



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL

**EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE
LEVADURAS *Saccharomyces* Y NO
Saccharomyces PREVIAMENTE
SELECCIONADAS CON RESPECTO A LOS
PARÁMETROS GENERALES Y
COMPOSICIÓN POLIFENÓLICA DE VINOS
TINTOS ELABORADOS CON MERLOT,
CABERNET SAUVIGNON Y GARNACHA**

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN ENOLOGÍA

Autora: Arantxa Carrascosa Morelló

Tutora: Victoria Lizama Abad

Curso académico 2020-2021

Valencia, 2021

EFFECTO DE LA COMBINACIÓN DE LEVADURAS *Saccharomyces* Y NO *Saccharomyces*
PREVIAMENTE SELECCIONADAS CON RESPECTO A LOS PARÁMETROS
GENERALES Y COMPOSICIÓN POLIFENÓLICA DE VINOS TINTOS ELABORADOS
CON MERLOT, CABERNET SAUVIGNON Y GARNACHA

Valencia, 2021

RESUMEN

En el presente trabajo se ha estudiado cómo varía la composición polifenólica de vinos tintos elaborados con Merlot, Cabernet Sauvignon y Garnacha, utilizando para ello diferentes levaduras. Se realizó el ensayo de vinificación de tres maneras diferentes: sin adicionar levaduras; con una cepa de levadura seleccionada del género *Saccharomyces cerevisiae* (22H); y con una combinación de *Saccharomyces cerevisiae* con otra levadura seleccionada no perteneciente al género *Saccharomyces cerevisiae* (22H + 58E).

Para realizar la elaboración de los vinos se contó con materia prima vendimiada en el momento óptimo, la cual se procesó y se colocó en depósitos con cada combinación de levaduras para cada variedad, por triplicado. Una vez terminada la fermentación, los vinos se embotellaron y, tras 14 meses embotellados se procedió a realizar los análisis de los parámetros escogidos. Los resultados se procesaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) para conocer qué levadura o combinación de éstas generaba vinos con mejores características polifenólicas para cada una de las variedades, además se estableció si había distinto comportamiento en las tres variedades de uva ensayadas.

Los resultados más destacables obtenidos son que la variedad de uva es la variable que más influye en la composición final de los vinos, por lo que existen diferencias significativas entre la mayoría de parámetros polifenólicos. Por otro lado, se observa que, al comparar las diferentes levaduras dentro de una misma variedad, no existen muchas diferencias en la composición polifenólica.

Palabras clave

Saccharomyces; no-*Saccharomyces*; fermentación; Merlot; Cabernet Sauvignon; Garnacha; composición polifenólica

EFFECTE DE LA COMBINACIÓ DE LLEVATS *Saccharomyces* I NO *Saccharomyces*
PRÈVIAMENT SELECCIONADES RESPECTE ALS PARÀMETRES GENERALS I
COMPOSICIÓ POLIFENÒLICA DE VINS NEGRES ELABORATS AMB MERLOT,
CABERNET SAUVIGNON I GARNATXA.

València, 2021

RESUM

En el present treball s'ha estudiat com varia la composició polifenòlica de vins negres elaborats amb Merlot, Cabernet Sauvignon i Garnatxa, utilitzant per a això diferents llevats. Es va realitzar l'assaig de vinificació de tres maneres diferents: sense addicionar llevats; amb un cep de llevat seleccionat del gènere *Saccharomyces cerevisiae* (22H); i amb una combinació de *Saccharomyces cerevisiae* amb un altre llevat seleccionat no pertanyent al gènere *Saccharomyces cerevisiae* (22H + 58E).

Per a realitzar l'elaboració dels vins es va comptar amb matèria prima veremada en el moment òptim, la qual es va processar i es va col·locar en depòsits amb cada combinació de llevats per a cada varietat, per triplicat. Una vegada acabada la fermentació, els vins es van embotellar i, després de 14 mesos embotellats es va procedir a realitzar els anàlisis dels paràmetres triats. Els resultats es van processar mitjançant un anàlisi de variància (ANOVA) per a conèixer quin llevat o combinació d'aquestes generava vins amb millors característiques polifenòliques per a cadascuna de les varietats, a més es va establir si hi havia diferent comportament en les tres varietats de raïm assajades.

Els resultats més destacables obtinguts són que la varietat de raïm és la variable que més influeix en la composició final dels vins, per la qual cosa existeixen diferències significatives entre la majoria de paràmetres polifenòlics. D'altra banda, s'observa que, en comparar els diferents llevats dins d'una mateixa varietat, no existeixen moltes diferències en la composició polifenòlica.

Paraules clau

Saccharomyces; no-*Saccharomyces*; fermentació; Merlot; Cabernet Sauvignon, Garnatxa; composició polifenòlica.

EFFECT OF THE COMBINATION OF PREVIOUSLY SELECTED *Saccharomyces* AND NON *Saccharomyces* YEASTS ON THE GENERAL PARAMETERS AND POLYPHENOLIC COMPOSITION OF RED WINES MADE FROM MERLOT, CABERNET SAUVIGNON AND GRENACHE.

Valence, 2021

ABSTRACT

In the present work, we studied how the polyphenolic composition of red wines made with Merlot, Cabernet Sauvignon and Grenache vary, using different yeasts. The vinification trial was carried out in three different ways: without adding yeast; with a selected yeast strain of the genus *Saccharomyces cerevisiae* (22H); and with a combination of *Saccharomyces cerevisiae* with another selected yeast not belonging to the genus *Saccharomyces cerevisiae* (22H + 58E).

To make the wines, the raw material was harvested at the optimum moment, processed and placed in tanks with each combination of yeasts for each variety, in triplicate. Once fermentation was completed, the wines were bottled and, after 14 months of bottling, the selected parameters were analysed. The results were processed using an analysis of variance (ANOVA) to determine which yeast or combination of yeasts generated wines with better polyphenolic characteristics for each of the varieties, and to establish whether there was different behaviour in the three grape varieties tested.

The most remarkable results obtained are that the grape variety is the variable that most influences the final composition of the wines, so there are significant differences between most of the polyphenolic parameters. On the other hand, it is observed that, when comparing the different yeasts within the same variety, there are not many differences in the polyphenolic composition.

Key words

Saccharomyces; non-*Saccharomyces*; fermentation; Merlot; Cabernet Sauvignon ; Garnacha ; polyphenolic composition.

AGRADECIMIENTOS

A Vicky, por todo el tiempo dedicado, las horas invertidas en mi aprendizaje y la confianza depositada en mí para la realización del proyecto.

A mis compañeras del máster, por ayudarme en el día a día. Sobre todo a ti, Ana, por todo el apoyo, el ánimo y el acompañamiento que me has dado estos meses.

Como siempre, a mi familia y amigas.

Gracias.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. LEVADURAS DE VINIFICACIÓN	2
1.2. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA ESPONTÁNEA.....	2
1.3. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA CON ADICIÓN DE LEVADURA SECA ACTIVA (LSA) 3	
1.4. USO DE LEVADURAS DEL GÉNERO <i>NO-Saccharomyces</i>	3
1.5. EFECTO DE LAS LEVADURAS SOBRE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DEL VINO.	4
1.5.1. Antocianos.....	4
1.5.2. Taninos.....	5
2. OBJETIVOS	5
3. PLAN DE TRABAJO	6
4. MATERIALES Y MÉTODOS	6
4.1. VARIEDADES DE UVA.....	7
4.2. ELABORACIÓN	9
4.3. MATERIALES Y MÉTODOS ANALÍTICOS.....	10
4.3.1. Preparación y fermentación alcohólica de los vinos	10
4.3.2. Conservación de los vinos de la fermentación a su análisis	11
4.3.3. Parámetros generales. (UE 2019/935).....	12
4.3.4. Compuestos fenólicos	13
4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	15
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
5.1. EVOLUCIÓN DE LOS VINOS DURANTE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA	16
5.2. CROMATOGRAFÍA EN PAPEL	18
5.3. CATA DE VINOS	18
5.4. EFECTO DE LAS DIFERENTES LEVADURAS EN LOS PARÁMETROS GENERALES Y POLIFENÓLICOS DE LOS VINOS ELABORADOS CON MERLOT.	19
5.5. EFECTO DE LAS LEVADURAS EN LOS PARÁMETROS GENERALES Y POLIFENÓLICOS DE LOS VINOS ELABORADOS CON CABERNET SAUVIGNON.	22
5.6. EFECTO DE LAS LEVADURAS EN LOS PARÁMETROS GENERALES Y POLIFENÓLICOS DE LOS VINOS ELABORADOS CON GARNACHA.	25
5.7. CORRELACIÓN ENTRE EL ANÁLISIS SENSORIAL Y LA COMPOSICIÓN QUÍMICA.....	28
6. CONCLUSIÓN	30
7. BIBLIOGRAFÍA.....	32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Medias, desviaciones y ANOVA de los parámetros convencionales de los vinos elaborados con Merlot.....	20
Tabla 2. Medias, desviaciones y ANOVA de los parámetros relacionados con el color de los vinos elaborados con Merlot	21
Tabla 3. Medias, desviaciones y ANOVA de los parámetros relacionados con la astringencia de los vinos elaborados con Merlot	22
Tabla 4. Medias, desviaciones y ANOVA de los parámetros convencionales de los vinos elaborados con Cabernet Sauvignon	23
Tabla 5. Medias, desviaciones y ANOVA de los parámetros relacionados con el color de los vinos elaborados con Cabernet Sauvignon.....	24
Tabla 6. Medias, desviaciones y ANOVA de los parámetros relacionados con la astringencia de los vinos elaborados con Cabernet Sauvignon.....	25
Tabla 7. Medias, desviaciones y ANOVA de los parámetros convencionales de los vinos elaborados con Garnacha	26
Tabla 8. Medias, desviaciones y ANOVA de los parámetros relacionados con el color de los vinos elaborados con Garnacha.....	27
Tabla 9. Medias, desviaciones y ANOVA de los parámetros relacionados con la astringencia de los vinos elaborados con Garnacha.....	28
Tabla 10. Resumen ratio-F del análisis sensorial.....	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Uva de variedad Merlot	7
Figura 2. Uva de variedad Cabernet Sauvignon.....	7
Figura 3. Uva de variedad Garnacha.....	8
Figura 4. Toma de densidad diaria.....	10
Figura 5. Bazuqueos diarios en depósito.....	10
Figura 6. Descube del vino tinto	11
Figura 7. Damajuana para fermentación maloláctica.....	11
Figura 8. Destilación fraccionada.....	12
Figura 9. Coloración indicativa del final de la valoración	12
Figura 10. Proceso de medición de la acidez total con pH-metro	13
Figura 11. Evolución de la densidad del vino de Merlot durante la fermentación alcohólica.	16
Figura 12. Evolución de la densidad del vino de Cabernet durante la fermentación alcohólica.	17
Figura 13. Evolución de la densidad del vino de Garnacha durante la fermentación alcohólica.	17
Figura 14. Cromatografía en papel Merlot.....	18
Figura 15. Cromatografía en papel Cabernet Sauvignon	18
Figura 16. Cromatografía en papel Garnacha	18

1. INTRODUCCIÓN

El vino es la bebida alcohólica que se obtiene por fermentación parcial o total de los azúcares presentes en el zumo de las uvas. Esta bebida tiene una larga historia que ha ido desde sus inicios de la mano de la historia de la humanidad. Ya en los años 6.000 - 5.000 a. C. se encuentran indicios de bebidas elaboradas a partir de uvas, pero no es hasta el 3.000 a. C., durante la época conocida como Edad de Bronce, cuando se cree que se produjo el nacimiento del vino en el Próximo Oriente, en la antigua Mesopotamia.

Más tarde llegó a Egipto, y de ahí se empezó a difundir hacia el Mediterráneo, gracias en parte a los comerciantes y colonos fenicios y griegos, quienes lo introdujeron en la Península Ibérica en el siglo VII a.C. Sin embargo, fueron realmente los romanos los que cogieron la tradición vitivinícola y le dieron un verdadero sentido social, religioso y cultural durante la Edad Media.

Para los cristianos, el vino era algo más que una bebida placentera como es hoy en día. Al vino se le atribuían propiedades beneficiosas como puede ser la gran cantidad de calorías que aportaba a la dieta, las cualidades médicas o sanatorias que los médicos aseguraban y la felicidad que su ingesta generaba, aumentando alegrías y disminuyendo penas. Es por ello que el vino era consumido en tabernas, celebraciones religiosas y paganas e incluso en entierros, alcanzando índices de consumo en torno a los tres cuartos de litro por persona y día, lo que supone unos 270 litros por persona al año.

Nada tiene que ver ese alto consumo de vino durante la Edad Media con el consumo actual. Por un lado, en el ámbito doméstico, el consumo de vinos ha sufrido un gran descenso en las últimas décadas a la par que ha tratado de recuperar el prestigio social perdido, puesto que se pensaba que el vino era una bebida pasada de moda y asociada al alcoholismo (Mattiacci y Zampi, 2004). Por otro lado, en el canal HORECA es cierto que se presta más atención al vino y se amplía su oferta, pero las últimas crisis económicas y la concienciación de la población sobre un estilo de vida cada vez más saludable afectan negativamente al consumo de los mismos.

En cuanto a España, es el país vitivinícola que cuenta con mayor superficie de viñedo, ocupando el tercer lugar en cuanto a producción mundial de vino se refiere (33,4 millones de hectolitros), cifras solo superadas por Francia e Italia. Como el consumo de vino en España se viene además reduciendo, los excedentes son vendidos a terceros países, colocando al país en el segundo lugar como exportador, según datos de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) (Castillo *et al.*, 2014).

Desde los inicios del vino, este se producía por fermentación espontánea ya que se creía que esta reacción química era un milagro. Sin embargo, en el año 1857, el biólogo francés Louis Pasteur descubrió que las levaduras eran los microorganismos responsables de llevar a cabo la transformación del mosto en vino por conversión del azúcar en alcohol y CO₂ (Belda *et al.*, 2014). Más tarde, en 1966 y 1976, con sus obras “Estudios sobre el vino” y posteriormente “Estudios sobre la cerveza”, probó de manera inequívoca la naturaleza biológica de las fermentaciones. Demostró que las levaduras causantes de la fermentación espontánea eran las que se encontraban en la superficie de las uvas y en la bodega, y que las características de los vinos podían estar influenciadas por la naturaleza de las mismas. A partir de ese momento se empezó a estudiar el uso de levaduras foráneas para llevar a cabo la fermentación de los vinos.

Hoy en día, la disminución del consumo y el aumento de un público cada vez más entendido y que demanda vinos más particulares hace que los viticultores y enólogos, para satisfacer los deseos del consumidor, se vean obligados a buscar alternativas que atraigan su atención, creando vinos cada vez más novedosos y peculiares. Algunas alternativas que se contemplan son, por ejemplo, la selección de levaduras propias que nos den como resultado vinos con las características deseadas o retomar el uso de las propias levaduras de la uva con el claro objetivo de obtener vinos con una gran tipicidad que resalten las características de cada variedad y terreno.

1.1. LEVADURAS DE VINIFICACIÓN

La calidad del vino es un factor difícil de medir puesto que es una apreciación subjetiva que dependerá principalmente de la persona que lo ingiera. Sin embargo, se puede afirmar que esta viene definida por tres factores: la materia prima utilizada, la tecnología aplicada y la población microbiana que interviene en la fermentación.

En cuanto a la población microbiana, se puede dividir en dos categorías: levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y levaduras No-*Saccharomyces cerevisiae*. El origen de estas levaduras y el modo por el que llegan al mosto ha sido objeto de debate durante mucho tiempo. Por un lado, en la fermentación espontánea, estas llegan al mosto por dos vías: a través de las uvas, o a través del material de la bodega (Santamaría *et al.*, 2007). Por otro lado, está la opción de añadir levaduras secas activas (LSA) al mosto, ya sean adquiridas en comercios o seleccionadas a lo largo del tiempo en bodega.

La levadura responsable de la vinificación será, además, responsable de mejorar las características sensoriales del vino ya que afectan al color, aroma y estructura del mismo (Morata *et al.*, 2012). Es por ello que, normalmente, el mosto se inocula con levadura *Saccharomyces cerevisiae* para la vinificación comercial. Sin embargo, el uso de levaduras *Saccharomyces* y No-*Saccharomyces* como cultivo iniciador mixto es cada vez más interesante para mejorar la calidad y la complejidad del vino (Jolly *et al.*, 2014; Padilla *et al.*, 2016).

1.2. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA ESPONTÁNEA

Tradicionalmente, el vino se produce por fermentación alcohólica espontánea, proceso en el que intervienen diversos géneros y especies de levaduras.

Se conocen más de 80 géneros de levaduras enológicas que se encuentran significativamente en la uva y el vino. Sin embargo, solamente unos 15 géneros son los que intervienen en el proceso fermentativo (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1979). En la bodega, las cepas predominantes en el mosto pertenecen mayoritariamente a la especie *Saccharomyces Cerevisiae*, un hongo unicelular con altas capacidades para producir la fermentación alcohólica (Mercado *et al.*, 2007). Sin embargo, existen estudios que afirman que la presencia de géneros No-*Saccharomyces* en la bodega es muy elevada (Sabate *et al.*, 2002; Santamaría *et al.*, 2008).

La microbiota de las uvas se puede ver afectada por muchos factores como la temperatura, la pluviometría y otras condiciones climáticas (Longo *et al.*, 1991), la variedad de uva (Raspor *et al.*, 2006) o los tratamientos fúngicos que la viña haya sufrido (van der Westhuizen *et al.*, 2000), entre otros.

Las levaduras presentes en las uvas, tras los procesos de despalillado y estrujado, puesto que las condiciones en las que la uva se encuentra han cambiado, se ven obligadas a adaptarse a un nuevo medio con mucho azúcar y un nuevo pH, lo que les produce estrés celular. Todos los procesos de adaptación se traducen en tiempo y energía. Esto, unido a la variación de la calidad del producto año tras año, son los motivos por los que muchas bodegas deciden no llevar a cabo la fermentación de tipo espontánea.

1.3. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA CON ADICIÓN DE LEVADURA SECA ACTIVA (LSA)

La alternativa a la fermentación espontánea es la adición de levadura seca activa (LSA), formato en el que se comercializan los inóculos de levadura. Estas han sido seleccionadas por las distintas casas comerciales para mejorar las capacidades fermentativas y la adaptación al medio, haciendo que el comienzo de fermentación sea más rápido que con la fermentación espontánea.

El uso de LSA permite a las bodegas elegir las levaduras con las que trabajar. Además, esta opción también hace posible que las propias bodegas o laboratorios puedan seleccionar sus propias levaduras, eligiendo aquellas que se adapten mejor a los objetivos marcados por cada sitio, como en nuestro caso.

La selección de levaduras consiste en primer lugar en el aislamiento de una población de levaduras en mitad y final de fase de fermentación espontánea. En segundo lugar, en la identificación de las levaduras mediante técnicas moleculares. Este proceso se lleva a cabo durante varias vendimias consecutivas, normalmente tres, para conseguir una representación óptima de la biodiversidad de levaduras mayoritaria de la zona. En todos los estudios siempre hay alguna cepa que destaca por ser más abundante. Estas son las que se seleccionan y conservan para estudiar su potencial enológico en laboratorio. De las que mejor superen los parámetros de calidad, se elaboran cultivos puros para ser utilizados como estarter en la fermentación alcohólica de los vinos.

1.4. USO DE LEVADURAS DEL GÉNERO NO-*Saccharomyces*

Otra forma de realzar las complejas peculiaridades del vino es el uso controlado de levaduras de vino No-*Saccharomyces* (Ciani *et al.*, 2010). La mayoría de estas especies tienen un potencial de fermentación limitado, como un bajo poder y velocidades de fermentación, así como una baja resistencia al SO₂ (Ciani y Maccarelli, 1997; Jolly *et al.*, 2006) y algunas de estas pueden producir productos indeseados como ácido acético, acetato de etilo o acetaldehído. Sin embargo, en las últimas décadas, varios estudios han revaluado el papel de las levaduras No-*Saccharomyces* revelando su impacto positivo en la composición y complejidad aromática del producto final (Jolly *et al.*, 2003; Domizio *et al.*, 2011; Jolly *et al.*, 2014; Varela *et al.*, 2017).

Durante los últimos 10 años se han realizado varios estudios para caracterizar levaduras No-*Saccharomyces* por su capacidad para producir metabolitos deseables para el sabor del vino, como ésteres de acetato, o enzimas para mejorar el aroma y la complejidad del vino (Fia *et al.*, 2005; Rojas *et al.*, 2003; Swiegers *et al.*, 2005). Se ha prestado más atención también a la capacidad de estas levaduras para liberar polisacáridos de la pared celular, principalmente manoproteínas. Estos compuestos mejoran la sensación en la boca y la plenitud, disminuyen la astringencia, agregan complejidad y persistencia aromática, aumentan la dulzura y la redondez y reducen la inestabilidad de las proteínas y los tartratos (Carvalho *et al.*, 2006; Charpentier *et al.*, 2004; González-Ramos *et al.*, 2008; Guadalupe *et al.*, 2010; Vidal *et al.*, 2004).

Otra de las aplicaciones de las levaduras de vino No-*Saccharomyces* en la vinificación es la desacidificación del mosto y del vino. En este aspecto es interesante combinar *Saccharomyces* con No-*Saccharomyces* puesto que la primera degrada el ácido málico para convertirlo en láctico mientras que la segunda genera ácido láctico, haciendo que la acidez total sea superior y el pH inferior.

1.5. EFECTO DE LAS LEVADURAS SOBRE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DEL VINO.

1.5.1. Antocianos

Los antocianos, desde el punto de vista químico, son monoglucósidos formados por una antocianina unida a un azúcar mediante un enlace β -glucosídico. De ellos dependen los principales parámetros del color de los vinos, es decir, el tono y la intensidad colorante, influyendo además en la estabilidad del color de los vinos tintos. Estos compuestos se encuentran principalmente en la piel de las uvas, y son extraídos en el momento en el que se deja el mosto en contacto con los hollejos, creando de esta manera una gran superficie de contacto entre ambos medios (González, 2005). La cantidad de antocianos presente en los vinos aumenta durante la maceración y fermentación de los vinos hasta alcanzar un punto máximo. Una vez alcanzado, los antocianos tienden a disminuir ya que su solubilidad disminuye a medida que aumenta la cantidad de etanol, con lo que la extracción se vuelve más difícil (Morata *et al.*, 2016).

La especie de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* tiene actividad β -glucosidásica, es decir, es capaz de hidrolizar el enlace glucosídico, haciendo que la antocianina pierda el azúcar que la acompaña y cambiando a su forma aglicona. Esto podría tener un efecto positivo en la extracción del color. Sin embargo, se considera un inconveniente ya que las antocianinas en este estado son más sensibles a la oxidación.

Otro factor a tener en cuenta es que una fracción significativa de antocianos puede ser adsorbida por las paredes celulares de la levadura en función de diferentes factores, como pueden ser la disponibilidad de nutrientes en el medio o el tipo de cepa utilizado en la fermentación alcohólica. Al adsorberse, la cantidad de antocianos disponibles disminuiría y con ello la intensidad colorante, a pesar de que se trata de un proceso reversible (Morata *et al.*, 2005). Se ha demostrado que *Saccharomyces cerevisiae* reduce los pigmentos amarillos, los taninos totales, y los taninos responsables de la astringencia en los vinos.

Por otro lado, también las levaduras pueden contribuir a estabilizar materia colorante gracias a su capacidad de sintetizar compuestos carbonilo como acetaldehído y ácido pirúvico (Caboulet *et al.*, 2012). El ácido pirúvico es un producto cuya descarboxilación lleva a la formación de acetaldehído (Monagas *et al.*, 2005). Ambos compuestos son precursores de la formación de piranoantocianos, unos compuestos más estables en el tiempo y no decolorables por el SO₂, que favorecen además la unión antociano-tanino (Dournel, 1985). Dependiendo de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada en la fermentación, variará la cantidad de precursores generados (Morata *et al.*, 2016).

1.5.2. Taninos

Los taninos son polifenoles presentes en hollejos, pepitas, raspones y barricas, responsables del sabor amargo de los vinos tintos, así como de la complejidad y astringencia de estos. La astringencia que proporcionan los taninos dependerá del estado en el que se encuentren. A más grado de polimerización de taninos, menor astringencia y más untuosidad del vino.

La astringencia es un fenómeno producido al interaccionar proantocianidinas con glicoproteínas presentes en la boca (Vidal *et al.*, 2003). Las levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* son capaces de liberar al medio polisacáridos presentes en su pared celular en el momento de la fermentación y durante su autólisis. Hay estudios que muestran la disposición de liberar polisacáridos en función de la cepa utilizada (Del Barrio-Galán *et al.*, 2015).

Los polisacáridos, además de mejorar el crecimiento de bacterias lácticas, se unen a los taninos, disminuyendo la sensación de astringencia en boca. La unión polisacárido-tanino se mide mediante el Índice de PVPP (Glories, 1978). A mayor índice de etanol, mayor combinación de estos y más untuosidad del vino, es decir, menos astringencia a igual tanicidad.

Dada la importancia del aumento de polisacáridos en el vino, se lleva a cabo muchas veces la adición de levaduras inactivas. Sin embargo, en la actualidad hay estudios que demuestran que este enriquecimiento del vino se puede realizar mediante una buena selección de levaduras adecuada a la generación de estos compuestos (González *et al.*, 2013).

2. OBJETIVOS

Se vinificaron tres variedades de uva con diferente combinación de levaduras *Saccharomyces* y No-*Saccharomyces*. El objetivo principal es elegir aquella levadura que mejor combine a cada variedad, es decir, que le aporte unas mejores características polifenólicas a los vinos. Para ello, se realizará un control sin adición de levaduras, una vinificación con inoculación de *Saccharomyces cerevisiae* (22H) y otra vinificación con *Saccharomyces cerevisiae* + No-*Saccharomyces cerevisiae* (58E).

3. PLAN DE TRABAJO

Para poder comparar los resultados obtenidos de las distintas vinificaciones, se deben cuidar las condiciones de trabajo de manera que sólo se puedan atribuir las diferencias entre los vinos a la variedad de uva o a la levadura utilizada en la fermentación.

El plan de trabajo seguido en las vinificaciones, se desarrolla a continuación:

- Vendimiar cada variedad en su momento óptimo.
- Procesar las uvas (cada variedad por separado), introducirlas en los diferentes depósitos e inocular las levaduras correspondientes. Los ensayos se realizan por triplicado, fermentando 9 depósitos de 50 L para cada variedad de uva (Merlot, Garnacha, Cabernet Sauvignon).
- Controlar diariamente los depósitos durante la fermentación alcohólica: toma de temperaturas y densidades, facilitando la extracción de compuestos polifenólicos durante la maceración mediante bazuqueos diarios.
- Inoculación de bacterias lácticas para realizar la fermentación maloláctica y control de finalización de la misma mediante cromatografía en papel.
- Embotellado de los vinos.
- Análisis de los compuestos fenólicos del vino tras 14 meses embotellado.
- Comparación de resultados.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo ha llevado tres investigaciones con tres variedades diferentes de uva como son Merlot, Cabernet Sauvignon y Garnacha. Las líneas de investigación se han realizado por triplicado con cada variedad y han sido las siguientes:

- a) Fermentación espontánea con las propias levaduras presentes en las uvas y en el material de bodega utilizado.
- b) Fermentación con adición de LSA del género *Saccharomyces cerevisiae* seleccionada previamente en laboratorio (22H).
- c) Fermentación con adición de LSA mixta del género *Saccharomyces cerevisiae* junto a levaduras del género *No-Saccharomyces cerevisiae* seleccionadas previamente en laboratorio (58E).

4.1. VARIEDADES DE UVA

- **Merlot**

La variedad de uva Merlot es originaria del sudoeste de Francia, más concretamente de la zona de Burdeos. Su gran adaptación a los diferentes tipos de suelos y climas, así como su creciente fama, son factores que han hecho que a día de hoy se encuentre largamente extendida a nivel mundial, siendo una de las variedades más plantadas en el mundo. En España se cultiva principalmente en la Ribera del Duero, Cataluña y Navarra.

Los racimos de Merlot tienen forma cónica alargada y un tamaño mediano, siendo sus uvas de tamaño uniforme y con un color azul negruzco.

Los vinos que proporciona son levemente vegetales, ricos en alcohol, con sabores a frutos del bosque, especias y fruta madura, y con poca acidez. El color es rojo rubí oscuro y muy intenso, y el aroma es complejo y elegante.

Es una variedad ideal para elaborar vinos tintos jóvenes o con poco tiempo en bodega. También combina muy bien con la variedad Cabernet Sauvignon. La principal diferencia entre ambas es que la Merlot tiene un menor contenido en taninos, proporcionando vinos más ligeros al paladar.



Figura 1. Uva de variedad Merlot

- **Cabernet Sauvignon**



Variedad de origen francés, zona bordelesa, que se ha difundido por zonas templadas-cálidas de todo el mundo. Se cree que su origen es el cruce de dos variedades, la Sauvignon Blanc y la Cabernet Franc. Sus racimos son de tamaños mediano-pequeños y medianamente compactos, y las bayas tienen un sabor ligeramente herbáceo.

Los vinos que se obtienen son alcohólicos, con color rojo rubí que tiende al púrpura. Poseen un ligero sabor herbáceo que refina con el envejecimiento, además de aromas intensos a grosella y pimienta verde.

Figura 2. Uva de variedad Cabernet Sauvignon

Es apta para mezcla con otras variedades ya que esto potencia sus características organolépticas y también para el envejecimiento dado su alto contenido en taninos.

- **Garnacha**

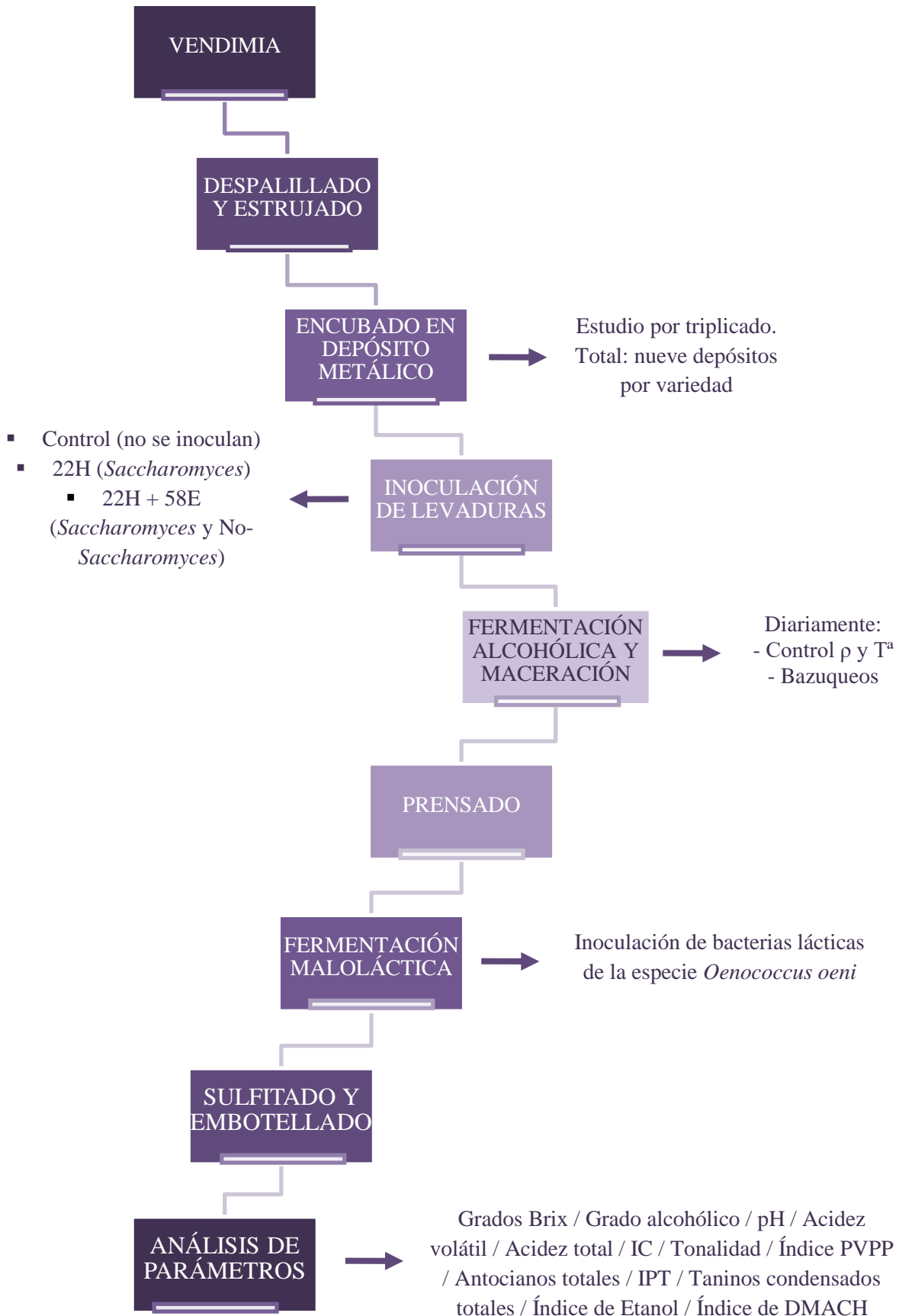
La Garnacha es una variedad proveniente de España, concretamente de la región de Aragón. Es la segunda variedad más cultivada en España. Al ser una de las variedades más plantadas a nivel mundial, se la conoce con diversos nombres como puede ser Giró, Grenache, Garnatja o Garnacha negra. Prefiere climas cálidos y zonas bien ventiladas. Produce racimos grandes, de forma cónica y compacta. Las uvas son de talla mediana, con piel gruesa y abundante zumo.



Figura 3. Uva de variedad Garnacha

Esta variedad da vinos de color rojo rubí claro de sabor afrutado y aromático. El contenido en azúcar es alto por lo que proporciona vinos con alto grado alcohólico, pero de acidez escasas y muy sensibles a la oxidación, por lo que envejecen muy rápidamente. Variedad adecuada para vinos tintos jóvenes o con envejecimientos cortos, así como para elaboración de rosados.

4.2. ELABORACIÓN



4.3. MATERIALES Y MÉTODOS ANALÍTICOS

4.3.1. Preparación y fermentación alcohólica de los vinos

Llegada la uva al laboratorio y tras su despalillado y estrujado, se repartió a partes iguales en un total de 9 depósitos de acero inoxidable por cada variedad (unos 38 kg por depósito). En primer lugar se midieron los ° Brix de cada depósito con el objetivo de hacer grupos de tres depósitos para cada conjunto de levaduras, y que los tres grupos de depósitos tuvieran una distribución homogénea de la concentración de azúcar. La nomenclatura utilizada fue la de “Control” para los tres depósitos en los que se dejó que ocurriera la fermentación espontánea con las levaduras de la uva y del material de bodega; “22H” para los depósitos inoculados únicamente con levadura *Saccharomyces cerevisiae*; y “22H + 58E” para aquellos inoculados tanto con *Saccharomyces cerevisiae* como con *No-Saccharomyces cerevisiae*. Las levaduras utilizadas habían sido seleccionadas durante los años anteriores.

Una vez determinados los depósitos destinados a cada ensayo de levaduras, se inocularon las mismas, y a partir de entonces, se llevó a cabo un control diario de temperatura y densidad de cada depósito para comprobar la correcta evolución de la fermentación alcohólica. Además, se realizaron también bazuqueos diarios con el fin de facilitar la extracción de componentes polifenólicos de las uvas.



Figura 4. Toma de densidad diaria



Figura 5. Bazuqueos diarios en depósito

4.3.2. Conservación de los vinos de la fermentación a su análisis

Una vez terminada la fermentación alcohólica, los vinos fueron descubados para separar la parte líquida de la parte sólida, compuesta por las pepitas y las pieles de la propia uva utilizadas para la maceración.

El vino obtenido se dispuso en garrafas de vidrio, comúnmente conocidas como damajuanas. En este momento se añadieron las bacterias lácticas responsables de la fermentación maloláctica y se taparon con tapones de silicona hasta que la misma hubiera concluido. Para conocer en qué momento ha terminado la fermentación maloláctica se lleva a cabo una cromatografía en papel.



Figura 6. Descube del vino tinto



Figura 7. Damajuana para fermentación maloláctica

- **CROMATOGRAFÍA EN PAPEL:** se prepara un papel de celulosa y una disolución de butanol y ácido acético con un indicador (azul de bromofenol). Se marca el papel con el nombre de cada muestra y se mancha en el lugar indicado con una gotita de cada vino. El papel se introduce en la disolución preparada y el líquido va ascendiendo, arrastrando los ácidos del vino y mostrándose con una coloración amarilla para poder distinguirlos. El ácido láctico es el más soluble, y por tanto ascenderá más en el papel, el siguiente será el ácido málico y el último y por tanto el que más abajo estará es el ácido tartárico. A medida que la fermentación maloláctica va avanzando, la mancha del medio de ácido málico va desapareciendo y va apareciendo la de arriba, la del ácido láctico (Blouin, 1992).

El siguiente paso fue embotellar el vino (evitando utilizar el material precipitado), tapar con tapón de corcho natural y dejar en lugar fresco y seco hasta el momento de su análisis.

4.3.3. Parámetros generales. (UE 2019/935)

° **Brix mosto.** Los grados Brix son una medida que nos permite conocer los niveles de azúcar en el mosto, para con ello poder estimar el porcentaje de alcohol probable que tendrán los vinos terminados. Esta medida se lleva a cabo con un higrómetro.

Las primeras medidas realizadas a los vinos tras pasar 14 meses en botella, fueron:

Grado alcohólico. El alcohol es el principal producto de la fermentación del mosto y entre los diferentes tipos de alcoholes que podemos encontrar, el etanol es el mayoritario. El grado alcohólico de un vino es el número de litros de etanol contenidos en 100 L de vino, a 20°C. El método utilizado para su determinación es la aerometría. Esta consiste en una separación del alcohol del vino por destilación para posteriormente medir la densidad del destilado, utilizando un densímetro y leyendo el punto de inmersión. Una vez obtenida la densidad, gracias a tablas de conversión podemos saber el grado alcohólico del vino.

pH. Para la medición del pH se utiliza un pH-metro, calibrado previamente sumergiendo el electrodo del mismo en soluciones patrón de pH 7.00 y 4.00. Una vez calibrado, se procede a la lectura del pH del vino sumergiendo el electrodo en una muestra del mismo.

Acidez volátil. La acidez volátil hace referencia al contenido de ácidos grasos presentes en el vino, como: acético, fórmico, propiónico o butírico. No debe incluirse en su medida a los ácidos que pueden ser arrastrados por el vapor (láctico, succínico, sórbico, ni dióxido de carbono y dióxido de azufre). El método utilizado para esta determinación ha sido el García-Tena. Este consiste en una destilación fraccionada de 11 mL de vino, recogiendo 5,1 mL en una probeta y 3,2 mL en otra. El líquido de la segunda probeta se valora con una solución de hidróxido sódico 1/49 M, utilizando como indicador la fenolftaleína. La valoración se da por finalizada cuando el líquido alcanza una coloración ligeramente rosada, anotando el volumen gastado y aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Acidez Volátil (g/L de ácido acético)} = N' \cdot 0,366$$



Figura 8. Destilación fraccionada



Figura 9. Coloración indicativa del final de la valoración

Acidez total. La acidez total es la suma de todas las acideces valorables que contiene el vino, excluyendo aquellas que son resultado de la adición de, por ejemplo, dióxido de carbono y dióxido de azufre. La OIV establece que el método oficial de medición de la acidez total debe hacerse anotando el volumen de solución de hidróxido sódico 0,1 M gastado al valorar 20 mL de vino, previamente desgasificado, hasta alcanzar pH 7.00. El resultado de multiplicar dicho volumen por 0,75 nos permitirá expresar la acidez total en gramos por litro de ácido tartárico.

$$\text{Acidez total (g/L de ácido tartárico)} = n \cdot 0,75$$



Figura 10. Proceso de medición de la acidez total con pH-metro

4.3.4. Compuestos fenólicos

Los materiales utilizados para la determinación de los siguientes índices serán: en primer lugar un espectrofotómetro que permita medir absorbancias en el espectro visible y el ultravioleta. Será necesario además contar con cubetas tanto de cuarzo como de vidrio, cuya utilización dependerá del rango en el que nos encontremos (cuarzo para el ultravioleta), además de cubetas de diferentes espesores, utilizando aquella que, según la intensidad de la muestra, nos permita obtener una absorbancia con valores comprendidos entre 0,2 y 1,2. Es muy importante a la hora de realizar los cálculos tener siempre en cuenta la cubeta utilizada y las diluciones hechas.

- ❖ Por una parte se encuentran aquellos parámetros responsables del color:

Intensidad colorante y Tonalidad (Glories, 1978): El color del vino es uno de los atributos fundamentales para su caracterización y uno de los factores que nos marcan su calidad. La intensidad colorante se determina sumando las densidades ópticas de una muestra a 420, 520 y 620 nm, longitudes de onda correspondientes a los colores amarillo, rojo y azul, respectivamente. En este caso se utiliza una cubeta de 10 mm de paso óptico, teniendo en cuenta posteriormente la dilución. Como blanco se utiliza agua destilada.

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

Por otro lado, la tonalidad es la característica de la sensación visual que suscita los nombres de los colores de un vino. Su valor indica la importancia del color amarillo frente al color rojo, haciendo que los vinos jóvenes que tienen menos amarillo, tengan menos tonalidad.

$$\text{Tonalidad} = A_{420}/A_{520} \cdot 100$$

Índice de PVPP (Blouin, 1977): El índice de polivinilpirrolidona muestra la cantidad de combinaciones antociano-tanino de un vino. Una mayor combinación implica mayor estabilidad de color, menor oxidación de antocianos y menor astringencia de taninos.

Para su determinación hay que diluir el vino 1/5 con agua destilada y añadir 1 mL de la dilución, más 1 mL de PVPP 0,6%. Dejar reposar unos 10 minutos y añadir 3 mL de TCA al 20%. Dejar otros 10 minutos y leer a 280 nm la absorbancia del sobrenadante resultante de centrifugar, utilizando la cubeta de 10 mm (DO_1). Se utilizó la cubeta de 5 mm y como blanco, TCA al 6%.

$$\text{Índice PVPP (\%)} = [(DO_0^* - DO_1/DO_0^*)] \cdot 100$$

*Siendo DO_0 la absorbancia a 280 utilizada para el IPT.

Antocianos totales. método de Puissant-León (Blouin, 1992): Se mide la absorbancia de una muestra (0,2 mL) diluida en una solución de HCL 1M (3,8 mL) a 520 nm, la cual hemos dejado reposar durante 3h antes de la lectura. Como blanco se utiliza el ácido clorhídrico utilizado para la dilución, y como cubeta, la de 5 mm de paso óptico.

$$A \text{ (mg/L)} = A_{520} \cdot 20 \cdot \text{dilución}$$

❖ Por otro lado tenemos aquellos parámetros responsables de la astringencia:

Índice de Polifenoles Totales (Ribéreau-Gayon y Stonestreet, 1966), (Ribéreau-Gayon et al., 1979): El IPT permite valorar la totalidad de los compuestos polifenólicos de los vinos. Para ello se mide la absorbancia con espectrofotómetro a 280 nm de una muestra de vino diluida 1/50 o 1/100, utilizando una cubeta de 10 mm de paso óptico y como blanco el agua destilada.

$$IPT = A_{280} \cdot \text{dilución}$$

Taninos condensados totales (Ribéreau-Gayon y Stonestreet, 1966), (Ribéreau-Gayon et al., 1975): Los taninos son compuestos fenólicos que precipitan con la presencia de proteínas en solución. Estos taninos condensados, también conocidos como procianidinas o proantocianidinas son transformables en antocianidinas rojas por calentamiento en medio ácido. Esta propiedad es utilizada en este método para detectar la cantidad de taninos en el medio.

Para la determinación se rellenan dos tubos iguales con 1 mL de vino diluido anteriormente 1/50, más 0,5 mL de agua destilada y 3 mL de HCl 12N. Todos los tubos se tapan herméticamente y se protegen de la luz con papel aluminio. Uno de los tubos (Tubo 1) se calienta a 100°C durante 30 minutos (se enfriará después con agua y hielo) y el otro (Tubo 2), se deja a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, a ambos se les añade 0,5 mL de etanol al 96% y se leen sus absorbancias a 550 nm con cubetas de 10 mm de paso óptico, utilizando agua destilada como blanco.

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

*Siendo A_1 la absorbancia del tubo que se calienta a 100°C (Tubo 1) y A_2 la absorbancia del tubo que se deja a temperatura ambiente (Tubo 2).

Índice de Etanol (Glories, 1984): Los taninos, cuando se combinan con sales, péptidos y polisacáridos en presencia de altas concentraciones de etanol, precipitan. Por ello, una forma de calcular el contenido de polifenoles de un vino, es aumentar su grado alcohólico con etanol al 96% a razón 1/10. Tras un día de reposo a temperatura ambiente, se centrifuga, se diluye el sobrenadante 1/10 con agua destilada y se mide la absorbancia a 280 nm en cubeta de 10 mm, obteniéndose así A_2 . Al mismo tiempo, se determina la absorbancia a la misma longitud de onda del vino original diluido 1/100 con agua destilada, lo que llamaremos A_1 .

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

Índice de DMACH (Vivas *et al.*, 1994): Consiste en estimar el grado de polimerización de los taninos, utilizando el aldehído p-dimetilaminoacetaldehído (DMACH). Este aldehído presenta alta reactividad con las procianidinas, dando lugar a un compuesto que puede ser valorado por colorimetría. Cuando más alto sea el grado de polimerización, la reacción dará menos coloración.

Para su determinación, se diluye el vino con metanol a razón 1/20. De esta dilución se cogen 0,5 mL y se le añaden 2,5 mL de reactivo DMACH. Tras 10 minutos, se lee la absorbancia a 640 nm (D_m). Como testigo se utiliza la medición de la absorbancia a 640 nm tras haber pasado 10 minutos de la preparación de 0,5 mL del vino diluido con 2,5 mL de metanol (D_t). Se usa la cubeta de 2 mm de paso óptico y metanol como blanco.

$$\text{Índice de DMACH(\%)} = (D_m - D_t)/[\text{taninos}] \cdot 100$$

4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos en laboratorio son analizados estadísticamente mediante el uso del programa Statgraphics centurión XVI.II. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para estudiar qué diferencias provocan las levaduras de fermentación sobre los componentes generales y polifenólicos de los vinos, y además si esas diferencias son las mismas para las tres variedades de uva ensayadas: Merlot, Cabernet Sauvignon y Garnacha.

Gracias a este análisis obtenemos valores como el Ratio-F, que mide la variación existente entre los datos de cada uno de los grupos y el Valor-P, que nos indica si hay diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes niveles (si Valor-P < 0,05) o si, por el contrario, no hay diferencias estadísticamente significativas (si Valor-P > 0,05), con un nivel del 95,0 % de confianza.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados obtenidos en cuanto al comportamiento de las dos cepas de levaduras seleccionadas en comparación con el comportamiento de las levaduras indígenas de cada variedad. Esto se realiza con el objetivo de decidir qué levadura o combinación de ellas es la que proporciona mejores características a los vinos de cada variedad.

5.1. EVOLUCIÓN DE LOS VINOS DURANTE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

En el caso de los vinos de la variedad Merlot, la fermentación alcohólica comenzó el 25 de septiembre y acabó el 5 de octubre, con temperaturas que rondaban los 26,4 ° C. En la **Figura 11** se puede observar que a partir del noveno día, las densidades ya comenzaron a ser estables, indicador del final de la fermentación alcohólica. El inicio de la fermentación fue más lento en el ensayo control donde no se inoculó ninguna cepa de levadura, sin embargo, del cuarto al quinto día se produjo un marcado descenso de la misma, alcanzando densidades cercanas a las que tenían los otros dos ensayos. Cabe destacar además que los depósitos que contenían la levadura 22H han sido los que menores valores de densidad han dado.

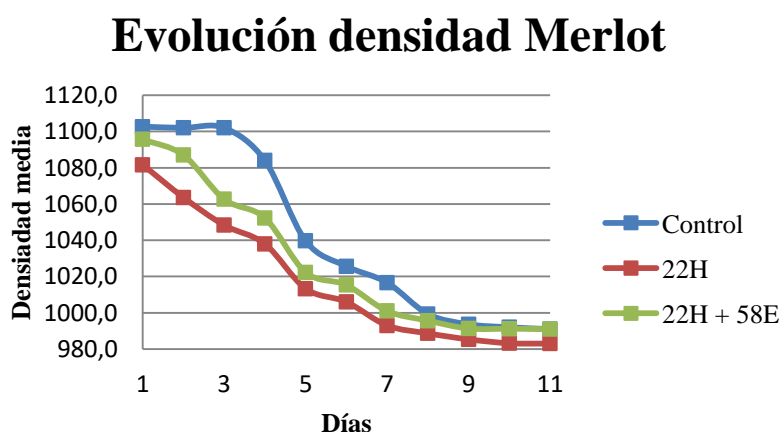


Figura 11. Evolución de la densidad del vino de Merlot durante la fermentación alcohólica.

La **Figura 12** muestra la evolución de los vinos elaborados con Cabernet Sauvignon. Estos comenzaron la fermentación el día 8 de octubre y la acabaron diez días más tarde, el 18 del mismo mes, con temperaturas alrededor de los 27,4 ° C. En este caso, tanto los depósitos control como los inoculados con levaduras 22H + 58E se mantuvieron con densidades poco cambiantes hasta el tercer día, a partir del cual comenzaron a descender. Al igual que en el caso anterior, los depósitos que presentaron valores de densidades menores fueron aquellos que utilizaron la levadura 22H del género *Saccharomyces cerevisiae* como levadura de fermentación alcohólica.

Evolución densidad C. Sauvignon

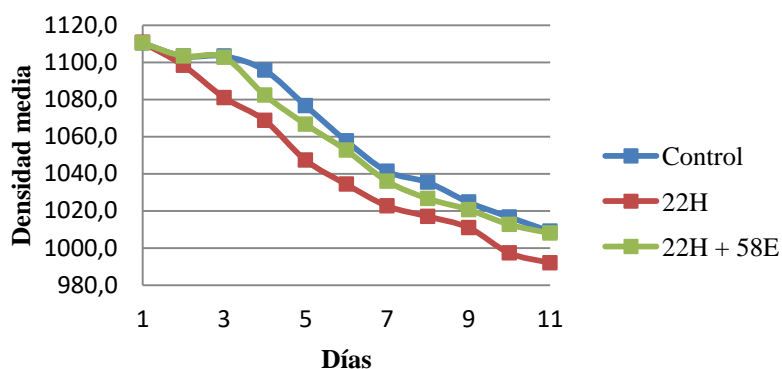


Figura 12. Evolución de la densidad del vino de Cabernet durante la fermentación alcohólica.

Por último, la fermentación de los vinos elaborados con variedad Garnacha, representada en la **Figura 13**, se llevó a cabo del 3 al 13 de octubre, con temperaturas de unos 25,1 ° C. Al igual que ocurría en los casos anteriores, el ensayo control fue el que más tardó en comenzar a disminuir la densidad, así como el ensayo que tenía la levadura 22H fue el que presentó valores de densidades menores.

Evolución densidad Garnacha

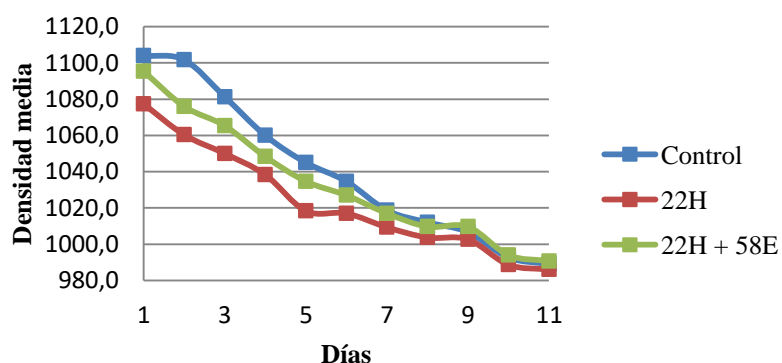


Figura 13. Evolución de la densidad del vino de Garnacha durante la fermentación alcohólica.

5.2. CROMATOGRAFÍA EN PAPEL

De las cromatografías en papel realizadas a los vinos de las tres variedades el día 12 de noviembre de 2019, podemos observar que: en ese momento, tanto los vinos de Merlot como los de Garnacha habían terminado la fermentación maloláctica, mientras que a los de Cabernet Sauvignon todavía les faltaban unos días para terminarla, puesto que en el centro del papel aún aparecían unas manchas amarillas, muestra de presencia de ácido málico.

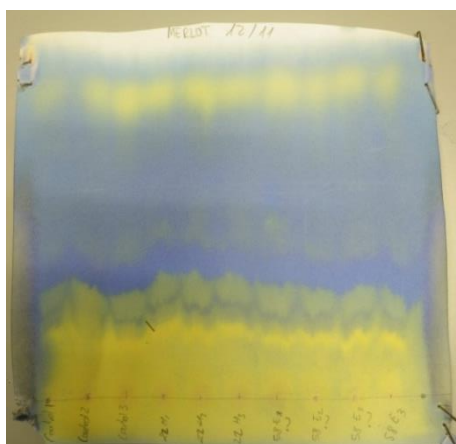


Figura 14. Cromatografía en papel Merlot

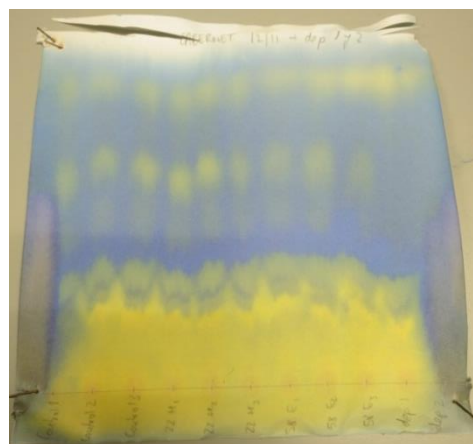


Figura 15. Cromatografía en papel Cabernet Sauvignon

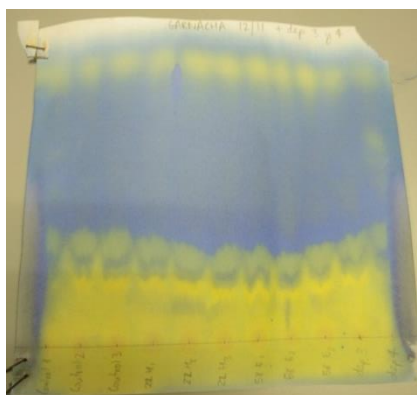


Figura 16. Cromatografía en papel Garnacha

5.3. CATA DE VINOS

Transcurridos tres meses desde el embotellado de los vinos, se llevó a cabo una cata de los mismos. En ella se valoraron diferentes aspectos del vino, realizando un examen visual, olfativo y gustativo, así como una calidad global (equilibrio-armonía). Se puntuó del 1 al 10, siendo el 1 “muy deficiente o sensación muy débil” y el 10 “excelente o sensación muy intensa”. Las variaciones en los datos (ratio-F) de las catas se muestran más adelante.

5.4. EFECTO DE LAS DIFERENTES LEVADURAS EN LOS PARÁMETROS GENERALES Y POLIFENÓLICOS DE LOS VINOS ELABORADOS CON MERLOT.

Todos los mostos, fueron analizados para obtener los valores de °Brix iniciales. Posteriormente, una vez realizada la vinificación y tras los meses de conservación en botella, los vinos fueron sometidos a los diferentes análisis anteriormente explicados, mostrándose a continuación los valores medios y desviaciones típicas de los parámetros generales obtenidos para los vinos de Merlot, así como los valores de ratio-F y el valor-P, obtenidos gracias a un estudio estadístico ANOVA.

En la **Tabla 1**, las columnas que presentan diferentes letras muestran que existe una diferencia significativa entre las diferentes levaduras utilizadas, al 95% de nivel de confianza, para el parámetro señalado. Por este motivo, esos mismos parámetros presentan un valor-P inferior a 0,05. Para esta variedad de uva, únicamente encontramos diferencias significativas en el pH y la acidez total de los diferentes vinos obtenidos.

Podemos observar que los depósitos destinados a cada tipo de levadura se han escogido de forma que los °Brix iniciales del mosto sean lo más parecidos posibles. Esto hace que, puesto que el azúcar es el sustrato que consumen las levaduras durante la fermentación para formar el alcohol presente, el **grado alcohólico** tampoco presente diferencias significativas. Sin embargo, el grado alcohólico, resulta mayor en las vinificaciones llevadas a cabo sin inoculación de levaduras, por lo que se puede deducir que tanto la levadura *Saccharomyces* 22H como la no-*Saccharomyces* 58E pueden tener un rendimiento alcohólico algo inferior a las levaduras salvajes y por tanto, podrían ser buenas levaduras para contrarrestar los efectos producidos por el cambio climático que provoca una mayor concentración de azúcar en las uvas.

En cuanto al **pH** obtenido, supera los 3,70 en las tres vías de vinificación, asegurándonos que no habrá problemas microbiológicos posteriormente. La **acidez total** es superior a 3,5 g/L en ácido tartárico, como marca la normativa, por lo que en este caso no sería necesario realizar una corrección de acidez. Las diferencias encontradas en las vinificaciones en este parámetro pueden ser debidas a la heterogeneidad de la materia prima, ya que únicamente se equilibraron los ensayos con respecto al °Brix.

Por último, los valores de **acidez volátil** que presentan los vinos rondan los 0,55 g/L en ácido acético, valores aceptables si contamos con que el límite máximo en vinos tintos es de 0,9 g/L (O. 2/2011, de 24 de agosto). No existen diferencias significativas, es decir, las levaduras seleccionadas 22H y 58E no producen una cantidad de ácido acético diferente a las levaduras salvajes, lo cual invalidaría su utilización.

Tabla 1. Medias, desviaciones y ANOVA de los parámetros convencionales de los vinos elaborados con Merlot

	° Brix iniciales mosto	° alcohólico	pH	Acidez volátil (g/L acético)	Acidez total (g/L tartárico)
Control	24,45 ± 0,10 a	13,42 ± 0,55 a	3,80 ± 0,02 b	0,52 ± 0,02 a	4,90 ± 0,26 a
22H	24,45 ± 0,23 a	13,32 ± 0,23 a	3,72 ± 0,02 a	0,56 ± 0,06 a	5,86 ± 0,24 b
22H + 58E	24,45 ± 0,23 a	13,10 ± 0,00 a	3,72 ± 0,01 a	0,56 ± 0,08 a	5,55 ± 0,10 b
Ratio-F	0,00	0,66	30,89	0,49	16,47
Valor-P	1,0000	0,5502	0,0007	0,6357	0,0037

*Columnas con la misma letra indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes levaduras.

En la **Tabla 2** se muestran los valores de los parámetros relacionados con el color de los vinos elaborados con Merlot, analizados tras 14 meses embotellados. De todos ellos, tras la realización del análisis estadístico ANOVA, únicamente el tono es el que presenta diferencias significativas. El resto de parámetros, como son la intensidad colorante, el índice PVPP y los antocianos totales, se comportan de manera que no existen diferencias significativas entre las medias para las diferentes levaduras.

El análisis de los **antocianos totales** es un parámetro que nos da una idea de la cantidad de antocianos presente en los vinos. En la **Tabla 2** podemos observar que al combinar la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* 22H con la de *No-Saccharomyces cerevisiae* 58E, se consigue obtener una mayor cantidad de antocianos totales, a pesar de no encontrar diferencias estadísticamente significativas. En este caso, la menor concentración de antocianos corresponde a los vinos control, lo que coincide con una menor **intensidad colorante**. Este hecho se puede atribuir a que las levaduras 22H y 58E tienen menor capacidad de adsorción de compuestos colorantes en su pared celular; o bien a la presencia de enzimas con actividad β-glucosidasa en las levaduras de fermentación espontánea, las cuales provocan la ruptura del enlace β-glucosídico entre el antociano y el azúcar, liberando los antocianos y consiguiendo que resulten más oxidables en el vino control, lo que lleva a una disminución de la IC (Huang, 1995 y Morata *et al.*, 2005). Tampoco hay que olvidar la inevitable heterogeneidad de la materia prima en las vinificaciones.

Sin embargo, como sabemos, no todos los antocianos se presentan en forma libre. En este sentido, el **Índice de PVPP** determina la cantidad de antocianos combinados con taninos que existe (Blouin, 1977). Como hemos comentado anteriormente, ciertas levaduras pueden dar lugar a acetaldehído y ácido pirúvico. La presencia de acetaldehído, además de combinar SO₂, permite la formación de puentes de etilo entre antocianos y taninos, estabilizando el color, y por lo tanto la intensidad colorante (Zamora, 2003). En el caso de Merlot, la combinación de cepas 22H y 58E evidencia una mayor combinación antociano-tanino, proporcionando mayor estabilidad al vino, menor oxidación de antocianos y menor astringencia de taninos, aunque sin diferencias significativas con respecto al control.

La **tonalidad** sí presenta diferencias significativas, siendo el ensayo que utiliza LSA *Saccharomyces Cerevisiae* el que presenta valores inferiores, por lo que entendemos que estos vinos tienen menos parte de amarillo frente al rojo, es decir, menos tonalidad. En general, todos los ensayos presentan valores superiores a 80, indicando que son vinos jóvenes pero ya con un poco de evolución. El tono es inversamente proporcional a la IC, en el caso de los vinos de la variedad Merlot, se cumple para los vinos fermentados con la levadura 22H, pero no en los ensayos control ni en la combinación de las levaduras 22H y 58E.

Tabla 2. Medias, desviaciones y ANOVA de los parámetros relacionados con el color de los vinos elaborados con Merlot

	IC	Tono	Índice PVPP (%)	Antocianos totales (mg/L)
Control	7,76 ± 0,35 a	89,54 ± 0,42 b	25,47 ± 6,05 a	194,44 ± 8,77 a
22H	8,36 ± 0,29 a	87,91 ± 0,96 a	30,14 ± 0,80 a	198,66 ± 10,19 a
22H + 58E	8,03 ± 0,96 a	90,16 ± 1,80 b	30,24 ± 2,79 a	203,70 ± 11,36 a
Ratio-F	1,49	6,99	2,96	1,87
Valor-P	0,2578	0,0072	0,0823	0,1759

*Columnas con la misma letra indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes levaduras.

La **Tabla 3** muestra la media, desviación típica y los valores del análisis estadístico realizado a los parámetros que influyen en la astringencia de los vinos elaborados con la variedad Merlot, para cada una de las levaduras empleadas. Solo se encuentran diferencias en los valores de **Índice de Polifenoles Totales (IPT)** de los diferentes ensayos, siendo el que combina *Saccharomyces* con *No-Saccharomyces* (22H y 58E) el que presenta valores inferiores. La concentración de IPT está muy relacionada con las concentraciones de antocianos y taninos. Al no hallarse diferencias significativas en la concentración de **taninos**, se puede pensar que las variaciones de IPT, pueden deberse a la concentración de antocianos (como se explicó en el apartado anterior) o a la inevitable heterogeneidad de la materia prima.

El **Índice de Etanol** está relacionado con la proporción de taninos unidos a polisacáridos. En este caso no hay diferencias significativas entre las tres vías de vinificación, pero es cierto que la vinificación control presenta menos porcentaje de este índice. Es muy probable que las cepas 22H y 58E, aporten en su autólisis una proporción de polisacáridos procedentes de las paredes celulares que favorece la unión de éstas a taninos, incrementando así ligeramente sus valores. En cualquier caso, esto se debe a la propiedad que tienen las levaduras 22H y 58E de liberar polisacáridos de su pared celular al medio, por la actividad β -glucanasa, estas uniones ayudarán a la suavización de la astringencia y proporcionarán más untuosidad al vino (Del Barrio-Galán *et al.*, 2015).

Por último, el **índice de DMACH** estima el grado de polimerización de los taninos, y tiene una lectura inversa (Vivas, 1994). La polimerización de taninos aumenta con el tiempo, durante la crianza, los trasiegos, y también con la presencia de acetaldehído, que permite reacciones cruzadas entre los taninos. Llega un momento que el tamaño es demasiado elevado y se produce una precipitación. La polimerización tiene como consecuencia una estabilización del color, una disminución del amargor y la astringencia así como un aumento de las sensaciones de complejidad y volumen en boca. En este caso, la combinación de levadura *Saccharomyces cerevisiae* con levadura No-*Saccharomyces cerevisiae* (22H y 58E) es la que presenta menores valores de Índice de DMACH, es decir, mayor grado de polimerización, aunque sin diferencias significativas, debido a la síntesis de acetaldehído por las levaduras seleccionadas, provocando un efecto similar al encontrado en el Índice de Etanol (Monagas *et al.*, 2005).

Tabla 3. Medias, desviaciones y ANOVA de los parámetros relacionados con la astringencia de los vinos elaborados con Merlot

	IPT	Taninos condensados totales (g/L)	Índice Etanol (%)	Índice DMACH (%)
Control	46,84 ± 2,31 b	2,16 ± 0,11 a	16,16 ± 6,14 a	84,10 ± 4,95 a
22H	47,01 ± 0,53 b	2,39 ± 0,42 a	17,47 ± 2,47 a	80,11 ± 17,46 a
22H + 58E	43,96 ± 1,19 a	2,14 ± 0,16 a	17,04 ± 3,19 a	77,81 ± 4,34 a
Ratio-F	7,49	1,66	0,15	0,52
Valor-P	0,0055	0,2225	0,8635	0,6029

*Columnas con la misma letra indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes levaduras.

5.5. EFECTO DE LAS LEVADURAS EN LOS PARÁMETROS GENERALES Y POLIFENÓLICOS DE LOS VINOS ELABORADOS CON CABERNET SAUVIGNON.

Los vinos de variedad Cabernet Sauvignon se han llevado a cabo de la misma forma que los explicados anteriormente. En la **Tabla 4** se exponen los valores medios y desviaciones típicas de los parámetros generales, así como los valores de razón-F y el valor-P, obtenidos gracias al estudio estadístico.

Al igual que antes, únicamente encontramos diferencias significativas en los parámetros de pH y acidez total. Del mismo modo, se observa que se consigue que las medias de los **°Brix** de los depósitos destinados a cada vinificación sean lo más parecidas posibles, no presentando diferencias significativas. Lo mismo ocurre con el **grado alcohólico**, con valores en torno a los 14,5°, aunque igual que como ocurría para el ensayo realizado con la variedad Merlot, aparece un inferior rendimiento alcohólico con las levaduras 22H y 58E, teniendo una aplicación tecnológica muy importante para paliar los efectos del cambio climático que aumentan el grado alcohólico de los vinos.

Los valores de **pH** oscilan entre los 3,57 y los 3,7, mostrando valores superiores los vinos control que utilizaron en la fermentación las levaduras de la propia uva. Al igual que ocurría antes, con estos valores de pH y de grado alcohólico evitamos futuros problemas microbiológicos. Por otro lado, la **acidez total** es elevada, con valores cercanos a 6 g/L en ácido tartárico e incluso llegando a superar este nivel en el caso de las vinificaciones llevadas a cabo con las propias levaduras de la uva (control), al igual que ocurría con los vinos de Merlot. Como se comentó anteriormente estas diferencias se pueden deber a la heterogeneidad de la materia prima, ya que se agruparon para equilibrar, teniendo en cuenta únicamente los valores de °Brix.

El comportamiento de las levaduras ensayadas con respecto a los valores de la **acidez volátil** coincide con los resultados obtenidos y comentados anteriormente con la variedad Merlot. Sin embargo, cabe destacar que en el caso de la vinificación que utiliza una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* combinada con una que no lo es (22H + 58E), ese valor de acidez volátil es superior que en el resto de ensayos sin encontrar diferencias significativas.

Tabla 4. Medias, desviaciones y ANOVA de los parámetros convencionales de los vinos elaborados con Cabernet Sauvignon

	° Brix iniciales mosto	° alcohólico	pH	Acidez volátil (g/L acético)	Acidez total (g/L tartárico)
Control	26,2 ± 0,17 a	14,67 ± 0,42 a	3,59 ± 0,02 a	0,54 ± 0,06 a	6,43 ± 0,32 b
22H	26,2 ± 0,10 a	14,47 ± 0,21 a	3,68 ± 0,02 c	0,55 ± 0,04 a	5,80 ± 0,13 a
22H + 58E	26,27 ± 0,06 a	14,40 ± 0,10 a	3,64 ± 0,02 b	0,61 ± 0,02 a	5,99 ± 0,30 ab
Ratio-F	0,31	0,76	25,74	2,58	4,29
Valor-P	0,7461	0,5060	0,0011	0,1554	0,0696

* Columnas con la misma letra indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes levaduras.

En la **Tabla 5** se muestran los parámetros relacionados con el color de los vinos de Cabernet Sauvignon. Tras el análisis de la varianza, tanto el IC, como el tono, como los antocianos totales presentan diferencias significativas entre los diferentes ensayos.

Al igual que ocurría con la variedad Merlot, el ensayo que combina la levadura *Saccharomyces* con la No-*Saccharomyces* (22H y 58E) es el que presenta mayor cantidad de **antocianos totales**. Como ya se había comentado, este hecho puede deberse a que las levaduras del ensayo control poseen más actividad β-glucosidasa (Hernández *et al.*, 2003) o porque las 22H + 58E tienen menor capacidad de adsorción de compuestos colorantes en su pared celular (Huang, 1995 y Morata *et al.*, 2005). Sin embargo, una mayor concentración de antocianos, no se ha visto reflejada en un valor más alto de IC, siendo los vinos control los que poseen valores más altos, debido probablemente al efecto de heterogeneidad de la materia prima en las vinificaciones. Hay que tener en cuenta además que la variedad Cabernet Sauvignon posee una carga polifenólica superior a la variedad Merlot.

En lo que se refiere a los análisis de **Índice PVPP**, tal y como sucedía con los ensayos realizados con la variedad Merlot, no se encontraron diferencias significativas, pero los mayores valores corresponden a los ensayos en los que participan la levadura 22H sola o en combinación con 58E. Este efecto puede atribuirse a la presencia de más acetaldehído sintetizado por las lavaduras seleccionadas a diferencia de las levaduras indígenas permitiendo una mejor estabilización del color, gracias a las uniones antociano-tanino mediadas por acetaldehído (Monagas *et al.*, 2005).

Por último, también encontramos diferencias significativas en la **tonalidad**, siendo el ensayo control el que menos tiene, seguido del ensayo que combina levadura *Saccharomyces* con No-*Saccharomyces*, y por último el método que utiliza únicamente *Saccharomyces cerevisiae*, que es el que mayor tonalidad tiene. Estos valores son lógicos e inversamente proporcionales a los valores de IC. En este caso, encontramos menos tono en los vinos de Cabernet Sauvignon que en los de Merlot, es decir, tienen menor tendencia a la oxidación debido a que la concentración de taninos es superior en la variedad Cabernet Sauvignon que en la Merlot.

Tabla 5. Medias, desviaciones y ANOVA de los parámetros relacionados con el color de los vinos elaborados con Cabernet Sauvignon

	IC	Tono	Índice PVPP (%)	Antocianos totales (mg/L)
Control	13,95 ± 0,54 b	73,15 ± 0,58 a	29,78 ± 2,17 a	281,88 ± 5,89 a
22H	12,17 ± 0,40 a	76,66 ± 1,63 c	33,10 ± 3,04 a	278,16 ± 10,32 a
22H + 58E	12,32 ± 0,61 a	74,98 ± 1,46 b	32,43 ± 5,93 a	295,90 ± 9,34 b
Ratio-F	21,04	13,57	1,13	10,39
Valor-P	0,0000	0,0004	0,3498	0,0006

* Columnas con la misma letra indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes levaduras.

La **Tabla 6** muestra los parámetros relacionados con la astringencia de los vinos de Cabernet Sauvignon. En este caso, ninguno de ellos muestra diferencias significativas entre el uso de unas levaduras u otras. En cuanto al **IPT**, todos los ensayos muestran valores superiores a 50, siendo superiores a los que mostraban los vinos de Merlot, puesto que Cabernet Sauvignon por norma general presenta siempre valores superiores, en torno a los 60 de IPT. En este caso, los valores de IPT se consideran buenos para elaborar buenos vinos de crianza.

La cantidad de **taninos condensados** es ligeramente superior en los vinos de Cabernet Sauvignon respecto a los vinos de Merlot. Los valores se acercan más a los 3 g/L de taninos condensados totales, por lo que son valores cercanos a los que se requieren en la elaboración de un gran vino gracias a su alto poder antioxidante.

El **Índice de Etanol** no presenta diferencias significativas para ninguno de los ensayos realizados con la variedad Cabernet Sauvignon, pero cabe destacar que el ensayo control tiene valores superiores y que la combinación de 22H y 58E, valores inferiores, comportándose de manera opuesta a lo observado en la **Tabla 3** correspondiente a la variedad Merlot. En este caso no se observa el efecto de la autólisis en la unión de los polisacáridos a levaduras.

El **Índice de DMACH** tampoco tiene diferencias significativas, todos los ensayos de vinificación presentan valores muy cercanos a 55. Por otro lado, si se compara con los valores de índice de DMACH de los vinos de Merlot, observamos que en este caso los valores en Cabernet Sauvignon son inferiores, por lo que el tanino está más polimerizado y al igual que ocurría con el Índice de PVPP se percibe el efecto del acetaldehído en su estabilización descrito por Zamora (2003) y Monagas (2005).

Tabla 6. Medias, desviaciones y ANOVA de los parámetros relacionados con la astringencia de los vinos elaborados con Cabernet Sauvignon

	IPT	Taninos condensados totales (g/L)	Índice Etanol (%)	Índice DMACH (%)
Control	54,55 ± 2,14 a	2,76 ± 0,28 a	23,44 ± 4,70 a	55,74 ± 6,03 a
22H	52,08 ± 2,55 a	2,62 ± 0,31 a	21,12 ± 5,44 a	55,18 ± 3,68 a
22H + 58E	52,57 ± 5,86 a	2,71 ± 0,44 a	19,41 ± 8,77 a	53,82 ± 10,46 a
Ratio-F	0,67	0,26	0,57	0,11
Valor-P	0,5253	0,7740	0,5757	0,8966

* Columnas con la misma letra indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes levaduras.

5.6. EFECTO DE LAS LEVADURAS EN LOS PARÁMETROS GENERALES Y POLIFENÓLICOS DE LOS VINOS ELABORADOS CON GARNACHA.

Por último, los vinos elaborados con la variedad Garnacha se llevaron a cabo de la misma manera que los anteriores. En la **Tabla 7** podemos observar el análisis estadístico realizado a los parámetros convencionales de estos vinos. Únicamente la acidez total presenta diferencias significativas provocadas por la inevitable heterogeneidad entre la materia prima de los tres ensayos. En este caso, además, no aparece el efecto observado en relación al **grado alcohólico**, y el rendimiento alcohólico de las levaduras indígenas es el mismo que el de las seleccionadas para la variedad Garnacha.

El **pH** muestra valores muy similares, siendo además la desviación que existe, muy pequeña. En esta variedad también ocurre que con estos valores de pH y de grado alcohólico no debería haber problemas microbiológicos.

Los valores de **acidez total**, presentan diferencias significativas ocasionadas por la inevitable heterogeneidad de la materia prima. Los valores de **acidez volátil** son aceptables ya que no superan los 0,9 g/L máximos permitidos (O. 2/2011, de 24 de agosto). Ninguna de las levaduras seleccionadas, produce valores de acidez volátil altos.

Tabla 7. Medias, desviaciones y ANOVA de los parámetros convencionales de los vinos elaborados con Garnacha

	° Brix iniciales mosto	° alcohólico	pH	Acidez volátil (g/L acético)	Acidez total (g/L tartárico)
Control	24,23 ± 0,40 a	13,83 ± 0,15 a	3,70 ± 0,02 a	0,52 ± 0,02 a	5,56 ± 0,19 a
22H	24,23 ± 0,35 a	13,93 ± 0,12 a	3,68 ± 0,04 a	0,57 ± 0,02 a	5,95 ± 0,08 b
22H + 58E	24,25 ± 0,22 a	13,87 ± 0,12 a	3,70 ± 0,05 a	0,59 ± 0,06 a	5,89 ± 0,10 b
Ratio-F	0,00	0,47	0,53	1,91	7,59
Valor-P	0,9975	0,6481	0,6124	0,2283	0,0228

* Columnas con la misma letra indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes levaduras.

En la **Tabla 8** encontramos los parámetros relacionados con el color de los vinos de Garnacha. Todos ellos, excepto el tono, presentan diferencias significativas, al contrario de lo que ocurría en los ensayos de Merlot.

El ensayo que utiliza únicamente levaduras del género *Saccharomyces cerevisiae* es el que tiene más cantidad de **antocianos totales**, y el ensayo control el que menos, con diferencias significativas entre ambos, presentando concentraciones intermedias de antocianos el ensayo que combina las levaduras 22H y 58E. Tal y como ocurría con el ensayo realizado con la variedad Merlot, la menor concentración de antocianos corresponde a los vinos control, coincidiendo con una menor intensidad colorante. Como ya se ha comentado, esto se puede atribuir a que las levaduras 22H poseen una menor capacidad de adsorción de compuestos colorantes en su pared celular y/o a la presencia de enzimas con actividad β -glucosidasa que provocan la ruptura del enlace β -glucosídico que hay entre el antociano y su azúcar, liberando los antocianos y consiguiendo que resulten más oxidables en el vino control provocando una disminución de la IC (Huang, 1995 y Morata *et al.*, 2005).

Por otro lado, al calcular el **Índice de PVPP**, es decir, la cantidad de antocianos combinados con taninos, la tendencia es la misma: los ensayos que utilizan la 22H obtienen índices superiores y los que utilizan las levaduras salvajes obtienen índices inferiores. Tal y como ocurrió con el ensayo de la variedad Merlot, se puede atribuir a la levadura 22H una mayor síntesis de acetaldehído que contribuya a la estabilización de la materia colorante en el proceso de fermentación, (Caboulet *et al.* 2012 y Monagas *et al.*, 2005). La presencia de acetaldehído, como ya se comentó anteriormente, combina SO₂ y permite la formación de puentes de etilo entre antocianos y taninos, estabilizando el color, y por lo tanto la intensidad colorante (Zamora, 2003).

En este caso, la vinificación con la levadura 22H o en combinación con 58E permiten mayor combinación antociano-tanino, proporcionando mayor estabilidad al vino, menor oxidación de antocianos y menor astringencia de taninos, aunque sin diferencias significativas con respecto al control, que se traducen en un incremento de los valores de Índice PVPP y en el Índice DMACH (**Tabla 8**).

La **intensidad colorante** en este caso, igual que ocurría con la variedad Merlot, es proporcional a la concentración de antocianos, gracias a la estabilidad entre antocianos y taninos comentada. Para el **tono**, no existen diferencias estadísticamente significativas, con valores cercanos a 70, siendo los valores más bajos de las tres variedades estudiadas.

Tabla 8. Medias, desviaciones y ANOVA de los parámetros relacionados con el color de los vinos elaborados con Garnacha

	IC	Tono	Índice PVPP (%)	Antocianos totales (mg/L)
Control	10,93 ± 0,19 ab	70,03 ± 1,46 a	28,11 ± 1,37 a	299,02 ± 5,97 a
22H	11,00 ± 0,33 b	69,70 ± 0,82 a	31,17 ± 2,23 b	313,89 ± 10,60 b
22H + 58E	10,60 ± 0,28 a	70,49 ± 1,83 a	30,27 ± 1,32 b	306,44 ± 6,92 ab
Ratio-F	3,58	0,56	5,16	7,63
Valor-P	0,0537	0,5821	0,0198	0,0027

* Columnas con la misma letra indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes levaduras.

Por último, la **Tabla 9** nos muestra los parámetros relacionados con la astringencia de los vinos elaborados con Garnacha. Tanto los taninos condensados totales, como el índice de DMACH presentan diferencias significativas entre los valores de los distintos ensayos. El **IPT** de los vinos de Garnacha ofrece valores intermedios entre las dos variedades anteriormente estudiadas, siendo el ensayo control el que tiene un valor más alto sin diferencias significativas.

Por otro lado, los **taninos condensados** encuentran diferencias entre los ensayos realizados con levaduras indígenas y los realizados con levaduras seleccionadas debidas probablemente al efecto de la heterogeneidad de la materia prima, ya que se han elaborado intentando mantener las mismas condiciones de fermentación, maceración, extracción de polifenoles, etc. La variedad Garnacha, resulta menos tánica que las otras variedades incluidas en este trabajo: Merlot y Cabernet Sauvignon (Saint-Cricq et al., 1998).

En este caso, la unión de taninos con polisacáridos es muy favorable para la calidad del vino ya que reduce la astringencia y mejora la untuosidad. Esto se mide mediante el **Índice de Etanol**. En este caso encontramos los valores más bajos de las tres variedades, siendo dentro de la variedad Garnacha valores muy parecidos entre los diferentes ensayos, sin presentar diferencias significativas, siendo los valores muy próximos entre sí.

El **Índice de DMACH** sí que presenta diferencias significativas, siendo el ensayo control con fermentación espontánea el que tiene valores superiores correspondiendo a taninos menos polimerizados. En este caso también los vinos de Garnacha ofrecen valores intermedios entre Merlot (valores superiores) y Cabernet Sauvignon (valores inferiores). Tal y como ocurría con Índice de PVPP, la síntesis de acetaldehído de las levaduras 22H y/o 55E, ha ocasionado una combinación de los taninos y por tanto un incremento del grado de polimerización (Caboulet *et al.* 2012 y Monagas *et al.*, 2005 y Zamora, 2003).

Tabla 9. Medias, desviaciones y ANOVA de los parámetros relacionados con la astringencia de los vinos elaborados con Garnacha

	IPT	Taninos condensados totales (g/L)	Índice Etanol (%)	Índice DMACH (%)
Control	53,36 ± 1,30 a	2,21 ± 0,15 a	15,15 ± 1,90 a	71,09 ± 1,84 b
22H	53,06 ± 2,32 a	2,50 ± 0,25 b	15,45 ± 3,59 a	61,61 ± 3,82 a
22H + 58E	51,92 ± 1,48 a	2,63 ± 0,21 b	16,13 ± 3,48 a	59,96 ± 11,51 a
Ratio-F	1,12	6,67	0,16	4,31
Valor-P	0,3518	0,0085	0,8552	0,0331

* Columnas con la misma letra indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes levaduras.

5.7. CORRELACIÓN ENTRE EL ANÁLISIS SENSORIAL Y LA COMPOSICIÓN QUÍMICA.

Los valores de Ratio-F resultantes del análisis estadístico de la cata de los vinos de las diferentes variedades se muestran a continuación.

En la **Tabla 10** se puede observar que el análisis sensorial no mostró grandes diferencias, siendo únicamente la variedad Merlot la que muestra diferencias significativas en los parámetros de intensidad del aroma, aroma a frutas rojas y negras y en la calidad global. En los tres primeros parámetros mencionados se ve claramente que los vinos de Merlot control han obtenido una mayor puntuación, siendo aquellos que utilizan levaduras seleccionadas, tanto *Saccharomyces cerevisiae* como *No-Saccharomyces cerevisiae*, los que han obtenido puntuaciones inferiores. Esto deja ver que para esta variedad en concreto, el uso de LSA disminuye la intensidad y calidad aromática, siendo esa sensación imperceptible en las otras dos variedades.

En cuanto a la calidad global, el ensayo 22H es el que muestra diferencias significativas respecto a los otros dos, siendo su puntuación inferior, prefiriendo los catadores el vino control.

Tabla 10. Resumen ratio-F del análisis sensorial

Atributo análisis sensorial	Merlot	Cabernet Sauvignon	Garnacha
Matiz	0.00	0.05	0.25
Intensidad del color	0.32	0.00	0.40
Intensidad del aroma	2.85 *	0.52	1.30
Calidad del aroma	1.40	0.09	0.12
Frutas rojas	2.77 *	0.76	0.83
Frutas negras	2.49 *	0.18	0.28
Nota regaliz	0.27	0.21	0.19
Nota vegetal	0.06	0.29	0.01
Nota floral	0.21	0.18	0.53
Nota a especias	0.26	0.13	0.22
Intensidad del gusto	1.32	0.33	0.59
Calidad del gusto	1.1	0.73	1.25
Acidez	0.31	0.22	0.08
Dulzor	0.20	0.17	0.22
Untuosidad	0.13	1.24	0.67
Astringencia	0.14	0.46	0.16
Amargos	0.03	0.04	0.29
Persistencia aromática	0.51	0.00	0.20
Calidad global	3.25 *	0.99	0.72

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Una vez obtenidos todos los resultados comprobamos si existe una relación entre el análisis sensorial de los vinos y su composición química obtenida tras las mediciones. La parte olfativa de la cata no podrá ser analizada puesto que no hemos llevado a cabo ningún análisis de aromas. Cabe además destacar que la relación podría verse afectada puesto que el análisis de parámetros químicos fue realizado 14 meses después de la cata.

En primer lugar, si observamos la intensidad colorante de los vinos de **Merlot** obtenida tras las mediciones, ni en los parámetros ni en la cata encontramos diferencias significativas entre los tres ensayos. Sin embargo, en los parámetros, el vino control es el que presenta valores más altos, mientras que en el examen visual, el más puntuado ha sido el ensayo 22H + 58E, es decir, el que combina *Saccharomyces cerevisiae* con *No-Saccharomyces cerevisiae*.

En cuanto a la astringencia de Merlot, aspecto que viene marcado principalmente por el IPT, los taninos condensados y el Índice de Etanol, el ensayo 22H es el que presenta valores superiores a pesar de que no existen diferencias significativas entre ellos. Únicamente encontramos diferencias en el IPT, siendo la combinación de *Saccharomyces* y *No-Saccharomyces* la que inferiores valores tiene. En el análisis sensorial no ocurre lo mismo, en este caso es el método control el que más puntuación ha obtenido, a pesar de no presentar tampoco diferencias significativas.

Por último con Merlot, en cuanto a la acidez, no existe relación entre el análisis sensorial y la composición química puesto que en el primero de ellos, el ensayo control es el que más acidez obtiene. Sin embargo, al analizarlos, el ensayo control es el que menos acidez ha dado.

En segundo lugar, si hablamos de **Cabernet Sauvignon** notamos que tanto en el análisis sensorial como en el químico, los vinos de esta variedad tienen más intensidad colorante que los de Merlot. En los resultados de laboratorio encontramos diferencias significativas, siendo el control el que tiene valores de IC más altos. Sin embargo, esas diferencias desaparecen en la cata, teniendo los tres ensayos puntuaciones iguales.

Si hablamos de la astringencia de estos vinos, en el análisis químico el ensayo control es el que presenta valores superiores, al igual que antes, tanto en el IPT, como en los taninos condensados como en el Índice de Etanol. Ocurre totalmente al contrario en el análisis sensorial, donde los catadores han puntuado al ensayo control como el menos astringente.

En tercer y último lugar, al observar los vinos de la variedad **Garnacha** observamos lo siguiente. Tanto en el análisis sensorial como en la composición química, los valores de intensidad colorante se encuentran entre medio de los valores del mismo parámetro de las otras dos variedades, en concreto por encima de los de Merlot y por debajo de los de Cabernet Sauvignon. Además cabe destacar que en la composición química sí que encontramos diferencias significativas en la intensidad colorante de cada ensayo, siendo el que combina 22H y 58E el que menores valores de intensidad presenta.

En cuanto a la astringencia observamos que, tanto en el análisis químico como en el sensorial, el ensayo control es el que menos cantidad de taninos obtiene. A pesar de ello, en la composición sí que existen diferencias significativas entre ensayos, mientras que en la cata no. Por otro lado, si comparamos el índice de etanol de los vinos de esta variedad con los índices de etanol de las otras dos variedades observamos que los de Garnacha son los que presentan valores más inferiores.

Por último, si hablamos de la acidez de los vinos, ambos métodos, tanto el análisis sensorial como el químico coinciden en que el uso de levadura *Saccharomyces cerevisiae* hace que este valore sea superior al del resto de ensayos para esta variedad.

6. CONCLUSIONES

Una vez realizado el estudio y obtenido los resultados, se pueden establecer las siguientes conclusiones sobre los efectos de las levaduras autóctonas y seleccionadas, tanto *Saccharomyces cerevisiae* como *No-Saccharomyces cerevisiae*, sobre la composición convencional y polifenólica de los vinos de Merlot, Cabernet Sauvignon y Garnacha:

1. La levadura *S. cerevisiae*, 22H, sola o combinada con no-*Saccharomyces*, 58E, permiten elaborar vinos menos alcohólicos que las levaduras indígenas, por lo que se podría aconsejar su empleo en aquellos años muy calurosos y que den como resultado una alta madurez en las uvas. Por el contrario, en años fríos se aconsejaría realizar las vinificaciones con las levaduras indígenas, ya que tienen mayor rendimiento alcohólico.
2. Los vinos de Garnacha destacan por su notable aroma a frutas rojas y negras, mientras que los de Cabernet Sauvignon resaltan más por sus aromas vegetales, a regaliz o especias, no habiéndose encontrado diferencias significativas en los vinos de Cabernet Sauvignon y Garnacha vinificados con las diferentes levaduras.

Teniendo en cuenta que los parámetros valorados a la hora de escoger la levadura y la variedad más óptimas para la vinificación son: una baja acidez volátil, una acidez total relativamente elevada, una gran intensidad colorante, buena estabilidad del color, alta concentración de taninos y un alto grado de polimerización de taninos, se pueden aconsejar la o las siguientes levaduras para la vinificación:

- En el caso de los vinos elaborados con Merlot, la levadura que mejor se comporta es la del género *Saccharomyces cerevisiae* en combinación con la del género No-*Saccharomyces cerevisiae*, nombrada en todo momento como 22H + 58E. Esta combinación no es la que menos acidez volátil genera, pero proporciona una buena acidez total. Es la que proporciona los mayores valores de antocianos totales, siendo además los más estables. Presenta una buena intensidad colorante y genera poca concentración de taninos pero con una buena polimerización de estos (el más bajo índice de DMACH).
- En los vinos de Cabernet Sauvignon, la levadura que cumple mejor los requisitos es la combinación de *Saccharomyces cerevisiae* con No-*Saccharomyces cerevisiae* (22H + 58E). Los vinos tienen una buena acidez total, son los que más cantidad de antocianos totales tienen y presentan un alto índice de PVPP, es decir, más cantidad de antocianos combinados, que son más estables. Estas levaduras proporcionan además una buena IC, una buena concentración de taninos totales y el menor índice de DMACH, es decir, una alta polimerización de taninos.
- En el caso de Garnacha, la levadura elegida como la más apta es la *Saccharomyces cerevisiae* (22H). Es la que genera más intensidad colorante, más concentración de taninos y además los más estables al encontrarse combinados. Proporciona además buena concentración de taninos así como una buena polimerización de los mismos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- BELDA, I.; NAVASCUÉS, E.; ALONSO, A.; MARQUINA, D. y SANTOS, A. (2014). *Microbiología del proceso de vinificación: selección de levaduras Saccharomyces cerevisiae autóctonas con óptimas propiedades enológicas*. Reduca (Biología, vol. 7, nº 1).
- BLOUIN, J. (1977). *Manuel pratique d'analyse des moûts et des vins*. Chambre d'Agriculture de la Gironde.
- BLOUIN, J. (1992). *Techniques d'analyses des moûts et des vins*. Dujardin-Salleron, 199-201.
- CABOULET, D.; DUCASSE, M.A.; ROY, A.; SCHNEIDER, R. (2012). *Influence de la souche de levure sur les qualités polyphénoliques et aromatiques des vins rouges*. Wineand Viticulture Journal. 35-42.
- CARVALHO, E.; MATEUS, N.; PLET, B.; PIANET, I.; DUFOURC, E.; DE FREITAS, V. (2006). *Influence of wine pectic polysaccharides on the interactions between condensed tannins and salivary proteins*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 54, 8936-8944.
- CASTILLO, J. S.; COMPÉS, R.; GARCÍA, J. M. (2014). *La regulación vitivinícola. Evolución en la UE y España y situación en el panorama internacional*. Serie Eco, vol. 23, 272-310.
- CHARPENTIER, C.; DOS SANTOS, A. M.; FEUILLAT, M. (2004). *Release of macromolecules by Saccharomyces cerevisiae during ageing of French flor sherry wine "Vin jaune"*. International Journal of Food Microbiology, vol. 96, 253-262.
- CIANI, M.; MACCARELLI, F. (1997). *Oenological properties of non-Saccharomyces yeasts associated with wine-making*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. Vol 14 (2), 199-203.
- CIANI, M.; COMITINI, F.; MANNAZZU, I.; DOMIZIO, P. (2010). *Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-Saccharomyces yeasts in winemaking*. FEMS Yeast Res. Vol 10 (2), 123-133.
- DEL BARRIO-GALÁN, R.; MEDEL-MARABOLÍ, M.; PEÑA-NEIRA, Á. (2015). *Effect of different aging techniques on the polysaccharide and phenolic composition and sensory characteristics of Syrah red wines fermented using different yeast strains*. Food Chemistry, vol. 179, 116-126.
- DOMIZIO, P.; TOMANI, C.; LENCIONI, L.; COMITINI, F.; GOBBI, M.; MANNAZZU, I. et al. (2011). *Outlining a future for non-Saccharomyces yeasts: selection of putative spoilage wine strains to be used in association with Saccharomyces cerevisiae for grape juice fermentation*. International Journal of Food Microbiology, vol. 147, 170-180.
- DOURNEL, J.M. (1985). *Recherches sur les combinaisons anthocianes-flavonols. Influence de ces réactions sur la couleur des vins rouges*. Tesis Doctoral, Université de Bordeaux II. 189.

- FIA, G.; GIOVANI, G.; ROSI, I. (2005). *Study of B-glucosidase production by wine-related yeasts during alcoholic fermentation. A new rapid fluorimetric method to determine enzymatic activity*. Journal of Applied Microbiology, vol. 99, 507-517.
- GLORIES, Y. (1978). *Recherches sur la matière colorant des vins rouges*. Tesis de Doctorado. Université de Bordeaux II.
- GLORIES Y. (1984). *La couleur des vins rouges: mesure, origine et interprétation*. Connaissance de la Vigne et du Vin, vol. 18, n° 4, 253-271.
- GONZALEZ-RAMOS, D.; CEBOLLERO, E.; GONZALEZ, R. (2008). *A recombinant Saccharomyces cerevisiae strain overproducing mannoproteins stabilizes wine against protein haze*. Applied and Environmental Microbiology, vol. 74, 5533-5540.
- GONZÁLEZ-ROYO, E.; URTASUN, A.; GIL, M.; KOUNTOUDAKIS, N.; ESTERUELAS, M.; FORT, F.; CANALS, J.M.; ZAMORA, F. (2013). *Efecto de la cepa de levadura y la suplementación con levaduras inactivas durante la fermentación alcohólica sobre la concentración en polisacáridos del vino tinto*. Enovicultura, vol. 24, 14–21.
- GONZÁLEZ SAN JOSÉ, M. L. (2005). *Transferencia de color de la uva al vino*. Revista enológica ACE.
- GUADALUPE, Z.; MARTÍNEZ, I.; AYESTARÁN, B. (2010). *Yeast mannoproteins in red winemaking: effect on polysaccharide, polyphenolic, and color composition*. American Journal of Enology and Viticulture, vol. 61, 191-200.
- HERNÁNDEZ, L. F.; ESPINOSA, J. C.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M.; BRIONES, A. (2003). *β-glucosidase activity in a Saccharomyces cerevisiae wine strain*. International Journal of Food Microbiology, vol. 80, 171–176.
- HUANG, H.T. (1995). *Fruit colour destruction: decolorization of anthocianins by fungal enzymes*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 3, 141-146.
- JOLLY, N. P.; AUGUSTYN, O. P. H.; PRETORIUS, I. S. (2003). *The occurrence of non-Saccharomyces cerevisiae yeast species over three vintages in four vine-yards and grape musts from four production regions of the Western Cape, South Africa*. South African Journal for Enology and Viticulture, vol. 24, 35-42.
- JOLLY, N. P.; AUGUSTYN, O. P. H.; PRETORIUS, I. S. (2006). *The role and use of non-Saccharomyces yeast in wine production*. South African Journal for Enology and Viticulture, vol. 27.
- JOLLY, N. P.; VARELA, C. & PRETORIUS, I. S. (2014). *Not your ordinary yeast: Non-Saccharomyces yeasts in wine production uncovered*. FEMS Yeast Res., vol. 14, 215-237.
- LONGO, E.; CANSADO, J.; AGRELO, D. & VILLA, T. G. (1991). *Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from northwest Spain*. American Journal of Enology and Viticulture, vol. 42, n° 2, 141-144.
- MATTIACCI, A. & ZAMPI, V. (2004). *Brunello di Montalcino: how a typical wine could revive a poor country-village*. British Food Journal, vol. 106, n° 10/11, 767-778.

- MERCADO, L., DALCERO, A, MASUELLI, R., & COMBINA, M. (2007). *Diversity of Saccharomyces strains on grapes and winery surfaces: analysis of their contribution to fermentative flore of Malbec wine from Mendoza (Argentina) during two consecutive years*. Food microbiology, vol. 24, nº 4, 403-412.
- MONAGAS, M., BARTOLOMÉ, B., & GÓMEZ-CORDOVÉS, C. (2005). *Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine*. Critical reviews in food science and nutrition, vol. 45, 85-118.
- MORATA, A.; GÓMEZ-CORDOVÉS, M. C.; COLOMO, B.; SUÁREZ, J. A. (2005). *Cell wall anthocyanin adsorption by diferent Saccharomyces strains during the fermentation of Vitis vinífera L. Cv Graciano grapes*. European Food Research and Technology, vol. 220, 341-346.
- MORATA, A.; BENITO, S.; LOIRA, I.; PALOMERA, F.; GONZÁLEZ, M. C. & SUÁREZ-LEPE, J. A. (2012). *Formation of pyranoanthocyanins by Schizosaccharomyces pombe during the fermentation of red must*. International journal of food microbiology, vol 159, 47-53.
- MORATA, A.; LOIRA, I.; HERAS, J. M.; CALLEJO, M. J.; TESFAYE, W.; GONZÁLEZ, C.; SUÁREZ-LEPE, J. A. (2016). *Yeast influence on the formation of stable pigments in red winemaking*. Food Chemistry, vol. 197, 686-691.
- Orden 2/2011, de 24 de agosto, de la Consellería de Agricultura, Pesca, Alimentación y Agua, por la que se aprueba el reglamento y pliego de condiciones de la Denominación de Origen Protegida Utiel-Requena y su consejo regulador. *Diario Oficial de la Comunidad Valenciana*. Valencia, 9 de septiembre de 2011, nº 6605.
- 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*. Front. Microbiol., vol 7, 1-20.
- RASPOR, P.; MILEK, D. M.; POLANC, J.; MOZINA, S. S.; & CADEZ, N. (2006). *Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in diferent locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia*. International journal of food microbiology, vol. 109, nº 1-2, 97-102.
- RIBEREAU-GAYON, P. y STONESTREET, E. (1966). *Dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure*. Chimie Anal, 48, 188-196.
- RIBEREAU-GAYON, J.; PEYNAUD, E.; RIBÉREAU-GAYON, P.; y SUDRAUD, P. (1975). *Sciences et Techniques du Vin*, vol. 2. Dunod, Paris.
- RIBÉREAU-GAYON, J; PEYNAUD, E.; SUDRAUD, J.; RIBÉREAU-GAYON, P. (1979). *Sciences et Techniques du Vin*, vol 1. Editorial Interamericana.
- ROJAS, V.; GIL, J.V.; PIÑAGA, F.; MANZANARES, P. (2003). *Acetate ester formation in wine by mixedcultures in laboratory fermentations*. International Journal of Food Microbiology, vol. 86, 181-188.

- SABATE, J.; CANO, J.; ESTEVE-ZARZOSO, B. & GUILLAMÓN, J. (2002). *Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA*. Microbiol Res., 157: 267-274.
- SAINT-CRIQ DE GUALEJAC, N.; VIVAS, N.; GLORIES, Y. (1998). *Maturité phénolique: définition et contrôle*. Revue Française. Oenologie, vol. 73, 22-25.
- SANTAMARÍA, P.; GARIJO, P.; TENORIO, C.; LÓPEZ, R. & GUTIÉRREZ, A. R. (2007). *Presencia de levaduras autóctonas en bodegas que practican la inoculación reiterada con Levaduras Secas Activas*. Tecnología del vino: Tratamientos y equipos para viticultura y enología, vol. 18, 40-47.
- SANTAMARÍA, P.; LÓPEZ, R.; LÓPEZ, E.; GARIJO, P. & GUTIÉRREZ, A. R. (2008). *Permanence of yeast inocula in winery ecosystem and presence in spontaneous fermentations*. Eur. Food Res. Tech., 227, 1563-1567.
- SWIEGERS, J. H.; BARTOWSKY, E. J.; HENSCHKE, P. A.; PRETORIUS, I. S. (2005). *Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour*. Australian Journal of Grape and Wine Research, vol. 11, 139-173.
- Unión Europea. Reglamento de Ejecución (UE) 2019/935 de la Comisión, de 16 de abril de 2019, por el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento (UE) n° 1308/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que se refiere a métodos de análisis para determinar las características físicas, químicas y organolépticas de los productos vitícolas y las notificaciones de las decisiones de los Estados miembros relativas a los aumentos del grado alcohólico natural. *Diario Oficial de la Unión Europea*. L 149/53, 7 de junio de 2019.
- VAN DER WESTHUIZEN, T. J.; AUGUSTYN, O. P. H.; & PRETORIUS, I. S. (2000). *Geographical Distribution of indigenous Saccharomyces cerevisiae strains isolated from vineyards in the coastal regions of the Western Cape in South Africa*. South African Journal of Enology and Viticulture, vol. 21, n° 1, 3-9.
- VARELA, C.; BARKER, A.; TRAN, T.; BORNEMAN, A.; CURTIN, C. (2017). *Sensory profile and volatile aroma composition of reduced alcohol Merlot wines fermented with Metschnikowia pulcherrima and Saccharomyces uvarum*. International Journal of Food Microbiology, vol. 252, 1-9.
- VIDAL, S.; FRANCIS, L.; GUYOT, S.; MARNET, N.; KWIATKOWSKI, M.; GAWEL, R.; CHEYNIER, V.; WATERS, E. J. (2003). *The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium*. Journal of the Science of Food and Agriculture, vol. 83, 564-573.
- VIDAL, S.; FRANCIS, L.; WILLIAMS, P.; KWIATKOWSKI, M.; GAWEL, R.; CHEYNIER, V.; et al. (2004). *The mouth-feel properties of polysaccharides and anthocyanins in wine like medium*. Food Chemistry, vol. 85, 519-525.
- VIVAS, N.; GLORIES, Y.; LAGUNE, L.; SAUCIER, C.; AUGUSTIN, M. (1994). *Estimation du degré de polymérisation des procyanidines du raisin et du vin par la méthode au p-diméthylmaninocinnamaldéhyde*. Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, vol. 28, n° 4, 319-336.

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