet Sauvignon.

Lilly, M., Lambrechts, MG y Pretorius, IS (2000). Efecto del aumento de la actividad de la acetiltransferasa de alcohol de levadura sobre los perfiles de sabor del vino y los destilados. *Microbiología aplicada y ambiental* , 66 (2), 744-753.

Luan, Y., Zhang, BQ, Duan, CQ y Yan, GL (2018). Efectos de diferentes tiempos de maceración en frío prefermentativos sobre compuestos aromáticos de co-fermentación de *Saccharomyces cerevisiae* con *Hanseniaspora opuntiae* o *Pichia kudriavzevii*. *LWT* , 92 , 177-186.

Luyt, NA (2015). Interacción de múltiples especies de levadura durante la fermentación (Tesis doctoral, Stellenbosch: Universidad de Stellenbosch).

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(4), 461-468.

Martínez, J., Ojeda, S., Rubio, P., Cadahía, E., & Fernández de Simón, B. (2007). El roble español: Una alternativa para la crianza de vinos de calidad. *Enólogos*, 47, 46-48.

Mateos, JR, Pérez-Nevado, F. y Fernández, MR (2006). Influencia de la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* sobre los principales compuestos volátiles del vino. *Tecnología enzimática y microbiana* , 40 (1), 151-157.

Medina, K., Boido, E., Fariña, L., Gioia, O., Gomez, ME, Barquet, M., ... y Carrau, F. (2013). Mayor diversidad de sabores de los vinos Chardonnay por fermentación espontánea y co-fermentación con *Hanseniaspora vineae*. *Química de los alimentos* , 141 (3), 2513-2521.

Muñoz-González, C., Moreno-Arribas, M. V., Martín-Álvarez, P. J., Bartra-Sebastian, E., Puig-Pujol, A., García-Cazorla, J., & Pozo-Bayón, M. Á. (2011). Volatile and sensory characterization of Xarel. lo white wines. *Flavour and fragrance journal*, 26(3), 153-161.

Moio, L., Di Marzio, L., Genovese, A., Piombino, P., Squillante, E., Castellano, L., & Mercurio, V. (2002). Sensory descriptors and volatile components in enhanced olfactory impact of Fiano di Avellino wine aroma. *Vignevisini*, 29(4), 115-123.

Ocón, E. (2014). Diversidad de levaduras no-*Saccharomyces* en diferentes ecosistemas vitivinícolas (Doctoral dissertation, Universidad de La Rioja).

OIV, O. (2009). Compendium of international methods of wine and must analysis. International Organisation of Vine and Wine: Paris, France, 154-196.

Padilla, B., Gil, JV y Manzanares, P. (2016). Pasado y futuro de las levaduras no *Saccharomyces*: desde los microorganismos de deterioro hasta las herramientas biotecnológicas para mejorar la complejidad del aroma del vino. *Frontiers in Microbiology* , 7 , 411.

Pretorius, IS (2000). Adaptación de la levadura de vino para el nuevo milenio: enfoques novedosos del antiguo arte de la elaboración del vino. *Levadura* , 16 (8), 675-729.

Quiñones Silva, A. E. (2013). Influencia de las levaduras no-*Saccharomyces* en la generación de compuestos aromáticos durante la fermentación alcohólica.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2002). Tratado de enología: química del vino, estabilización y tratamientos. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 216-219.

Jiménez, M. E. (2007). Análisis Genómico y Molecular de Levaduras Vínicas. Aplicación a la Mejora del Proceso de Fermentación de Vinos mediante Selección de Levaduras Autóctonas Tesis Doctoral.

Strauss, MLA, Jolly, NP, Lambrechts, MG y Van Rensburg, P. (2001). Detección de la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares por levaduras de vino no *Saccharomyces*. Revista de microbiología aplicada , 91 (1), 182-190.

Swiegers, J. H. (2005). Levadura y modulación bacteriana del aroma y sabor del vino. Revista australiana de investigación sobre uvas y vinos , vol. 11, no 2, pág. 139-173.

Terral, JF, Tabard, E., Bouby, L., Ivorra, S., Pastor, T., Figueiral, I., ... y Tardy, C. (2010). Evolución e historia de la vid (*Vitis vinifera*) bajo domesticación: nuevas perspectivas morfológicas para comprender el síndrome de domesticación de semillas y revelar los orígenes de los antiguos cultivares europeos. Anales de botánica , 105 (3), 443-455.

Torija Martínez, M. (2002). Ecología de levaduras: Selección y adaptación a fermentaciones vínicas (Doctoral dissertation, Universitat Rovira i Virgili).

Viana, F., Gil, J. V., Genovés, S., Vallés, S., & Manzanares, P. (2008). Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. Food Microbiology, 25(6), 778-785.

Viana, F., Belloch, C., Vallés, S. y Manzanares, P. (2011). Seguimiento de un iniciador mixto de *Hanseniaspora vineae* – *Saccharomyces cerevisiae* en mosto natural: impacto en la producción de acetato de 2-feniletilo. Revista Internacional de Microbiología de los Alimentos , 151 (2), 235-240.

Viana, F., Taillandier, P., Vallés, S., Strehaiano, P., & Manzanares, P. (2011). 2-phenylethyl acetate formation by immobilized cells of *Hanseniaspora vineae* in sequential mixed fermentations. American journal of enology and viticulture, 62(1), 122-126.

Vilanova, M. y Oliveira, JM (2012). Aplicación de la cromatografía de gases en la evaluación del aroma de uva y vino en la viticultura atlántica (NO Península Ibérica). Cromatografía de gases en ciencias de las plantas, tecnología del vino, toxicología y algunas aplicaciones específicas , 109-146.

Vitivinicultura, (2012). Uvas de vino tintas: Variedad de Vid: Merlot, Garnacha y Cabernet Sauvignon.

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/uvas-de-vino-tintas-merlot.html>

<http://www.vitivinicultura.net/viticultura-de-la-garnacha-tinta.html>

<http://www.vitivinicultura.net/uvas-de-vino-tinto-cabernet-sauvignon.html>

Whitener, MEB, Carlin, S., Jacobson, D., Weighill, D., Divol, B., Conterno, L., ... y Vrhovsek, U. (2015). Perfil de metabolitos volátiles de fermentación temprana de levaduras no *Saccharomyces* en mosto de uva roja y blanca: un enfoque específico. LWT-Ciencia y tecnología de los alimentos , 64 (1), 412-422.

Yang, MH y Choong, YM (2001). Un método rápido de cromatografía de gases para la determinación directa de ácidos orgánicos volátiles de cadena corta (C2-C12) en los alimentos. *Química de los alimentos*, 75 (1), 101-108.

Zhang, BQ, Luan, Y., Duan, CQ y Yan, GL (2018). Uso de la co-fermentación de *Torulaspota delbrueckii* con dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* con diferente característica aromática para mejorar la diversidad del perfil aromático del vino tinto. *Fronteras en microbiología*, 9, 606.