



Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

Grado en Enología

Uso de levaduras *Saccharomyces* y no-
Saccharomyces durante la vinificación
y su influencia en el perfil aromático.

Alumno: Jorge Mateo Ortega

Tutora: Josefina Vila Crespo
Tutora: Violeta Ruipérez Prádanos

Julio 2020

Índice

Resumen	3
1. Introducción	4
2. Antecedentes.....	6
3. Justificación y objetivos	8
4. Materiales y métodos.....	9
4.1. Proceso de vinificación	9
4.2. Seguimiento del proceso fermentativo	10
4.2.1. Densidad y temperatura.....	10
4.3. Análisis físico-químico	10
4.3.1. Grado alcohólico probable	11
4.3.2. Acidez total y pH.....	11
4.3.3. Acidez volátil.....	11
4.3.4. Anhídrido sulfuroso libre y total.....	11
4.3.5. Azúcares reductores.....	11
4.3.6. Grado alcohólico.....	11
4.3.7. Glicerol y acetaldehído	11
4.4. Análisis microbiológico.....	12
4.5. Aromas	12
4.6. Tratamiento estadístico de datos	12
5. Resultados y discusión	13
5.1. Seguimiento de la fermentación alcohólica	13
5.2. Estudio de los parámetros físico-químicos.....	16
5.3. Estudio de la composición aromática.....	22
5.3.1. Alcoholes	22
5.3.2. Ésteres	23
5.3.3. Ácidos.....	24
5.3.4. Aldehídos, cetonas y lactonas	25
5.3.5. Terpenos y C13-norisoprenoides.....	25
5.3.6. Miscelánea	25
6. Conclusiones.....	28
Bibliografía	29
Anexos	33
Referencias	37

Resumen

Durante los últimos años la creciente demanda de vinos “diferentes” está obligando al sector vitivinícola a utilizar diferentes estrategias para conseguir esa tipicidad que tanto se ha ido perdiendo. Los llamados vinos varietales o de características propias son los encargados de ocupar esa parte del mercado, destinados a aquellos que están cansados de vinos con características muy similares entre las distintas denominaciones.

Esta problemática se ha producido, entre otras cosas, por la utilización reiterada de cultivos y productos enológicos comerciales, para asegurar el fin de fermentación. En este caso, se estudiará la influencia de cultivos mixtos sobre los diferentes aromas durante la vinificación de un vino blanco de la variedad Verdejo, más concretamente, se utilizará *Torulaspota delbrueckii* y *Saccharomyces cerevisiae* mediante inoculación secuencial y coinoculación.

Abstract

During the last years the increasing demand of different wines is forcing to the winegrowing industry to use different strategies to achieve this tipicity that so much has been losing. The called varietal wines or of own characteristics are the attendants to occupy this part of the market, allocated to those that are tired of wines with very similar characteristics between the distinct denominations.

This problematic has been produced, among other things, by the repeated use of cultures and comercial enological products, to ensure the end of fermentation. In this case, it will be studied the influence of mixed cultures on the different aromas during the vinification of a Verdejo white wine, more specifically, it will be used *Torulaspota delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* by means of sequential inoculation and simultaneous inoculation.

1. Introducción

El vino es una solución hidroalcohólica elaborado por fermentación de mosto de uva en la que están implicadas levaduras y bacterias lácticas, siendo las levaduras las principales responsables de la fermentación alcohólica (P. Liu et al., 2016). A lo largo del proceso fermentativo son muchas las especies de levaduras que se van sucediendo; las no-*Saccharomyces* son las predominantes al comienzo de la fermentación (Fleet, 1990) y con el paso de los días, las levaduras alcoholígenas como *Saccharomyces cerevisiae* se van imponiendo debido a la concentración creciente de etanol.

Originalmente, el deterioro de los vinos ha sido producido por contaminaciones de levaduras no-*Saccharomyces* (Fleet, 2006), la mayoría de ellas de metabolismo oxidativo, debido a esto, el uso de levaduras no-*Saccharomyces* sigue siendo motivo de preocupación o de inseguridad en las bodegas de hoy en día. Sin embargo, durante estos últimos años se ha demostrado que el uso de levaduras no-*Saccharomyces* mejora la complejidad del vino por su metabolismo heterogéneo (Belda et al., 2016a) mejorando parámetros cualitativos cuando los comparamos con una fermentación exclusivamente con *S. cerevisiae*; por lo que el uso de estas levaduras durante la fermentación se ha revaluado. Con estas nuevas características se tratarán de resolver los actuales desafíos enológicos.

Las demandas del mercado y este clima cambiante han provocado que muchos autores investiguen sobre nuevas herramientas biotecnológicas que sean capaces de adaptarse a las nuevas condiciones. Las altas temperaturas producidas por el cambio climático han traído consigo la elaboración de vinos con grados alcohólicos lo suficientemente elevados como para ser rechazados por parte del consumidor; este tipo de grados pueden producir problemas durante el desarrollo fermentativo, bien por las paradas de fermentación o por el efecto tóxico causado en las levaduras (Ubeda et al., 2020). Otro factor que puede verse afectado por la variación de las condiciones ambientales es la pérdida de acidez de las bayas por combustión de los ácidos orgánicos, provocando un aumento en el pH de los vinos y, por tanto, un medio más favorable para el desarrollo de sustancias tóxicas, como pueden ser las aminas biógenas; cuyo contenido tiene límites legales en algunos países de cara a la exportación.

Toda esta problemática ha traído consigo, el uso de este tipo de estrategias en las bodegas con el objetivo de diferenciarse a nivel comercial, bien mediante la elaboración de vinos con elevadas concentraciones de aromas tiólicos y ésteres (Belda et al., 2017; Renault et al., 2015) o mediante la disminución de alguno de los metabolitos que afectan a la calidad del vino final.

Recientes estudios han revelado que las levaduras no-*Saccharomyces* pueden reducir el grado alcohólico (Furlani et al., 2017) ya que son capaces de consumir azúcares por vía respiratoria (efecto Crabtree negativo), la acidez volátil (Renault et al., 2009; Bely et al., 2008), así como incrementar el contenido en glicerina (Soden et al., 2000) e influir en el perfil aromático de los vinos mediante su alto potencial enzimático (Belda et al., 2017).

Como las levaduras no-*Saccharomyces* en su mayoría, son esencialmente aeróbicas, con baja capacidad fermentativa (Ciani et al., 2006) y debido a que, presentan una menor tolerancia a la baja disponibilidad de oxígeno en comparación con *S. cerevisiae* (Hansen et al., 2001), se utilizarán en cultivos mixtos mediante coinoculación o inoculación secuencial, para intentar solventar estas dificultades, tratar de corregir ciertos defectos en vino (Bely et al., 2008) y asegurar el fin de fermentación. La

inoculación secuencial requiere la inoculación de la cepa de levadura no-*Saccharomyces* y a los 2-3 días, la inoculación de *S. cerevisiae*. Sin embargo, la coinoculación requiere la inoculación simultánea de ambas levaduras. La posible interacción sinérgica entre distintas especies de levadura podría abrir nuevos caminos en la biotecnología.

Según estudios recientes, las fermentaciones secuenciales ofrecen más ventajas que la coinoculación, debido a que el potencial enológico de las levaduras no-*Saccharomyces* se prolonga durante más tiempo al no tener los posibles efectos inhibitorios de las levaduras del género *Saccharomyces* durante los primeros días de fermentación alcohólica (Benito, 2018). Asimismo, el estudio de Soden et al. (2000) comprueba que los valores analíticos en una coinoculación no varían mucho de los obtenidos en un monocultivo de *S. cerevisiae*, sin embargo, en una inoculación secuencial disminuyen significativamente los valores de acidez volátil, pH y acetaldehído, aumentando la acidez total y el glicerol en cantidades superiores a cualquiera de los ensayos realizados.

Otros estudios recientes también defienden estas afirmaciones, Belda et al. (2014) demuestra como el contenido en glicerol es superior en las inoculaciones secuenciales que, en cualquiera de los otros ensayos realizados, tanto en inoculaciones simultáneas como en cultivos puros de *S. cerevisiae*, además, comprueba como el grado alcohólico final es menor en este tipo de estrategias. Dicha disminución depende de la mayor presencia de *Torulasporea delbrueckii* y, según afirma, es precisamente en este tipo de estrategia cuando más tiempo permanece durante la fermentación.

Hay discursos contradictorios entre autores sobre los aromas que realmente se potencian y los que disminuyen; según Renault et al. (2015) la inoculación simultánea entre *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* produce mayor contenido en ésteres que realizando una inoculación secuencial, ya que el crecimiento de *T. delbrueckii* durante la fermentación en un cultivo mixto es muy similar a uno puro de *S. cerevisiae*; sin embargo, según Hu et al. (2017) la inoculación secuencial de no-*Saccharomyces* y *S. cerevisiae* produjo más ésteres etílicos de ácidos grasos de cadena media que durante la inoculación simultánea.

Los vinos elaborados con la variedad Verdejo ofrecen una composición aromática con aromas y sabores a frutas tropicales, fruto de la acción conjunta de muchos compuestos volátiles. Algunos autores manifiestan en sus trabajos, la presencia de una cantidad considerable de ésteres, identificados en vinos elaborados con esta variedad, así como cantidades significativas de terpenos, dando a esta variedad unas características aromáticas similares a las que podemos encontrar en variedades del centro de Europa (Herraiz et al., 1991).

El perfil aromático no solo va a depender de las levaduras presentes durante la fermentación, sino también de la propia composición del medio de partida, de las operaciones prefermentativas (Maggu et al., 2007) y de las temperaturas de fermentación (Howell et al., 2004). Aunque la calidad aromática del vino depende de la cantidad de compuestos presentes en la propia uva, algunos de estos compuestos se van a formar a lo largo del proceso fermentativo, donde las levaduras van a jugar un papel muy importante (Schreier et al., 1979).

2. Antecedentes

Estudios recientes han puesto de manifiesto, el potencial que algunas levaduras no-*Saccharomyces* presentan para resolver algunas de las dificultades a las que se enfrenta la enología moderna. Asimismo, Benito (2018) analiza la influencia de *T. delbrueckii* durante la fermentación alcohólica en factores como el etanol, acetaldehído, ácido acético, ácido málico, ácido succínico, manoproteínas y polisacáridos, glicerol y compuestos volátiles producidos. La mejora de la calidad del vino está condicionada al empleo de determinadas cepas de *T. delbrueckii* que deben ser combinadas con cepas compatibles de *S. cerevisiae* debido a su baja capacidad fermentativa.

Son múltiples los autores cuyo objeto de estudio se ha centrado en la interacción entre *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* en cultivos puros, mixtos e inoculaciones secuenciales, analizando la influencia sobre parámetros físico-químicos de interés, así como su influencia en el perfil aromático (Azzolini et al., 2014; Bely et al., 2008; Renault et al., 2015; Loira et al., 2015). Azzolini et al. (2014) confirmó en su estudio la influencia de *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* en parámetros como el etanol al disminuir su producción, así como en el ácido acético, y sugiere que la consecuencia de tal disminución puede ser muy importante en la elaboración de vinos dulces. Esta hipótesis ya fue planteada por Bely et al. (2008), demostrando en su trabajo que el uso de cultivos mixtos puede resolver el problema de exceso de acidez volátil en vinos con altas concentraciones de azúcar.

Atendiendo a lo expuesto por Belda et al. (2017), donde confirmó reducciones significativas de etanol e incrementos de glicerol en fermentaciones secuenciales con Verdejo, se ha realizado una comparativa del grado alcohólico y del contenido en glicerina entre las diferentes estrategias, teniendo en cuenta los cultivos utilizados. Una disminución en el grado alcohólico mejoraría la aceptación del consumidor en el vino final y lograría vencer uno de los principales problemas del cambio climático; un incremento en el contenido en glicerol aumentará la sensación de redondez en boca.

Por otro lado, los ácidos están involucrados en la formación de ésteres durante la fermentación y el envejecimiento (Loira et al., 2015), siendo responsables del perfil afrutado y de la calidad sensorial del vino, por lo que el pH y la acidez total son factores importantes a comparar en nuestro ensayo. Asimismo, Bely et al. (2008) puso de manifiesto, una menor producción de acidez volátil en sus ensayos utilizando fermentaciones mixtas y secuenciales, por lo que se ha realizado una comparativa de la acidez volátil entre los diferentes cultivos, ya que es un factor de calidad a tener en cuenta en el resultado final.

Cantidades elevadas de acetaldehído se suelen relacionar con desviaciones aromáticas, por lo que parece lógico comparar los niveles producidos en cada vinificación. El trabajo publicado por S. Liu et al. (2018) determinó disminuciones significativas en los niveles de acetaldehído en fermentaciones simultáneas y secuenciales.

Por el contrario, Renault et al. (2015) utiliza los cultivos mixtos como estrategia para incrementar los aromas frutales, más concretamente, ésteres minoritarios como el propanoato de etilo, isobutanoato de etilo y el dihidrocinamato de etilo. Benito (2018), también manifestó en su trabajo, que determinadas cepas de *T. delbrueckii* destacan por su alta actividad β -liasa, traducándose en un incremento de los tioles volátiles durante la fermentación de variedades como Verdejo.

Es sabido por otros estudios realizados, que la variedad Verdejo produce un aumento notable de compuestos como el acetato de 2-feniletilo y de su precursor el 2-fenil-etanol, determinando que la principal contribución de *T. delbrueckii* al perfil aromático de estos vinos son los aromas tiólicos varietales (Belda et al., 2017). Este mismo trabajo pone de manifiesto la baja producción de alcoholes superiores, el incremento en la producción global de ésteres y la mejora en la producción de tioles volátiles, tales como el 3-sulfanilhexan-1-ol (3-SH) y el 4-metil-4-sulfanilpentan-2-ona (4-MSP), debido a que determinadas cepas de *T. delbrueckii* son capaces de asimilar los precursores de aromas tiólicos unidos a la cisteína. Otro estudio realizado anteriormente, comprobó la alta actividad β -liasa de *T. delbrueckii* y, por tanto, mayor capacidad para liberar tioles volátiles (Belda et al., 2016b).

Sin embargo, *T. delbrueckii* no produce β -glucosidasa (Rosi et al., 1994), debido a que esta se encuentra inhibida por concentraciones de glucosa superiores al 1% (Bayonove et al., 1984) y, curiosamente, esta levadura actúa al comienzo de la fermentación, es decir, cuando más glucosa hay en el medio, por lo que la producción de terpenos será limitada. El uso de diferentes cepas de *S. cerevisiae* como estrategia para aumentar la actividad de la β -glucosidasa y compensar la baja actividad de *T. delbrueckii*, ha sido refutada por los estudios realizados por Mateo et al. (1997), donde comprueban el efecto inhibitorio de la glucosa y del etanol sobre dicha actividad.

3. Justificación y objetivos

El objetivo principal de este estudio es determinar la influencia de *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* sobre las características organolépticas de un vino blanco de la variedad Verdejo, mediante la modulación de parámetros físico-químicos del vino o de cambios en el perfil aromático.

Para ello se realizará la fermentación mediante coinoculación e inoculación secuencial de *T. delbrueckii* comercial con gran actividad β -liasa para intensificar los aromas varietales, con dos cepas diferentes de *S. cerevisiae* y se analizará la composición aromática de los vinos terminados y tras un año de crianza en botella. Asimismo, se estudiarán posibles cambios en diferentes parámetros físico-químicos de interés enológico.

Se proponen, por tanto, los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar las cinéticas fermentativas evaluando el efecto del uso de cultivos mixtos y del uso de diferentes cepas *S. cerevisiae*.
- Determinar la influencia de los cultivos mixtos en parámetros físico-químicos de interés.
- Comparar la composición aromática de los vinos elaborados mediante inoculación secuencial o simultánea y los sometidos a un año de envejecimiento en botella.

4. Materiales y métodos

4.1. Proceso de vinificación

Se recogió uva de la variedad Verdejo, procedente de una finca localizada en los alrededores del municipio de Toro; dicha uva fue sometida a un proceso de vinificación tradicional, fue despalillada, estrujada y prensada con una prensa neumática horizontal, se aplicó únicamente 1 ciclo de prensado a 1,5 bares, ya que un mayor rendimiento supondría la extracción de aromas vegetales.

Tabla 1. Analítica del mosto inicial. Fuente propia

	Mosto
Grado Brix (°Brix)	22,2 ± 0,0
GAP (vol.%)	12,9 ± 0,0
Temperatura (°C)	20,0 ± 0,0
Densidad (g cm⁻³)	1099 ± 0
Acidez total (g l⁻¹ TH2)	6,7 ± 0,1
pH	3,11 ± 0,00

Los resultados representan la media de triplicados ± desviación estándar (SD).
TH2= Ácido tartárico; GAP= Grado alcohólico probable.

Al mosto resultante se le hizo una analítica inicial (tabla 1). Se corrigieron los niveles de sulfuroso para evitar el comienzo repentino de la fermentación, a una dosis de 30 mg/l de sulfuroso libre.

El mosto fue repartido en depósitos de 50 l a razón de 20 litros por depósito. Al comienzo de la fermentación alcohólica (FA) se adicionó el mismo nutriente comercial 100% orgánico en todos los ensayos, a una dosis de 50g/Hl, el cual potencia las características aromáticas de variedades específicas como Verdejo. Dicho nutriente está compuesto por levaduras autolisadas ricas en vitaminas, aminoácidos y minerales.

Como control, se realizó una fermentación espontánea sin adición de ningún tipo de nutriente. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

A cada ensayo se le inocularon las levaduras comerciales según se describe a continuación:

Protocolo para coinoculación:

- A. Inoculación con *T. delbrueckii* (dosis 20g/Hl), simultáneamente con *S. cerevisiae* (dosis 20g/Hl) recomendada para vino blanco (*S. cerevisiae* 1) para la liberación de tioles volátiles y expresión de aromas fermentativos de perfil floral.
- B. Inoculación con *T. delbrueckii* (dosis 20g/Hl) simultáneamente con *S. cerevisiae* (dosis 20g/Hl) recomendada para vino tinto (*S. cerevisiae* 2) para potenciar la estructura de los vinos debido a la gran producción de glicerol, disminuyendo, por tanto, el rendimiento alcohólico.

Protocolo para inoculación secuencial:

- C. Inoculación con *T. delbrueckii*, (dosis 20g/Hl). Inoculación de *S. cerevisiae* (*S. cerevisiae* 1) específica para vinos blancos (dosis 20g/Hl) tras una disminución de densidad de 10 puntos.
- D. Inoculación con *T. delbrueckii* (dosis 20g/Hl) utilizada anteriormente. Cuando comprobemos una bajada de densidad de 10 puntos inocular *S. cerevisiae* (dosis 20g/Hl) recomendada para vinos tintos (*S. cerevisiae* 2).

Tabla 2. Designación de las vinificaciones durante el proceso de elaboración. Fuente propia

Designación	Proceso de elaboración
C.1 (C.1.1 / C.1.2)	Protocolo coinoculación A
C.2 (C.2.1 / C.2.2)	Protocolo coinoculación B
S.1 (S.1.1 / S.1.2)	Protocolo secuencial C
S.2 (S.2.1 / S.2.2)	Protocolo secuencial D
C.1.12 (C.1.1.12 / C.1.2.12)	Protocolo coinoculación A. Crianza 12 meses
C.2.12 (C.2.1.12 / C.2.2.12)	Protocolo coinoculación B. Crianza 12 meses
S.1.12 (S.1.1.12 / S.1.2.12)	Protocolo secuencial C. Crianza 12 meses
S.2.12 (S.2.1.12 / S.2.2.12)	Protocolo secuencial D. Crianza 12 meses
Control (Ctrl1 / Ctrl2)	Fermentación espontánea, vino control

4.2. Seguimiento del proceso fermentativo

Se llevó a cabo el análisis de la cinética fermentativa, controlando densidad y temperatura durante toda la fermentación.

El fin de fermentación se determinó analizando los azúcares residuales; una vez finalizada, los vinos fueron trasegados y sulfitados hasta llevarlos a 15 mg/l de sulfuroso libre. Se guardaron muestras de los vinos recién terminados congeladas para el análisis de aromas, el resto fue embotellado para someterlo a un año de crianza en botella y realizar la comparación aromática expuesta en el apartado de justificación y objetivos (apartado 3).

4.2.1. Densidad y temperatura

La densidad relativa se determinó mediante el uso de un aerómetro que cumplía todos los requisitos generales recogidos en la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2017, por la que se garantiza la competencia de los laboratorios y ensayos de calibración. La medida de la densidad se refirió a 20°C.

La medición de la temperatura se llevó a cabo mediante el uso de termómetros de mercurio graduados, con una precisión de 0,5°C.

4.3. Análisis físico-químico

Todas las mediciones han sido realizadas por duplicado, intentando minimizar al máximo los errores experimentales. Los valores finales se expresan como la media aritmética de las medidas y su desviación estándar.

4.3.1. Grado alcohólico probable

El grado alcohólico probable se determinó por el método refractométrico, método indirecto con el que se determina la concentración de azúcares mediante el índice de refracción. Los resultados se expresan como grado alcohólico probable % vol.

4.3.2. Acidez total y pH

El pH y la acidez total se determinaron basándonos en la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2017, utilizando un pH-metro Crison; la acidez se determinó utilizando el método potenciométrico. Según el reglamento (CEE) N° 2676/90 por el que se determinan los métodos de análisis comunitarios aplicables en el sector del vino, la acidez total es la suma de todas las acideces valorables cuando se lleva al vino a pH 7 mediante la adición de una solución alcalina valorada, no incluyendo el ácido carbónico y el anhídrido sulfuroso. Los resultados se expresan en g/l de ácido tartárico.

4.3.3. Acidez volátil

Para su determinación se utilizó el método de García Tena, método empírico basado en la separación del ácido acético por destilación simple y posterior valoración de la parte destilada con una solución alcalina (NaOH 0,01N) de factor conocido. Para ello se utilizó un volatímetro GAP SYSTEM bajo la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2017. Los resultados se expresan en g/l de ácido acético.

4.3.4. Anhídrido sulfuroso libre y total

La determinación del anhídrido sulfuroso se realizó por el método de Ripper (OIV-MA-AS323-04B); este método mide el potencial redox al oxidarse todo el sulfuroso, se realiza una iodimetría. El yodo es el encargado de oxidar todo el dióxido de azufre en medio ácido, por lo que su concentración estará directamente relacionada con la cantidad de yodo gastado en su oxidación. Los resultados se expresan en mg/l de sulfuroso libre o total.

4.3.5. Azúcares reductores

Los azúcares reductores fueron determinados mediante el método de Rebelein (Del Álamo Sanza, 2002). Este método se basa en la oxidación de los azúcares residuales utilizando una solución de cobre divalente, a temperatura de ebullición y en medio alcalino. Se determinan por iodimetría después de adicionar yoduro potásico (KI) y acidular. Los resultados se expresan en g/l de azúcares residuales.

4.3.6. Grado alcohólico

Se determinó mediante una ebulloimetría. Se utilizó un ebulómetro GAB SYSTEM, siguiendo la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2017. Este método aprovecha las diferencias que existen entre el punto de ebullición del agua y el punto de ebullición del alcohol. Los resultados se expresan en %vol.

4.3.7. Glicerol y acetaldehído

Los valores correspondientes al glicerol y al acetaldehído han sido obtenidos de una empresa externa, ya que este trabajo se engloba dentro de un proyecto más amplio.

4.4. Análisis microbiológico

La estimación del contenido microbiano presente en los ensayos sometidos a 1 año de crianza en botella, se realizó mediante siembra en medio de cultivo para levaduras (YEPD). El medio ha sido preparado utilizando un 2% (p/v) de peptona (Panreac), 2% (p/v) de glucosa (Labkem), 1% (p/v) de extracto de levadura (Labkem) y un 1,5% (p/v) de agar (BD BactoTMAgar). Antes de su utilización, el medio de cultivo fue esterilizado en autoclave durante 15 minutos, a una temperatura de 121°C.

Para determinar la población microbiana, se realizaron siembras en masa correspondientes a diluciones de cada botella de crianza y por duplicado, en placas de Petri estériles. Todo el material se encontraba previamente autoclavado y el trabajo se realizó siempre dentro de la cabina de flujo para mantener un ambiente aséptico. Las siembras se incubaron a $21,0 \pm 0,1$ °C durante 72 horas.

4.5. Aromas

Todas las muestras recogidas correspondientes a los ensayos fueron enviadas al Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la Universidad de Valladolid (UVA) con el objetivo de identificar los aromas presentes en todas las muestras recogidas.

Las muestras se enviaron en tubos cónicos Falcon de 50 ml, correspondientes a los vinos terminados y a los sometidos a envejecimiento en botella.

Dichas muestras fueron sometidas a microextracción en fase sólida (SPME); extrayendo los volátiles mediante la exposición de la fase sólida inmovilizada sobre una fibra (SPME Fiber Assembly 50/30µm DVB/CAR/PDMS Stableflex 2cm) en el espacio de cabeza del vial (HS-SPME), durante 30 min, a 250 rpm y a una temperatura de 40°C. Una vez alcanzado el equilibrio, los compuestos adsorbidos se desorbieron térmicamente en el inyector de un cromatógrafo de gases (GC); la muestra se incorporó en la corriente del gas portador dirigiéndolo a la columna cromatográfica, utilizando un modo de inyección splitless o sin reparto, donde toda la muestra es inyectada en la columna capilar HP-INNOWAX (60 m, 0.250 mm, 0.5 µm), (J &W Scientific, Folsom, CA, USA).

Por último, con la ayuda de un espectrómetro de masas (MS), los compuestos volátiles de todas las muestras fueron identificados. Esta identificación se realizó con el programa de MassHunter (Agilent Technologies).

4.6. Tratamiento estadístico de datos

Para el tratamiento estadístico de los datos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) mediante el programa Statgraphics Centurion 18-X64. El ANOVA nos permitirá determinar si existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las varianzas de las diferentes muestras. Para el análisis de las diferencias en los aromas entre las distintas estrategias se ha realizado un análisis de componentes principales (PCA).

5. Resultados y discusión

Todas las vinificaciones realizadas en este estudio han sido elaboradas en la bodega de la Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias de Palencia, a partir de uva de la variedad Verdejo, correspondiente a la vendimia de 2018.

El mosto obtenido tenía bastante intensidad aromática y la uva presentaba una excelente calidad sanitaria, aspecto importante, ya que una deficiente calidad sanitaria puede dar como resultado la pérdida de sustancias aromáticas. Se recogieron muestras durante todo el proceso de vinificación, con el objetivo de mantener una correcta cinética y evitar desviaciones que provocasen alteraciones en el perfil aromático.

Para asegurarnos el fin de fermentación se analizaron los azúcares reductores según lo expuesto en el apartado 4.3.5, los resultados dieron valores inferiores a 2g/l, por lo que consideramos acabadas todas las fermentaciones.

Una vez finalizados todos los ensayos se realizaron analíticas de los parámetros de interés, con los que se determinó la influencia de las estrategias utilizadas en el proceso fermentativo en las características físico-químicas y aromáticas del producto final.

Con respecto a los parámetros físico-químicos, nos centraremos en los siguientes: grado alcohólico, glicerol, pH, acidez total, acidez volátil y acetaldehído.

5.1. Seguimiento de la fermentación alcohólica

La influencia de los diferentes tiempos de inoculación (coinoculación y secuencial) así como el empleo de dos cepas diferentes de *S. cerevisiae* sobre la cinética fermentativa se muestra en las figuras 1-3. Durante la fermentación el desarrollo de las levaduras se va a ver influenciado por la cantidad de levadura inoculada, la temperatura de fermentación, la adición de sulfuroso, la composición del mosto inicial, por el desfogado, así como por la interacción con otros microorganismos (Feet, 1990).

Todas las fermentaciones se llevaron a cabo en 8 días (fig. 1 y 2), incluso en las vinificaciones control en las que no se inoculó levadura, consumiendo casi la totalidad de los azúcares iniciales; las temperaturas trataron de mantenerse en 20°C durante toda la fermentación, pero diversas limitaciones tecnológicas provocaron que se alcanzaran picos durante la fase tumultuosa, alcanzando medias de 22°C en la coinoculación y en la inoculación secuencial y de 20,7°C en el vino control durante el transcurso de la fermentación.

Con respecto a las vinificaciones realizadas mediante coinoculación o inoculación secuencial con *S. cerevisiae* 1, cuya cinética fermentativa se representa en la figura 1, se observa que la coinoculación (C.1) tiene un arranque de fermentación inmediato, lo que se traduce en una disminución de la densidad pronunciada. En comparación con la inoculación secuencial (S.1), la fermentación simultánea (C.1) ha tenido una bajada de densidad mucho mayor durante los cuatro primeros días. Esto podría deberse a la influencia en el desarrollo de *S. cerevisiae* sobre *T. delbrueckii* y viceversa (Renault et al., 2015) o bien por la implantación de *S. cerevisiae* y no de *T. delbrueckii*. Coincidiendo con Loira et al. (2015), las fermentaciones simultáneas son mucho más vigorosas que las inoculaciones secuenciales. Una vez pasados los 5 primeros días la fermentación continuó con una fase final progresiva y continuada. La fermentación secuencial en las

primeras fases parece comparable al control, Fleet (1990) ya observó que las levaduras predominantes en las primeras fases de la fermentación son especies de levaduras no-*Saccharomyces*, por lo que podemos predecir un comportamiento similar durante los primeros días.

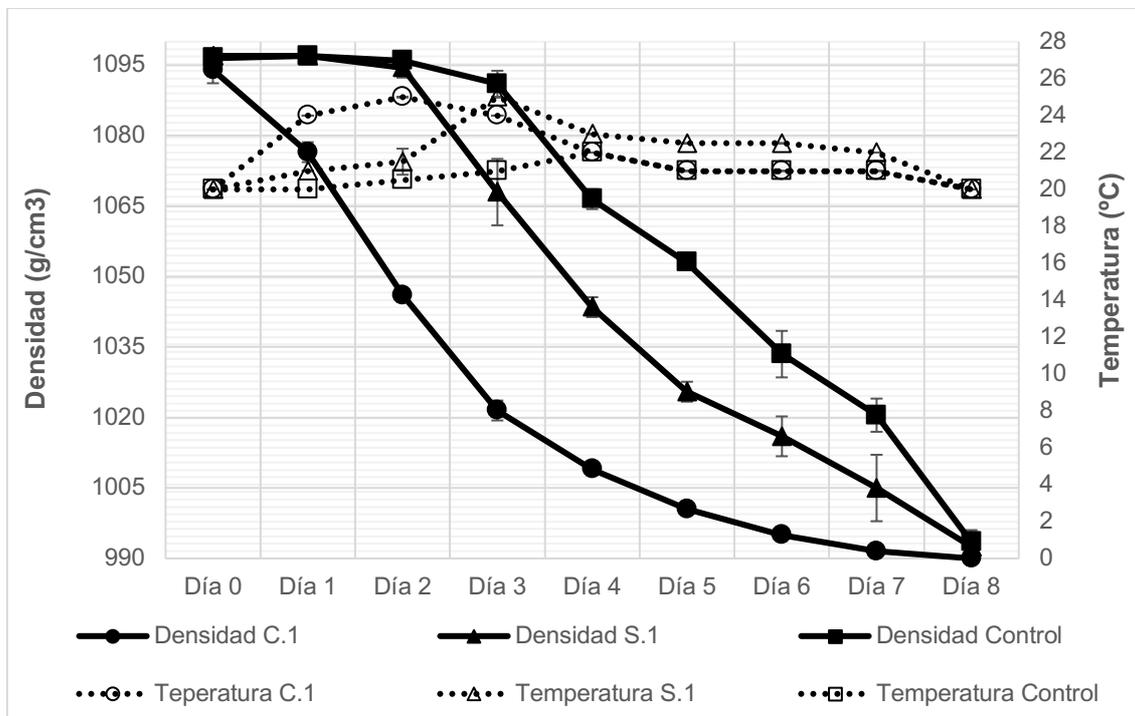


Figura 1. Efecto sobre la cinética del uso de cultivos mixtos. Control, inoculación secuencial (S.1) y coinoculación (C.1) de *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* recomendada para blancos. Fuente propia

La cinética correspondiente a la inoculación secuencial (S.1), a pesar de presentar un arranque de fermentación más lento, no muestra un retraso en los días totales de fermentación con respecto a la coinoculación (C.1), la única diferencia apreciable es un retraso en el comienzo de dos días; según Belda et al. (2017), este retraso puede deberse al menor consumo de azúcares por parte de *T. delbrueckii* durante los primeros días de fermentación, capaz de consumir 33 g/l de azúcar en comparación con los 107 g/l de *S. cerevisiae*. A partir de la inoculación de *S. cerevisiae* la pendiente de la curva sigue la misma tendencia que la que podemos observar en la coinoculación (C.1).

Acorde a lo que ya se pensaba, el vino control fue el ensayo que más tiempo necesitó para comenzar la fermentación y donde la temperatura no superó los límites establecidos. Fleet (1990) observó que algunas especies indígenas no-*Saccharomyces* crecen más rápido que *S. cerevisiae* a bajas temperaturas, lo que podría explicar por qué el vino control ha tenido una curva de fermentación mucho más suave.

En la figura 2 se representa el comportamiento fermentativo de la coinoculación (C.2) de *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* 2, la inoculación secuencial (S.2) y el vino control. La cinética fermentativa, igual que en el análisis de la figura 1, va a estar determinado por el tipo de estrategia biotecnológica utilizada. Son múltiples los autores que defienden una duración de la fermentación alcohólica durante más tiempo, en comparación con inoculaciones simultáneas (Cianni et al., 2006; Bely et al., 2008; Belda et al., 2017), sin

embargo, hay que destacar que, en nuestro trabajo, todos los ensayos han completado la fermentación en 8 días, por lo que no coincidimos con lo expuesto.

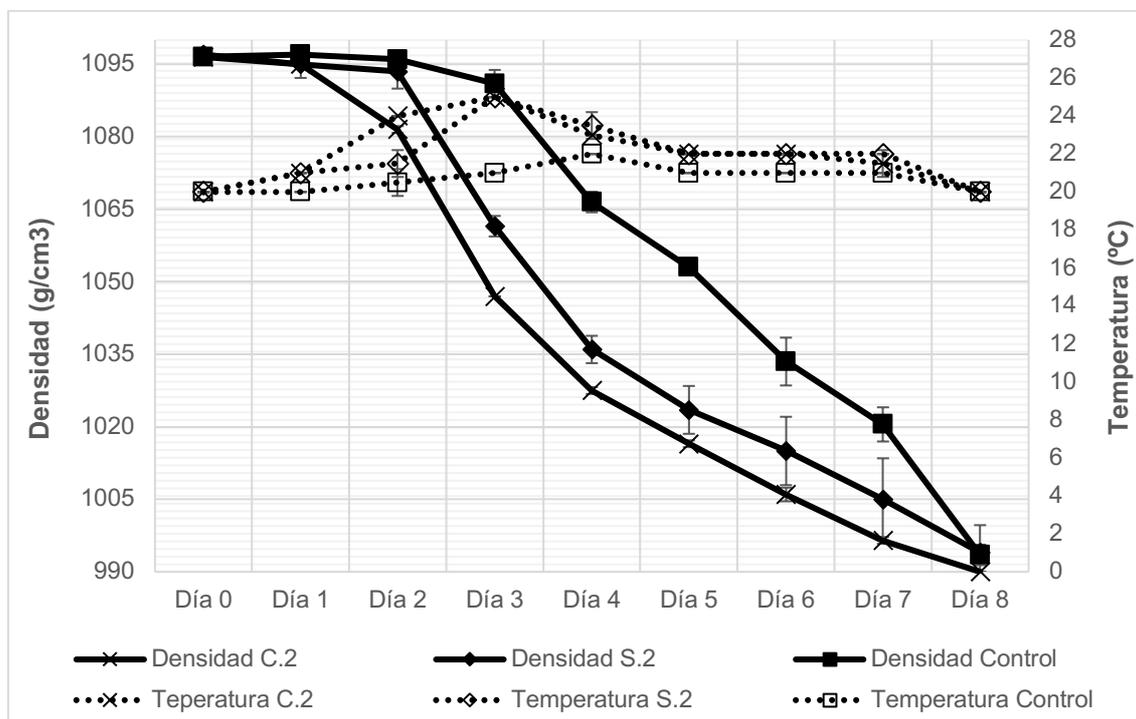


Figura 2. Efecto sobre la cinética del uso de cultivos mixtos. Control, inoculación secuencial (S.2) y coinoculación (C.2) de *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* recomendada para tintos.

Se pueden observar temperaturas similares a las comentadas en la figura 1. Aunque en la cinética de la coinoculación (C.2) se observa un descenso de la densidad más acusado durante los dos primeros días en comparación con la inoculación secuencial (S.2) y con el vino control, ha tenido un comienzo más tardío que el observado en la figura 1; podría deberse a una mayor competencia producida entre ambas ya que en este caso la cepa de *S. cerevisiae* utilizada es distinta. Incluso habiendo tenido un comienzo más tardío la curva es mucho más acusada que la correspondiente a la inoculación secuencial (S.2), por lo que volvemos a coincidir con Renault et al. (2015), donde según su ensayo, el número de células viables de *S. cerevisiae* es mucho mayor en una coinoculación que en una inoculación secuencial, implicando una cinética fermentativa similar a la de un cultivo puro de *S. cerevisiae* y, por tanto, un consumo de azúcares más rápido.

La curva correspondiente a la inoculación secuencial (S.2) muestra un descenso de la densidad muy suave durante los días en los que *T. delbrueckii* está actuando sola y un descenso muy similar al ocurrido en la inoculación simultánea (C.2) a partir de la inoculación de *S. cerevisiae*. Tal y como sugiere Bely et al. (2008) las cepas de *T. delbrueckii* pueden sobrevivir a grandes concentraciones de etanol cuando no están en cultivos puros, al poder estar presentes durante casi toda la fermentación, la curva se modularía aún más utilizando diferentes cepas de no-*Saccharomyces*. Podemos sugerir, por tanto, el uso de diferentes cepas no-*Saccharomyces* como uno de los factores que pueden influir en la pendiente de la curva. Por último, el vino control tiene la pendiente menos pronunciada, debido a lo comentado en la figura 1.

En la figura 3 se compara la influencia de la cepa de *S. cerevisiae* en la cinética fermentativa. La inoculación simultánea C.2 podría poner de manifiesto lo demostrado

anteriormente por otros autores, donde revelan que la inoculación de determinadas cepas de *S. cerevisiae* no necesariamente garantiza su implantación exclusiva durante la fermentación (Fleet, 1990), esto podría explicar el diferente comienzo de fermentación. A diferencia de lo ocurrido en la coinoculación C.2, la cinética correspondiente a la coinoculación C.1 ha tenido un descenso brusco de densidad desde el primer día, si tuviéramos estudios de implantación podríamos explicarlo atendiendo a lo demostrado por Nissen & Arneborg. (2003), donde demuestran la inhibición parcial sufrida por las levaduras no-*Saccharomyces* cuando hay una elevada concentración de células viables de *S. cerevisiae*, debido a la interacción célula-célula.

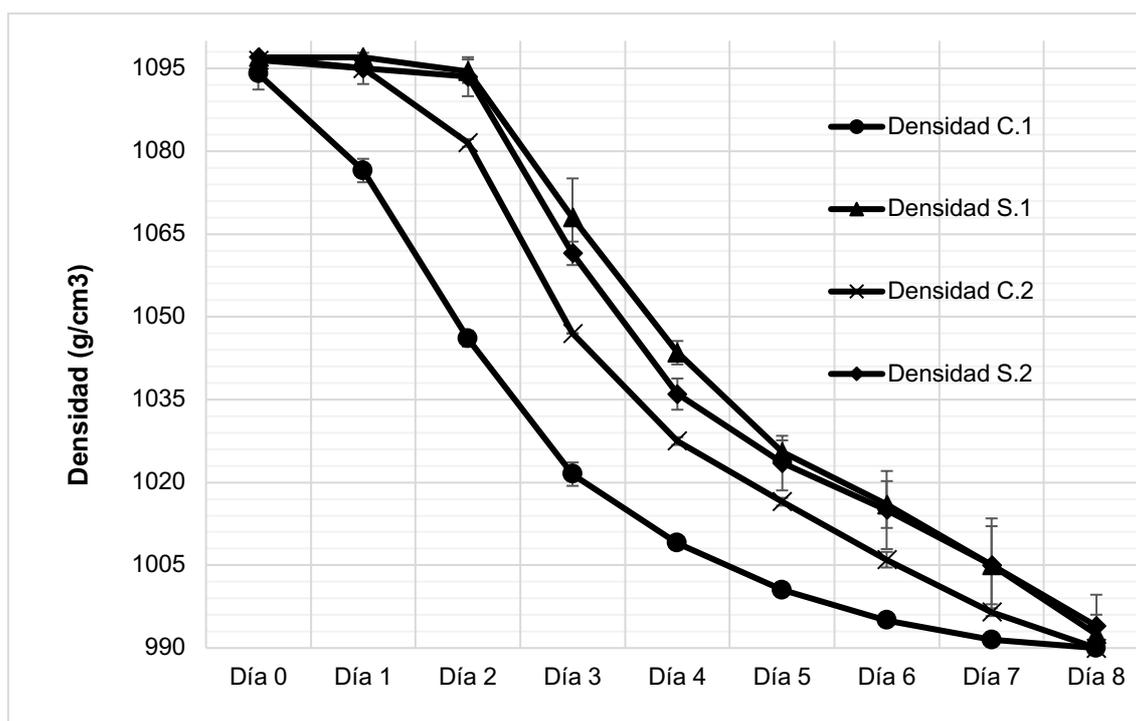


Figura 3. Efecto de la interacción entre microorganismos. Inoculación secuencial (S.1) y coinoculación (C.1) de *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* recomendada para blancos. Inoculación secuencial (S.2) y coinoculación (C.2) de *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* recomendada para tintos.

5.2. Estudio de los parámetros físico-químicos

Durante este apartado se comparan los vinos recién terminados, tratando de identificar diferencias entre estrategias y, por otro lado, se compararán estos mismos con sus correspondientes después de someterse a un año de envejecimiento en botella, analizando su evolución.

Los parámetros físico-químicos se han analizado comparando C.1 y S.1, donde se ha utilizado *S. cerevisiae* 1 y por otro lado C.2 y S.2, donde se ha utilizado *S. cerevisiae* 2; de manera que se puedan determinar diferencias significativas entre ellos. Los resultados de los parámetros enológicos de cada uno de los ensayos se pueden observar en la tabla 3.

Todos los parámetros, a excepción del grado alcohólico y el pH, no se han visto influenciados por la presencia de *T. delbrueckii* durante el transcurso de la fermentación. Las vinificaciones terminaron el proceso fermentativo con un contenido alcohólico entre 12,4-12,9%vol, observándose diferencias estadísticamente significativas entre la

coinoculación C.2 y la inoculación secuencial S.1. Las mayores concentraciones de etanol se pueden observar en ambas coinoculaciones. Como ya he comentado anteriormente, *T. delbrueckii* puede influir en el desarrollo de *S. cerevisiae* y viceversa, incrementando su potencial fermentativo, esto podría explicar el mayor consumo de azúcares durante la fermentación en la coinoculación C.2 y, por tanto, la obtención de un grado alcohólico mayor.

A diferencia de otros estudios donde defienden que una mayor presencia de *T. delbrueckii* produce mayores reducciones en el contenido alcohólico (Belda et al. 2014), en nuestro caso, ha ocurrido lo contrario. Según defiende Ciani et al. (2016), condiciones específicas de fuerte aireación combinadas con el uso de determinadas cepas no-*Saccharomyces* provocan reducciones aún más significativas en el grado alcohólico.

Durante la fermentación el glicerol es el segundo mayor metabolito formado, según Modig et al. (2007) es producido por la reducción del intermediario glicolítico dihidroxiacetona fosfato. Algunos autores como Jolly et al. (2014) determinaron que varias especies no-*Saccharomyces* son capaces de incrementar el contenido en glicerol modificando y mejorando las propiedades sensoriales de los vinos. Este incremento puede ser debido a la reducción en el grado alcohólico total, favoreciendo el consumo de azúcares por vía respiratoria. Basándonos en esta premisa, dado que no ha habido diferencias significativas en la reducción de grado alcohólico, sería lógico deducir un incremento poco probable en el contenido de glicerol. Hay diversas opiniones sobre el incremento real en este metabolito; algunos autores como Contreras et al. (2013) demostraron que, en inoculaciones secuenciales, *T. delbrueckii* produce un aumento en el contenido de glicerol cuando se compara con *S. cerevisiae*, en función de los tratamientos de adición de oxígeno aplicados. Sin embargo, Bely et al. (2008) confirmó en sus resultados que la producción de glicerol durante la fermentación fue menor en cultivos puros y secuenciales de *T. delbrueckii* que en comparación con *S. cerevisiae*, esta mayor producción es debida al estrés osmótico.

Aparentemente, la producción de glicerol por estrategias mostrada en la figura 5, es superior en las fermentaciones secuenciales; después de analizar la varianza de los resultados (tabla 3), no se han observado diferencias estadísticamente significativas entre coinoculaciones e inoculaciones secuenciales.

Según lo comentado anteriormente sobre *S. cerevisiae* 2, ha sido la mayor productora de glicerol de casi todos los ensayos, pero después del análisis de sus valores, podemos comentar que no se han obtenido los resultados esperados según las especificaciones de la casa comercial; todos los valores obtenidos se corresponden con un vino estándar.

El análisis de la concentración de acidez volátil tiene especial relevancia, debido a su efecto en las características sensoriales del vino. Tradicionalmente, contenidos elevados de acidez volátil estaban asociados a levaduras no-*Saccharomyces*; en la actualidad, muchos estudios han demostrado el poder de determinadas cepas para reducir los valores de acidez volátil. Más concretamente, los estudios realizados por Bely et al. (2008) donde demuestra reducciones significativas en fermentaciones secuenciales y simultáneas llevadas a cabo por *T. delbrueckii*. Al realizar el análisis entre estrategias no se han obtenido diferencias estadísticamente significativas, lo que nos hace deducir que las reducciones en la acidez volátil no solo van a depender de la cepa de levadura utilizada, sino también de la variedad de uva (Azzolini et al., 2014) y de las condiciones de oxigenación (Contreras et al., 2013). Todos los valores de acidez volátil se encuentran dentro de los rangos habituales para un vino de estas características, con valores entre 0,21-0,23g/l de ácido acético; siendo la coinoculación C.1 la de mayor valor.

Tabla 3. Parámetros físico-químicos en vinos elaborados con inoculaciones simultáneas, inoculaciones secuenciales y vino control.

	Vino terminado			
	C.1	S.1	C.2	S.2
Acidez Total (g l⁻¹)	7,3 ± 0,1 ^a	7,4 ± 0,1 ^a	7,1 ± 0,1 ^a	7,5 ± 0,6 ^a
Acidez Volátil (g l⁻¹)	0,23 ± 0,01 ^b	0,21 ± 0,03 ^b	0,21 ± 0,02 ^b	0,22 ± 0,01 ^b
pH	3,23 ± 0,03 ^{cd}	3,18 ± 0,03 ^d	3,26 ± 0,03 ^c	3,19 ± 0,04 ^d
Etanol (vol.%)	12,7 ± 0,5 ^{ef}	12,4 ± 0,3 ^f	12,9 ± 0,2 ^e	12,4 ± 0,3 ^{ef}
Glicerol (g l⁻¹)	5,70 ± 0,20 ^g	6,40 ± 1,20 ^g	5,60 ± 0,40 ^g	6,60 ± 1,10 ^g
Acetaldehído (mg l⁻¹)	55 ± 9,9 ^h	46,5 ± 0,7 ^h	53 ± 12,7 ^h	53 ± 4,2 ^h

Los resultados representan la media de cuatro medidas ± desviación estándar (SD).

Valores en la misma línea con la misma letra no son significativamente diferentes (p<0,05).

Inoculación secuencial (S.1) y coinoculación (C.1) de *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* recomendada para blancos. Inoculación secuencial (S.2) y coinoculación (C.2) de *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* recomendada para tintos.

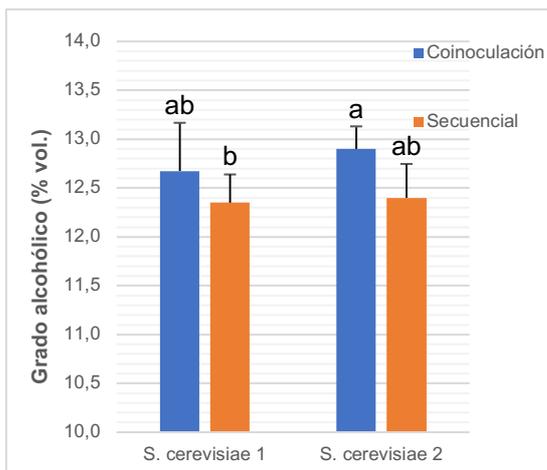


Figura 4. Contenido alcohólico total en fermentaciones mixtas y secuenciales con *S. cerevisiae* 1 y *S. cerevisiae* 2. Media \pm Desviación estándar (n=4). Valores en columnas con la misma letra no son significativamente diferentes (p<0,05). Fuente propia

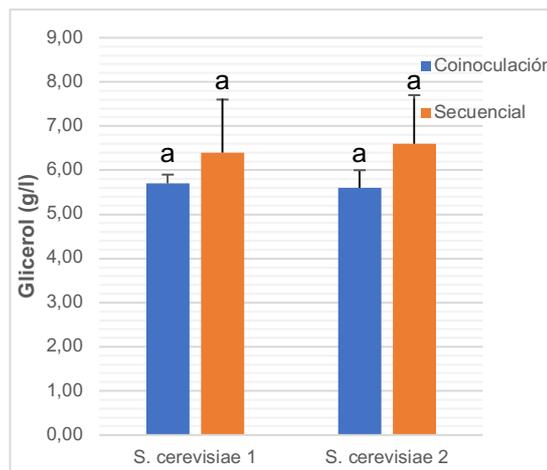


Figura 5. Contenido en glicerol total en fermentaciones mixtas y secuenciales con *S. cerevisiae* 1 y *S. cerevisiae* 2. Media \pm Desviación estándar (n=2). Valores en columnas con la misma letra no son significativamente diferentes (p<0,05). Fuente propia

Concentraciones elevadas de acetaldehído se relacionan con descriptores de oxidación en los vinos (Benito, 2018), lo que nos hace pensar, que determinadas cantidades de sulfuroso libre podrían verse disminuidas al combinarse con él, pudiendo provocar desviaciones microbianas.

En nuestro caso, después de realizar el ANOVA, no se han observado diferencias significativas entre estrategias, los resultados obtenidos nos indican valores relativamente normales para un vino blanco, 46-55 mg/l (Figura 7).

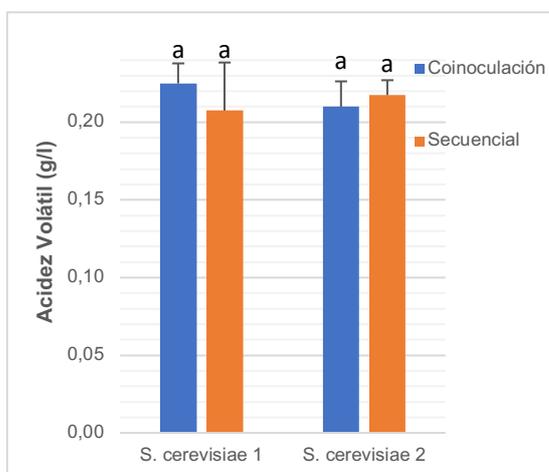


Figura 6. Acidez volátil en fermentaciones mixtas y secuenciales con *S. cerevisiae* 1 y *S. cerevisiae* 2. Media \pm Desviación estándar (n=4). Valores en columnas con la misma letra no son significativamente diferentes (p<0,05). Fuente propia

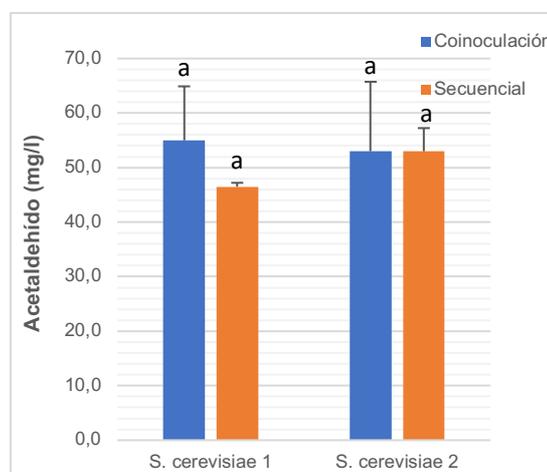


Figura 7. Contenido en acetaldehído en fermentaciones mixtas y secuenciales con *S. cerevisiae* 1 y *S. cerevisiae* 2. Media \pm Desviación estándar (n=2). Valores en columnas con la misma letra no son significativamente diferentes (p<0,05). Fuente propia

El análisis de la acidez total y el pH resulta clave por su influencia en factores como la estabilidad microbiana, la efectividad de determinados antioxidantes, la solubilidad de tartratos, la calidad sensorial y el propio equilibrio del vino (Swiegers et al., 2005).

Todos los ensayos han terminado la fermentación con valores de pH ligeramente superiores al mosto de partida (tabla 1), 0,15 puntos por encima con respecto a la coinoculación C.2; los valores obtenidos han estado entre los rangos 3,18-3,26, valores normales teniendo en cuenta la precipitación de las sales tartáricas durante la

fermentación. El pH más bajo se ha dado en ambas fermentaciones secuenciales, donde *T. delbrueckii* ha podido influir durante mayor tiempo. Diversos estudios han demostrado incrementos considerables en ácido tartárico al utilizar cultivos mixtos y, por consiguiente, disminuciones en el pH durante la fermentación (Kapsopoulou et al., 2006).

Los resultados de acidez total en nuestro trabajo han sufrido incrementos de 0,8 g/l en el mayor de los casos, en la fermentación secuencial S.2. Esta acidificación biológica tiene gran interés a nivel enológico, al poder resolver los problemas de acidez insuficiente provocados por el cambio climático, así como el perfil de determinadas variedades poco ácidas. El análisis de la varianza sometido a la acidez total no nos ha dado diferencias estadísticamente significativas con un 95% de confianza, a diferencia del análisis del pH, donde se han observado diferencias entre la coinoculación C.2 y ambas inoculaciones secuenciales (S.1 y S.2). Estas diferencias de pH pueden ser debidas a la mayor influencia de las modificaciones físicas y microbianas producidas durante el proceso fermentativo o bien deberse simplemente, a un menor incremento en la acidez total, ya que sus valores de pH están dentro de los valores normales para un vino de estas características.

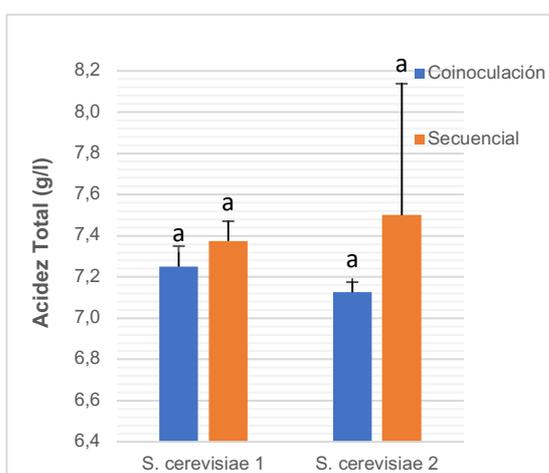


Figura 8. Acidez total en fermentaciones mixtas y secuenciales con *S. cerevisiae* 1 y *S. cerevisiae* 2. Media \pm Desviación estándar (n=4). Valores en columnas con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0,05$). Fuente propia

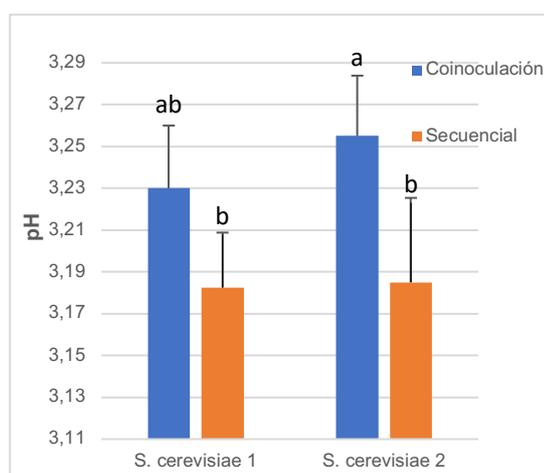


Figura 9. Valores de pH en fermentaciones mixtas y secuenciales con *S. cerevisiae* 1 y *S. cerevisiae* 2. Media \pm Desviación estándar (n=4). Valores en columnas con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0,05$). Fuente propia

Los valores obtenidos de las analíticas del vino sometido a un año de envejecimiento en botella se pueden observar en la tabla A1 (anexos), con ellos se han determinado diferencias estadísticamente significativas con respecto a los obtenidos en los ensayos recién terminados.

El proceso de crianza de los vinos es una parte del proceso productivo donde se ha de mantener unas condiciones de almacenamiento específicas para que no se produzcan alteraciones de carácter oxidativo en los vinos, entre las que destacan, las condiciones de almacenamiento (humedad y temperatura), el tipo de recipiente donde se vaya a llevar a cabo la crianza, así como la mayor o menor presencia de antioxidantes en el vino de partida (Hopfer et al., 2013). En nuestro caso, al tratarse de un vino blanco, va a ser más propenso a la oxidación, debido a la menor cantidad de compuestos fenólicos antioxidantes.

Los datos de acidez volátil nos muestran aumentos en todos los ensayos con respecto a sus correspondientes antes de someterse a crianza en botella, excepto en la coinoculación C.1 y en la inoculación secuencial S.2. Dichos aumentos es lo que cabría

esperar en cualquier vino sometido a envejecimiento, debido a la oxidación del etanol por las microoxigenaciones a través del tapón de corcho y debido a la actuación de microorganismos presentes por una menor actuación del sulfuroso libre molecular.

Las disminuciones de acidez volátil producidas en la coinoculación C.1 y en la inoculación secuencial S.2 podrían deberse a su consumo por parte de levaduras aún presentes, capaces de utilizar el ácido acético como fuente de carbono. Durante el análisis microbiológico se han identificado colonias en cantidades suficientes como para producir la disminución antes comentada (datos no mostrados). El ANOVA nos muestra diferencias significativas entre la inoculación secuencial S.1 y su correspondiente después del envejecimiento. Estas diferencias pueden ser causadas por una mayor incidencia de alguno de los factores comentados en el párrafo anterior. Sin embargo, todos los ensayos han obtenido valores normales de acidez volátil para vinos sometidos a un año de crianza en botella.

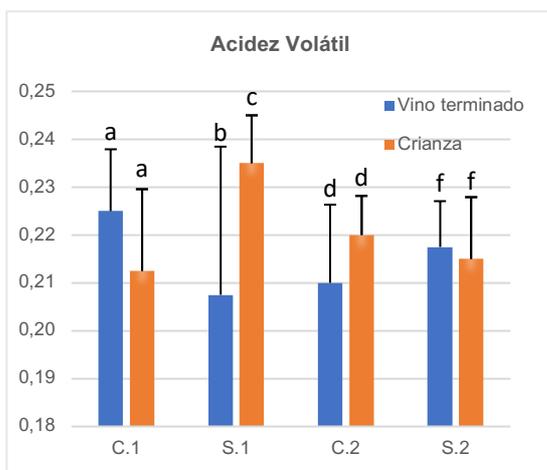


Figura 10. Evolución de acidez volátil en vinos con 1 año de envejecimiento en botella. Media \pm Desviación estándar (n=4). Valores en columnas contiguas con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0,05$). Fuente propia

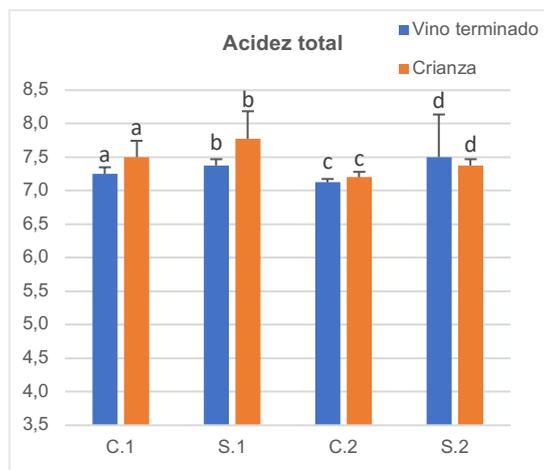


Figura 11. Evolución de acidez total en vinos con 1 año de envejecimiento en botella. Media \pm Desviación Estándar (n=4). Valores en columnas contiguas con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0,05$). Fuente propia

Los valores de acidez total nos siguen mostrando un ligero aumento durante la crianza, excepto en la secuencial S.2. Lo normal en estos casos sería una disminución causada por la insolubilización de las sales tartáricas. A pesar de estos ligeros aumentos no se han observado diferencias estadísticamente significativas después de realizar el ANOVA.

Todos los valores de pH de cada uno de los ensayos han sufrido diferencias estadísticamente significativas, con respecto a su correspondiente tras 12 meses de crianza. Los datos mostrados en la figura 12 manifiestan un aumento de pH en todas las vinificaciones sometidas a envejecimiento, resultados esperados en condiciones normales. Normalmente una disminución de acidez viene acompañada de un aumento de pH. En este caso, a pesar de la supuesta acidificación biológica producida en todas las vinificaciones, excepto en la inoculación secuencial S.2, se han producido aumentos en los valores de pH.

Aparentemente, los datos mostrados en la figura 13 muestran una reducción en el grado alcohólico, seguramente, fruto de la oxidación del etanol. Cabe destacar que las condiciones de embotellado no fueron las más idóneas. Sin embargo, después de realizar el análisis de la varianza no se han observado diferencias significativas en la evolución del grado alcohólico.

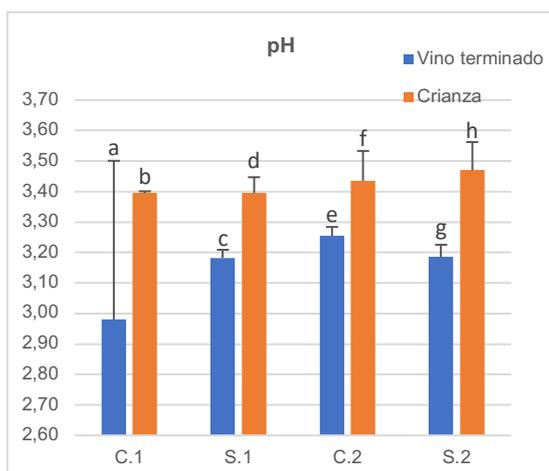


Figura 12. Evolución de pH en vinos con 1 año de envejecimiento en botella. Media \pm Desviación estándar (n=4). Valores en columnas contiguas con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0,05$). Fuente propia

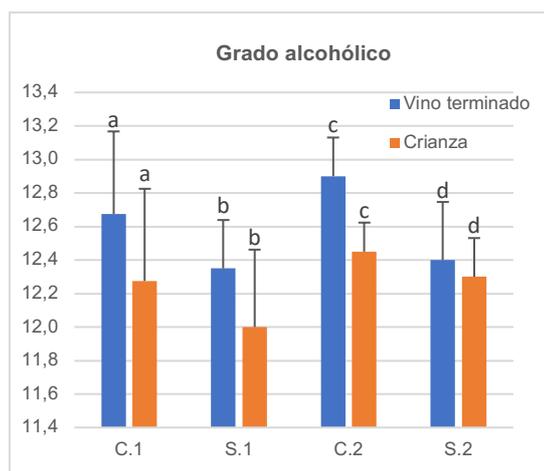


Figura 13. Evolución de grado alcohólico en vinos con 1 año de envejecimiento en botella. Media \pm Desviación estándar (n=4). Valores en columnas contiguas con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0,05$). Fuente propia

5.3. Estudio de la composición aromática

Un total de 76 aromas fueron aislados e identificados en todas las vinificaciones por GC-MS, los cuáles han sido sometidos a un análisis de componentes principales (figura 14) con el fin de comparar las estrategias biotecnológicas utilizadas en función de los aromas identificados.

Las áreas obtenidas se han estandarizado utilizando un patrón interno, añadido en cada ensayo para eliminar las diferencias en la cantidad analizada y, posteriormente, se ha realizado la media entre ambas vinificaciones (duplicados).

Las áreas obtenidas tras identificar los compuestos, son proporcionales a la concentración del analito en cuestión.

Han sido identificados alcoholes, ésteres, aldehídos y cetonas, ácidos, lactonas, terpenos y C13-norisoprenoides.

5.3.1. Alcoholes

Los alcoholes son uno de los grupos más importantes desde el punto de vista cuantitativo. La mayoría se forman durante el proceso fermentativo, son metabolitos secundarios producidos por las levaduras. Los alcoholes superiores se forman mediante la reacción de Ehrlich, por desaminación de un aminoácido a ácido cetónico, que posteriormente se descarboxila a aldehído y se reduce alcohol, siendo excretado al medio (Ugliano & Henschke, 2009). El uso de una u otra cepa de levadura influiría considerablemente en su concentración (Rankine, 1968). Otros alcoholes, sin embargo, proceden del metabolismo de los azúcares vía ácidos cetónicos. Su efecto sobre la calidad organoléptica va a depender de su intensidad aromática y del tipo de vino elaborado.

Según la tabla A2 (anexos), las mayores concentraciones de alcoholes encontradas en todos los ensayos fueron de isobutanol, alcohol isoamílico, 1-hexanol y 2-fenil etanol, siendo el alcohol isoamílico el encontrado en mayor concentración. Los vinos que contenían la *S. cerevisiae* 1, tanto en régimen de coinoculación como en inoculación secuencial, son donde mayores niveles de isobutanol y alcohol isoamílico se han identificado y los vinos que contenían la *S. cerevisiae* 2 han tenido mayores niveles de 1-hexanol y 2-fenil etanol.

Uno de los alcoholes superiores que afectan de forma más positiva al aroma de los vinos es el 2-fenil etanol. Como podemos observar en la figura 9 las mayores concentraciones de este compuesto se encuentran en las inoculaciones secuenciales S.1, S.2 y sus correspondientes después de un año de envejecimiento, comparadas con las obtenidas en aquellos en régimen de coinoculación (C.1 y C.2) y sus homólogos después de la crianza (C.1.12 y C.2.12), así como en el vino control (CTRL). Según Escribano-viana et al. (2018) solamente las inoculaciones secuenciales llevadas a cabo por *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* mostraron en su trabajo perfiles aromáticos diferentes y cuando se las inoculaban simultáneamente, estas diferencias desaparecían.

5.3.2. Ésteres

Es sabido que los ésteres, producidos durante la fermentación alcohólica, son los responsables del aroma afrutado en los vinos. Su producción se va a ver afectada por diversos factores durante la fermentación, tipo de levadura, oxígeno, contenido lipídico, contenido azucarado y temperatura de fermentación (Verstrepen et al., 2003).

Podemos agruparlos en 2 grandes familias, ésteres de acetato y ésteres etílicos de ácidos grasos.

Se han observado cantidades elevadas de octanoato de etilo, hexanoato de etilo, decanoato de etilo, dec-9-enoato de etilo, dodecanoato de etilo, acetato de 2-feniletilo, acetato de isoamilo y en menor proporción acetato de etilo. Contrario a lo expuesto por Puertas et al. (2018), las mayores concentraciones se han identificado en el hexanoato de etilo y en el octanoato de etilo.

Concentraciones elevadas de algunos ésteres que afectan de forma positiva al aroma de los vinos, tales como el acetato de 2-feniletilo, han sido superiores por regla general, en todas las inoculaciones secuenciales en comparación con los vinos control, donde la formación de este compuesto ha sido menor.

Según podemos observar en la figura 14, los mayores niveles de acetato de isoamilo se han dado en ambas coinoculaciones (C.1 y C.2) y en el control (CTRL), en comparación con las inoculaciones secuenciales. El contenido en decanoato de etilo, también ha sido mayor en el vino control (CTRL) y en la coinoculación donde ha estado presente *S. cerevisiae* 1.

El acetato de etilo, relacionado con defectos en la calidad del vino en grandes concentraciones, se ha identificado en mayores niveles, en aquellos ensayos donde el acetato de isoamilo tiene un contenido mayor, esto podría indicar una mayor actividad esterásica de las levaduras.

Las mayores diferencias entre los ensayos en régimen de coinoculación y los sometidos a inoculación secuencial se han dado en el decanoato de etilo, dec-9-enoato de etilo y dodecanoato de etilo. En todas las coinoculaciones se han obtenido concentraciones superiores en comparación con las secuenciales, exceptuando el ensayo S.2.

De forma general, dentro de los ensayos sometidos a inoculación secuencial, ha sido el S.2 el que mayores concentraciones ha tenido en ésteres en comparación con el resto de los ensayos sometidos a régimen secuencial.

En la mayoría de los casos, la concentración en ésteres de acetatos ha disminuido en todos los ensayos sometidos a crianza, exceptuando el acetato de etilo, que ha aumentado en todos los vinos. Esto es debido a la hidrólisis que sufren durante el proceso de envejecimiento, causando disminuciones en el perfil afrutado de los vinos (Pérez-Coello et al., 1999). Según este mismo estudio los ésteres etílicos sufren una disminución significativa más lenta, a partir de los dos años y medio. Durante el proceso de crianza se han formado otros nuevos, como el fenilacetato de etilo, presente previamente en la secuencial S.1 y el etil pentadecanoato.

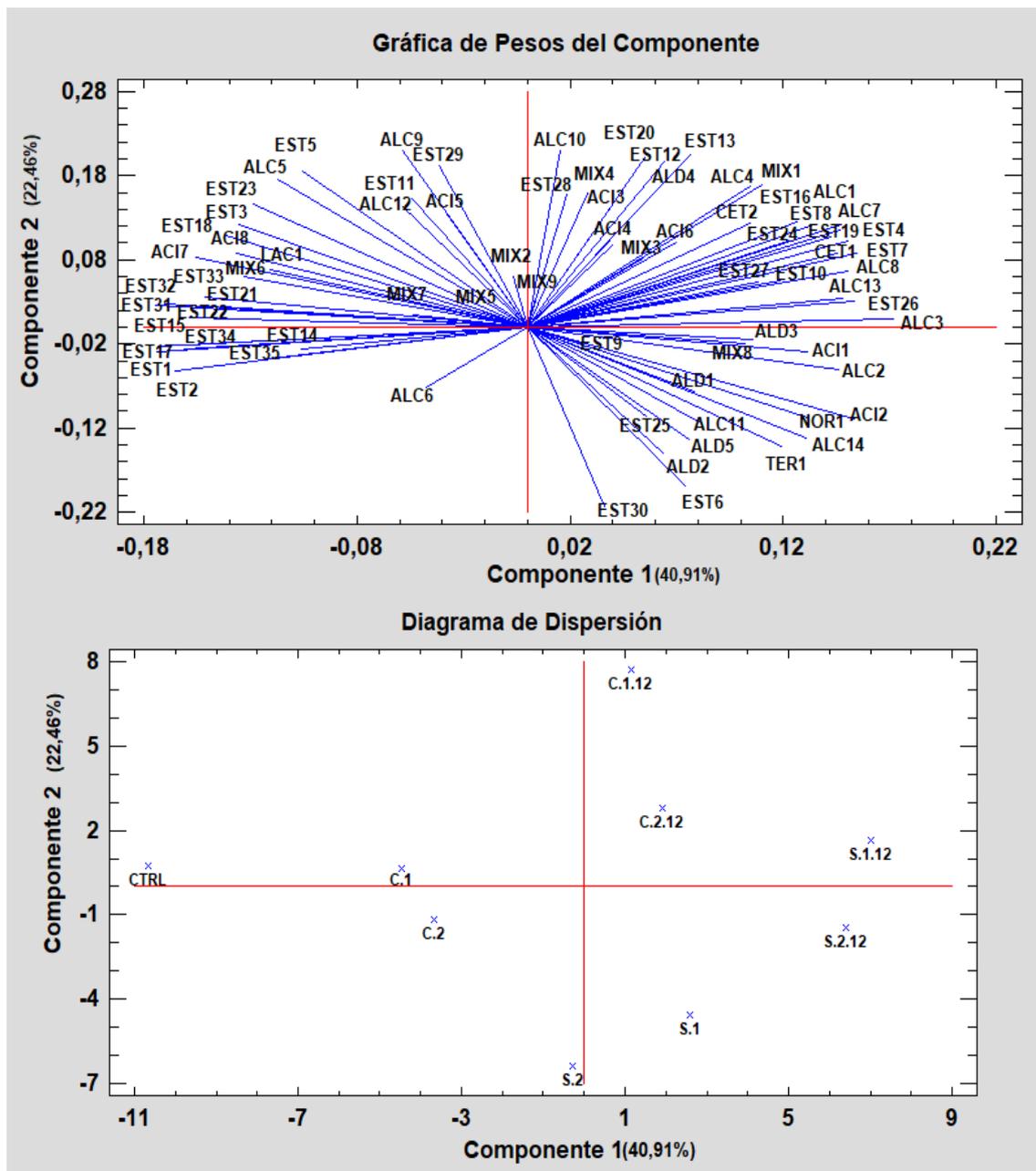


Figura 14. Diagrama de dispersión y gráfica de pesos de componentes derivados del análisis de componentes principales (PCA). Se tratarán de obtener las mayores diferencias entre las 79 variables, correspondientes a compuestos aromáticos, Las abreviaturas están definidas en la tabla 4. Fuente propia

5.3.3. Ácidos

La mayor o menor formación de ácidos grasos va a depender de las condiciones de fermentación y de la composición del mosto de partida (Schreier et al., 1979).

Los ácidos encontrados en mayor concentración han sido el ácido octanóico, ácido decanóico, ácido hexanóico y el ácido isovalérico, coincidiendo con la mayoría de los encontrados en mayor concentración por Sánchez-Palomo et al. (2015) en sus ensayos realizados con uva de la variedad verdejo,

Ya hemos comentado anteriormente, que el ácido acético es importante desde el punto de vista organoléptico debido a sus efectos en las características sensoriales del vino. Su producción va a depender, entre otras cosas, del estado sanitario de la uva y del

proceso fermentativo. En nuestro trabajo, únicamente se han encontrado pequeñas concentraciones en el ensayo S.2, aumentando durante crianza. El resto de vinificaciones que se han visto afectadas han sido la C.2.12 y la S.1.12, correspondientes a vinos con 1 año de envejecimiento y, obviamente, más propensos a la formación de este compuesto.

5.3.4. Aldehídos, cetonas y lactonas

Según Ugliano & Henschke. (2009) los aldehídos, cetonas y lactonas son compuestos carbonílicos formados por las levaduras durante el metabolismo de los azúcares. Los aldehídos que han participado en mayor medida en todas las vinificaciones han sido el benzaldehído y el nonanal, el resto de compuestos han influido escasamente. Según Sánchez-Palomo et al. (2015) el benzaldehído puede actuar de forma sinérgica en el aroma del vino, aportando notas afrutadas y florales. El acetaldehído suele ser el aldehído mayoritario, pero en nuestro estudio únicamente se ha identificado en el ensayo S.2, en su correspondiente después de la crianza y en el C.2.12 en pequeñas concentraciones, es decir, en casi todas las vinificaciones donde ha estado presente *S. cerevisiae* 2.

Las dos cetonas identificadas han sido la 2-octanona y la nonanona, sin mucha relevancia.

La única lactona identificada en todas las vinificaciones fue la γ -butirolactona, sin diferencias apreciables entre unos ensayos y otros. Según Ugliano & Henschke. (2009) las lactonas desempeñan un papel en la calidad sensorial sin definir, se dice que podrían colaborar en al aroma característico de los Sherry.

5.3.5. Terpenos y C13-norisoprenoides

Los terpenos y C13-norisoprenoides son metabolitos secundarios encargados de los aromas varietales de la uva. Los terpenos los podemos encontrar en su forma libre odorante o bajo su forma combinada con azúcares, formando una combinación glicosídica y constituyendo los precursores aromáticos. Para que estos terpenos combinados liberen su terpeno (aglicona) son necesarias unas enzimas (β -glicosidasa) capaces de hidrolizar los terpenos combinados y liberar el aroma oculto (Swiegers et al., 2005).

El único terpeno identificado en su forma libre ha sido el citronelol. Aunque su concentración no ha sido muy elevada, ha estado presente en todos los ensayos. Resultados esperados en una variedad relativamente neutra como la Verdejo.

Ha habido diferencias notables entre los vinos sometidos a régimen secuencial, donde se han obtenido mayores concentraciones y los sometidos a inoculación simultánea.

Un C13-norisoprenoide ha sido encontrado, la β -damascenona. Su concentración ha sido similar a la observada en el citronelol. En este caso, este compuesto ha sido identificado únicamente en las inoculaciones secuenciales (figura 14), aumentando su concentración durante la crianza, excepto en la secuencial S.2.12 y formándose en la coinoculación C.2.12.

5.3.6. Miscelánea

Esta agrupación hace referencia a la mezcla de compuestos. En nuestro trabajo, los que han tenido mayor presencia y los encontrados en mayor concentración han sido el carbitol, 2-metiltetrahidrotiofen-3-ona, vinilbenceno y el óxido de estireno. Todos ellos sin mucha relevancia. El único compuesto que también se ha encontrado en el control (CTRL) ha sido el 2-metiltetrahidrotiofen-3-ona. Como se puede observar en la figura 14, todos los compuestos están repartidos entre los diferentes ensayos, no se observan diferencias notables entre compuestos.

Tabla 4. Designación de los compuestos identificados por GC-MS. Referencias encontradas en anexos. Fuente propia

Código	Nombre (español)	Notas aromáticas
ALC	Alcoholes	
ALC1	1-propanol	Fruta, madera, alcohol (1)
ALC2	Isobutanol	Aceitoso, amargo, verde (1)
ALC3	Butan-1-ol	Fusel (4)
ALC4	Alcohol isoamílico	Fusel (1)
ALC5	(S)-3-metil-1-pentanol	Tostado (23)
ALC6	3-metilpentano-1,5-diol	-
ALC7	1-hexanol	Floral, verde, hierba (1)
ALC8	trans-3-Hexenol	Hierba cortada (4)
ALC9	1-heptanol	Graso (11)
ALC10	Octanol	Alcohólico, graso (6)
ALC11	3-metilpropanol	Cocido, vegetal (1)
ALC12	1-decanol	Dulce (7)
ALC13	Alcohol benzílico	Almendra (4)
ALC14	2-fenil etanol	floral, rosas (1)
EST	Ésteres	
EST1	Octanoato de metilo	Afrutado, naranja (13)
EST2	Hexanoato de isoamilo	Afrutado (13)
EST3	Octanoato de isoamilo	Afrutado (13)
EST4	Fenilacetato de etilo	Rosas (4)
EST5	Decanoato de isoamilo	Piña, banana, fruta dulce (22)
EST6	Fenil propanoato	Floral, frutal (7)
EST7	Etil isopentil succinato	Acre (24)
EST8	Etil pentadecanoato	-
EST9	Propanoato de etilo	Ron y piña (12)
EST10	Isobutirato de etilo	Frutal, manzana, papaya (6)
EST11	Butirato de etilo	Fruta (1)
EST12	2-metil butirato de etilo	Afrutado, anís, fresa (4)
EST13	3-metil butanoato de etilo	Afrutado, anís (4)
EST14	Hexanoato de etilo	Manzana verde (1)
EST15	Heptanoato de etilo	Brandy (13)
EST16	Lactato de etilo	Dulce, frutal (4)
EST17	Octanoato de etilo	Dulce, afrutado (1)
EST18	Decanoato de etilo	Dulce, afrutado (1)
EST19	Succinato de etilo	Afrutado, uva verde (11)
EST20	Bezoato de etilo	Afrutado (11)
EST21	Dec-9-enoato de etilo	Jabón (4)
EST22	4-hidroxibutanoato de etilo	Afrutado (12)
EST23	Dodecanoato de etilo	Floral, afrutado (13)
EST24	Miristato de etilo	Cera, (13)
EST25	Etil 3-hidroxihexanoato	Afrutado (19)
EST26	Palmitato de etilo	Cera (13)

Tabla 4. Continuación

Código	Nombre (español)	Notas aromáticas
EST27	Etil 9-hexadecanoato	-
EST28	Etil 11-hexadecanoato	-
EST29	Acetato de etilo	Fruta, disolvente (1)
EST30	Acetato de 2-feniletilo	Floral (1)
EST31	Acetato de isoamilo	Plátano (1)
EST32	Acetato de hexilo	Manzana madura, frutal (6)
EST33	Acetato de cis-3-hexenilo	-
EST34	Acetato de heptilo	Olor graso y afrutado (11)
EST35	Acetato de octilo	Fresa (4)
ALD/CET	Aldehídos y cetonas	
ALD1	Acetaldehído	Nuez (21)
ALD2	n-octanal	Limón, naranja, disolvente (4)
ALD3	Nonanal	Graso, ceroso (5)
ALD4	Benzaldehido	Almendras amargas (4)
ALD5	2-fenil acetaldelido	Miel, flores (2)
CET1	2-octanona	Herbáceo, alcanforado (14)
CET2	Nonanona	Floral, afrutado (8)
ACI	Ácidos	
ACI1	Ácido acético	Ácido (15)
ACI2	Ácido isobutírico	Rancio, mantequilla, queso (1)
ACI3	Ácido isovalérico	Dulce, ácido, rancio (1)
ACI4	Ácido hexanoico	Sudor (1)
ACI5	Ácido octanoico	Sudor, queso (1)
ACI6	Ácido nonanoico	Graso, coco (10) (11)
ACI7	Ácido decanoico	Graso, rancio (1)
ACI8	Ácido caproléico	Algo afrutado, lechoso (20)
TER/NOR	Terpenos y norisoprenoides	
TER1	Citronelol	Cítrico, limón verde (4)
NOR1	b-damascenona	Miel, frutal, manzana, caramelo (3)
LAC	Lactonas	
LAC1	Gamma-butirolactona	Dulce, graso, melocotón (4)
MIX	Miscelánea	
MIX1	Vinilbenceno	Dulce, balsámico, casi floral (12)
MIX2	Óxido de estireno	Dulce (9)
MIX3	Carbitol	Suave y agradable (16)
MIX4	Azuleno	Caucho (17)
MIX5	Naftalina	Acre (18)
MIX6	2-Metiltetrahidrotiofen-3-ona	Picante, aliáceo, café (12)
MIX7	Dietanolamida láurica	-
MIX8	2,4-di-tert-butilfenol	-
MIX9	Metoxifenil-oxima	-

6. Conclusiones

Después de realizar el análisis de los resultados hemos podido sacar en claro las siguientes conclusiones:

- Se observó un comienzo más tardío de la fermentación alcohólica por parte de las inoculaciones secuenciales.
- Las coinoculaciones producen fermentaciones más vigorosas.
- Una vez inoculada *S. cerevisiae* en las inoculaciones secuenciales, las cinéticas fermentativas se comportan de forma similar en ambas estrategias. Antes de su inoculación, se pueden apreciar diferencias notables.
- Mayor influencia de *S. cerevisiae* en coinoculaciones, al observarse cambios de densidad más bruscos.
- Se redujo el grado alcohólico obtenido en las inoculaciones secuenciales.
- Se aprecia disminución de pH en inoculaciones secuenciales, coincidiendo con aumentos de acidez total. Posible uso como estrategia de acidificación biológica.
- Gran producción de ésteres y menor cantidad de alcoholes en vinos donde ha estado presente *T. delbrueckii*, elaborados con la variedad Verdejo. Muy baja producción de terpenos.
- Cantidades notables de acetato de 2-feniletilo y de su precursor el 2-fenil-etanol en ensayos sometidos a régimen secuencial.
- Se detectaron mayores cantidades de ésteres en ensayos en régimen de coinoculación.
- Cantidades notables de octanoato de etilo, acetato de isoamilo y acetato de etilo en el vino control sometido a fermentación espontánea.

Este trabajo muestra el perfil afrutado y floral de la variedad Verdejo y cómo potenciar estos aromas utilizando las herramientas biotecnológicas adecuadas. También pone de manifiesto el uso de *T. delbrueckii* como estrategia de acidificación biológica, así como en la reducción de grado alcohólico. El uso de estas herramientas, abren una vía aún en estudio, para hacer frente a los cambios venideros.

Bibliografía

Azzolini, M., Tosi, E., Lorenzini, M., Finato, F., & Zapparoli, G. (2014). *Contribution to the aroma of white wines by controlled *Torulaspora delbrueckii* cultures in association with *Saccharomyces cerevisiae**. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(2), 277–293.

Bayonove, C.L., Gunata, Y.Z., and Cordonnier, R.E. (1984). *Mise in evidence de l'intervention des enzymes dans le développement de l'arôme du jus de Muscat avant fermentation: La production des terpénols*. *Bulletin de l'office International de la Vigne et du Vin*. January, 643, 741-758.

Belda, I., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., Calderon, F., & Benito, S. (2014). *Dynamic analysis of physiological properties of *Torulaspora delbrueckii* in wine fermentations and its incidence on wine quality*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(4), 1911–1922.

Belda, I., Ruiz, J., Alastruey-izquierdo, A., & Navascués, E. (2016a). *Unraveling the Enzymatic Basis of Wine "Flavorome": A Phylo-Functional Study of Wine Related Yeast Species*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1–13.

Belda, I., Ruiz, J., Beisert, B., Navascués, E., Marquina, D., Calderón, F., Rauhut, D., Benito, S., & Santos, A. (2017). *International Journal of Food Microbiology Influence of *Torulaspora delbrueckii* in varietal thiol (3-SH and 4-MSP) release in wine sequential fermentations*. *International Journal of Food Microbiology*, 257, 183–191.

Belda, I., Ruiz, J., Navascués, E., Marquina, D., & Santos, A. (2016b). *Improvement of aromatic thiol release through the selection of yeasts with increased β -lyase activity*. *International Journal of Food Microbiology*, 225, 1–8.

Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-pomarède, I., & Dubourdieu, D. (2008). *Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii* – *Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation*. *International Journal of Food Microbiology*, 122(3), 312–320.

Benito, S. (2018). *The impact of *Torulaspora delbrueckii* yeast in winemaking*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(7), 3081–3094.

Reglamento (CEE) N° 2676/90. *Métodos de análisis comunitarios aplicables en el sector del vino*.

Ciani, M., Beco, L., & Comitini, F. (2006). *Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations*. *International Journal of Food Microbiology*, 108(2), 239–245.

Contreras, A., Hidalgo, C., Henschke, P. A., Chambers, P. J., Curtin, C., & Varela, C. (2013). *Evaluation of non-*Saccharomyces* yeast for the reduction of alcohol content in wine*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(5), 1670–1678.

Del Álamo Sanza, M., 2002. *Prácticas de análisis de vinos*. Palencia: Publicaciones E.T.S.II.A.

Escribano-viana, R., González-arenzana, L., Portu, J., Garijo, P., López-alfaro, I., López, R., & Gutiérrez, A. R. (2018). *Wine aroma evolution throughout alcoholic fermentation sequentially inoculated with non- Saccharomyces/Saccharomyces yeasts*. *Food Research International*, 112, 17–24.

Fleet, G. H. (2006). *The commercial and community significance of yeasts in food and beverage production*. *Yeasts in food and beverages*. 1–12.

Fleet, G. H. (1990). *Growth of yeasts during wine fermentations* Growth of Yeasts during Wine Fermentations. *Journal of Wine Research*, 1(3), 211–223.

Furlani, M., Maturano, Y. P., Toro, E., Combina, M., Anal, L., & Vazquez, F. (2017). *Selection of non- Saccharomyces yeasts to be used in grape musts with high alcoholic potential: a strategy to obtain wines with reduced ethanol content*. *FEMS Yeast Research*, 17(2), 1-10.

Hansen, E. H., Nissen, P., Sommer, P., Nielsen, J. C., & Arneborg, N. (2001). *The effect of oxygen on the survival of non- Saccharomyces yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 541–547.

Herraiz, T., Reglero, G., Martín-alvarez, P. J., Herraiz, M., & Cabezudo, M. D. (1991). *Identification of Aroma Components of Spanish “ Verdejo” Wine*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 55(1), 103–116.

Hopfer, H., Bu, P. A., Ebeler, S. E., & Heymann, H. (2013). *The Combined Effects of Storage Temperature and Packaging on the Sensory, Chemical, and Physical Properties of a Cabernet Sauvignon Wine*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(13), 3320–3334.

Howell, K. S., Swiegers, J. H., Elsey, G. M., Siebert, T. E., Bartowsky, E. J., Fleet, G. H., Pretorius, I. S., & Barros, M. A. De. (2004). *Variation in 4-mercapto-4-methyl-pentan-2-one release by Saccharomyces cerevisiae commercial wine strains*. *FEMS Microbiology Letters*, 240(2), 125–129.

Hu, K., Jin, G., Mei, W., Li, T., & Tao, Y. (2018). *Increase of medium-chain fatty acid ethyl ester content in mixed H. uvarum/S. cerevisiae fermentation leads to wine fruity aroma enhancement*. *Food Chemistry*, 239, 495–501.

Jolly, N. P., Varela, C., & Pretorius, I. S. (2013). *Not your ordinary yeast: non-Saccharomyces yeasts in wine production uncovered*. *FEMS Yeast Research*, 14(2), 215–237.

Kapsopoulou, K., Mourtzini, A., Anthoulas, M., & Nerantzis, E. (2006). *Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of Kluyveromyces thermotolerans and Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(5), 735–739.

Liu, P., Lu, L., Duan, C., & Yan, G. (2016). *The contribution of indigenous non-Saccharomyces wine yeast to improved aromatic quality of Cabernet Sauvignon wines by spontaneous fermentation*. *LWT - Food Science and Technology*, 71, 356–363.

Liu, S., Laaksonen, O., Kortensniemi, M., Kalpio, M., & Yang, B. (2018). *Chemical composition of bilberry wine fermented with non-Saccharomyces yeasts (Torulaspora delbrueckii and Schizosaccharomyces pombe) and Saccharomyces cerevisiae in pure, sequential and mixed fermentations. Food Chemistry, 266, 262–274.*

Loira, I., Morata, A., Comuzzo, P., Callejo, M. J., González, C., Calderón, F., & Suárez-Lepe, J. A. (2015). *Use of Schizosaccharomyces pombe and Torulaspora delbrueckii strains in mixed and sequential fermentations to improve red wine sensory quality. Food Research International, 76, 325-333.*

Maggu, M., Winz, R., Kilmartin, P. A., Trought, M. C. T., & Nicolau, L. (2007). *Effect of Skin Contact and Pressure on the Composition of Sauvignon Blanc Must. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(25), 10281–10288.*

Mateo, J. J., & Stefano, R. Di. (1997). *Description of the β -glucosidase activity of wine yeasts. 583–591.*

Modig, T., Granath, K., Adler, L., & Lidén, G. (2007). *Anaerobic glycerol production by Saccharomyces cerevisiae strains under hyperosmotic stress. Applied Microbiology and Biotechnology, 75(2), 289–296.*

Nerantzis, E. (2006). *Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of Kluyveromyces thermotolerans and Saccharomyces cerevisiae. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 23(5), 735–739.*

Nissen, P., & Arneborg, N. (2003). *Characterization of early deaths of non-Saccharomyces yeasts in mixed cultures with Saccharomyces cerevisiae. Archives of Microbiology, 180(4), 257–263.*

OIV. (2009). *Compendium of International Methods of Analysis. Método MA-AS323-04B. Sulfur dioxide.*

Pérez-Coello, M. S., Martín-Álvarez, P. J., & Cabezudo, M. D. (1999). *Prediction of the storage time in bottles of Spanish white wines using multivariate statistical analysis. Z Lebensm Unters Forsch A, 208(5-6), 408–412.*

Puertas, B., Marrufo, A., Carbú, M., Cuevas, F. J., & Cantoral, J. M. (2018). *The influence of yeast on chemical composition and sensory properties of dry white wines. Food Chemistry, 253, 227–235.*

Rankine, B. C. (1968). *Formation of α -ketoglutaric acid by wine yeasts and its oenological significance. Journal of the Science of Food and Agriculture, 19(11), 624–627.*

Renault, P., Coulon, J., Revel, G. De, Barbe, J., & Bely, M. (2015). *Increase of fruity aroma during mixed T. delbrueckii/S. cerevisiae wine fermentation is linked to specific esters enhancement. International Journal of Food Microbiology, 207, 40–48.*

Renault, P., Miot-sertier, C., Marullo, P., Lagarrigue, L., Lonvaud-funel, A., & Bely, M. (2009). *Genetic characterization and phenotypic variability in Torulaspora delbrueckii species: Potential applications in the wine industry. International Journal of Food Microbiology, 134, 201–210.*

Rosi, I., Vinella, M., & Domizio, P. (1994). *Characterization of β -glucosidase activity in yeasts of oenological origin*. *Journal of Applied Bacteriology*, 77(5), 519–527.

Sánchez-Palomo, E., Alonso-Villegas, R., González Viñas, M. A. (2015). *Characterisation of free and glycosidically bound aroma compounds of La Mancha Verdejo white wines*. *April. Food Chemistry*. 173, 1195–1202.

Schreier, P., Jennings, W. G., & Schreier, P. (1979). *Flavor composition of wines: A review*. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 12(1), 59–111.

Soden, A., Francis, I. L., Oakey, H., & Henschke, P. A. (2000). *Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6(1), 21–30.

Swiegers, J. H., Bartowsky, E., & Pretorius, I. S. (2005). *Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 139–173.

Ubeda, C., Hornedo-Ortega, R., Cerezo, A. B., Carmen Garcia-Parrilla, M., & Troncoso, A. M. (2020). *Chemical hazards in grapes and wine, climate change and challenges to face*. *Food Chemistry*, 126222.

Ugliano, M., & Henschke, P. A. (2009). *Yeasts and Wine Flavour*. *Wine Chemistry and Biochemistry*, 313–392.

UNE-EN ISO/IEC 17025:2017. *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración*.

Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G. U. Y., Dufour, J., Winderickx, J., Thevelein, J. M., Pretorius, I. S., Delvaux, F. R. (2003). *Flavor-Active Esters: Adding Fruitiness to Beer*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(2), 110–118.

Anexos

Tabla A1. Parámetros físico-químicos en vinos elaborados con inoculaciones simultáneas, inoculaciones secuenciales y vino control después de un año de envejecimiento. Fuente propia

Crianza en botella				
	C.1.12	S.1.12	C.2.12	S.2.12
Acidez Total (g l⁻¹)	7,35 ± 0,2	7,8 ± 0,4	7,2 ± 0,1	7,4 ± 0,1
Acidez Volátil (g l⁻¹)	0,21 ± 0,02	0,24 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,22 ± 0,01
pH	3,40 ± 0,01	3,40 ± 0,05	3,44 ± 0,10	3,47 ± 0,09
Etanol (vol.%)	12,3 ± 0,6	12,0 ± 0,5	12,5 ± 0,2	12,3 ± 0,2

Los resultados representan la meda de 4 duplicados ± Desviación estándar (SD).

Inoculación secuencial (S.1.12) y coinoculación (C.1.12) de *Torulaspora delbrueckii* y *Saccharomyces cerevisiae* recomendada para blancos, sometidos a un año de crianza en botella. Inoculación secuencial (S.2.12) y coinoculación (C.2.12) de *Torulaspora delbrueckii* y *Saccharomyces cerevisiae* recomendada para tintos, sometidos a un año de crianza en botella.

Tabla A2. Medias de las áreas de los compuestos identificados por GC-MS de los vinos terminados. Fuente propia

Código	CTRL	C.1	C.2	S.1	S.2	C.1.12	C.2.12	S.1.12	S.2.12
ALC1	0,0214	0,0231	0,0235	0,0247	0,0211	0,0268	0,0253	0,0286	0,0274
ALC2	0,2224	0,2713	0,2313	0,3845	0,3738	0,3353	0,2464	0,4780	0,5647
ALC3	0,0000	0,0088	0,0098	0,0119	0,0091	0,0115	0,0115	0,0156	0,0156
ALC4	7,3592	7,5731	7,2408	8,0022	6,4015	9,4628	7,8671	9,4741	8,4040
ALC5	0,0292	0,0218	0,0209	0,0109	0,0084	0,0262	0,0239	0,0130	0,0109
ALC6	0,0000	0,0064	0,0101	0,0069	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
ALC7	0,2745	0,2995	0,3101	0,3280	0,2798	0,3816	0,3389	0,3862	0,3823
ALC8	0,0223	0,0233	0,0230	0,0276	0,0219	0,0286	0,0252	0,0325	0,0321
ALC9	0,1326	0,1276	0,1399	0,0953	0,0736	0,1598	0,1453	0,1097	0,0991
ALC10	0,0116	0,0179	0,0149	0,0128	0,0092	0,0229	0,0163	0,0151	0,0124
ALC11	0,0477	0,0292	0,0322	0,0560	0,0768	0,0488	0,0307	0,0602	0,0693
ALC12	0,0054	0,0109	0,0000	0,0042	0,0000	0,0093	0,0034	0,0029	0,0000
ALC13	0,0000	0,0090	0,0052	0,0221	0,0128	0,0217	0,0106	0,0324	0,0148
ALC14	3,4041	3,1938	4,3859	6,2446	7,9949	4,1089	4,5246	7,5113	7,6063

Tabla A2. Continuación

Código	CTRL	C.1	C.2	S.1	S.2	C.1.12	C.2.12	S.1.12	S.2.12
EST1	0,0141	0,0117	0,0108	0,0032	0,0069	0,0032	0,0028	0,0000	0,0000
EST2	0,0543	0,0292	0,0327	0,0150	0,0371	0,0158	0,0167	0,0118	0,0068
EST3	0,0759	0,0392	0,0406	0,0131	0,0286	0,0463	0,0495	0,0295	0,0203
EST4	0,0000	0,0000	0,0000	0,0039	0,0000	0,0085	0,0079	0,0136	0,0114
EST5	0,0449	0,0481	0,0338	0,0149	0,0199	0,0517	0,0372	0,0243	0,0195
EST6	0,0000	0,0000	0,0000	0,0142	0,0213	0,0000	0,0000	0,0075	0,0096
EST7	0,0000	0,0000	0,0000	0,0076	0,0051	0,0171	0,0191	0,0288	0,0235
EST8	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0071	0,0085	0,0109	0,0100
EST9	0,0036	0,0000	0,0000	0,0064	0,0000	0,0000	0,0046	0,0042	0,0000
EST10	0,0048	0,0045	0,0000	0,0000	0,0000	0,0293	0,0168	0,0456	0,0893
EST11	0,0652	0,0426	0,0463	0,0358	0,0334	0,0535	0,0504	0,0487	0,0533
EST12	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0306	0,0231	0,0166	0,0000
EST13	0,0121	0,0097	0,0000	0,0049	0,0000	0,0337	0,0222	0,0255	0,0196
EST14	2,6636	2,0846	2,3295	1,4618	1,5870	0,9408	2,3203	1,7993	1,6920
EST15	0,0689	0,0358	0,0440	0,0304	0,0327	0,0236	0,0291	0,0281	0,0197
EST16	0,0199	0,0150	0,0168	0,0177	0,0138	0,0383	0,0483	0,0571	0,0474
EST17	15,7356	10,8029	11,1313	5,5303	10,2467	6,6343	6,6626	5,1316	3,7358
EST18	4,1653	2,0618	1,9215	0,6953	1,6401	2,4848	2,1682	1,4944	1,0747
EST19	0,0209	0,0435	0,0530	0,0531	0,0550	0,2340	0,2940	0,3785	0,3409
EST20	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0074	0,0037	0,0029	0,0000
EST21	3,0612	0,9414	0,9391	0,4836	1,0611	0,9093	0,9194	0,7126	0,6444
EST22	0,0839	0,0402	0,0248	0,0237	0,0343	0,0347	0,0123	0,0117	0,0110
EST23	0,9572	0,6227	0,4593	0,1820	0,3589	0,8814	0,4034	0,2899	0,2713
EST24	0,0561	0,0542	0,0648	0,0454	0,0664	0,0845	0,0789	0,1147	0,0913
EST25	0,0000	0,0038	0,0000	0,0055	0,0092	0,0046	0,0032	0,0000	0,0059

Tabla A2. Continuación

Código	CTRL	C.1	C.2	S.1	S.2	C.1.12	C.2.12	S.1.12	S.2.12
EST26	0,1201	0,1478	0,2194	0,1765	0,2117	0,2115	0,2704	0,3198	0,2908
EST27	0,0000	0,0000	0,0053	0,0000	0,0000	0,0000	0,0148	0,0216	0,0084
EST28	0,0000	0,0000	0,0057	0,0041	0,0000	0,0147	0,0095	0,0000	0,0000
EST29	0,5581	0,3750	0,3819	0,3182	0,2835	0,5304	0,4359	0,4414	0,4390
EST30	0,5165	0,5452	0,7986	0,7883	0,9845	0,4503	0,5366	0,6759	0,6778
EST31	1,6916	1,1017	0,9859	0,5642	0,6081	0,7437	0,4976	0,4315	0,4870
EST32	0,3012	0,1825	0,1659	0,0625	0,0892	0,1067	0,0742	0,0300	0,0489
EST33	0,0284	0,0128	0,0190	0,0000	0,0087	0,0140	0,0000	0,0000	0,0080
EST34	0,0304	0,0076	0,0127	0,0000	0,0077	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
EST35	0,0151	0,0000	0,0000	0,0000	0,0060	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
ALD1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0147	0,0000	0,0110	0,0000	0,0273
ALD2	0,0050	0,0000	0,0055	0,0096	0,0082	0,0027	0,0073	0,0042	0,0082
ALD3	0,0296	0,0320	0,0359	0,0381	0,0359	0,0363	0,0430	0,0323	0,0417
ALD4	0,0275	0,0315	0,0289	0,0352	0,0404	0,1198	0,0444	0,0546	0,0474
ALD5	0,0149	0,0000	0,0000	0,0382	0,0527	0,0048	0,0189	0,0447	0,0141
CET1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0080	0,0000	0,0079	0,0077	0,0086	0,0072
CET2	0,0000	0,0111	0,0050	0,0047	0,0000	0,0140	0,0062	0,0258	0,0087
ACI1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0050	0,0000	0,0046	0,0097	0,0093
ACI2	0,0000	0,0157	0,0232	0,0550	0,0566	0,0237	0,0258	0,0629	0,0774
ACI3	0,0771	0,0880	0,0748	0,0831	0,0731	0,0994	0,0757	0,1016	0,0683
ACI4	0,1586	0,1972	0,2209	0,1701	0,2119	0,2417	0,2205	0,1819	0,2010
ACI5	0,7401	0,7305	0,7689	0,4759	0,7953	0,9542	0,8617	0,5984	0,7332
ACI6	0,0000	0,0095	0,0000	0,0044	0,0058	0,0099	0,0095	0,0048	0,0055
ACI7	0,5173	0,5374	0,3820	0,1513	0,3111	0,4017	0,2952	0,1975	0,1478
ACI8	0,0781	0,0528	0,0509	0,0320	0,0594	0,0657	0,0520	0,0424	0,0294

Tabla A2. Continuación

Código	CTRL	C.1	C.2	S.1	S.2	C.1.12	C.2.12	S.1.12	S.2.12
TER1	0,0042	0,0096	0,0130	0,0152	0,0187	0,0097	0,0133	0,0140	0,0138
NOR1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0137	0,0167	0,0000	0,0080	0,0226	0,0121
LAC1	0,0706	0,0453	0,0381	0,0354	0,0536	0,0601	0,0410	0,0356	0,0390
MIX1	0,0000	0,0000	0,0066	0,0000	0,0000	0,0162	0,0107	0,0160	0,0097
MIX2	0,0000	0,0133	0,0337	0,0000	0,0000	0,0215	0,0000	0,0000	0,0214
MIX3	0,0000	0,0085	0,0038	0,0073	0,0041	0,0093	0,0043	0,0091	0,0000
MIX4	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0039	0,0053	0,0000	0,0000
MIX5	0,0000	0,0000	0,0051	0,0000	0,0048	0,0056	0,0000	0,0000	0,0000
MIX6	0,0256	0,0061	0,0092	0,0060	0,0000	0,0066	0,0072	0,0053	0,0034
MIX7	0,0000	0,0373	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
MIX8	0,0000	0,0000	0,0000	0,0622	0,0000	0,0345	0,0000	0,0153	0,0501
MIX9	0,0000	0,0406	0,0179	0,0201	0,0151	0,0264	0,0000	0,0260	0,0000

Tabla A3. Áreas de los patrones internos de concentración conocida utilizados en vino terminado. Fuente propia

Código	CTRL1	CTRL2	C.1.1	C.1.2	C.2.1	C.2.2	S.1.1	S.1.2	S.2.1	S.2.2
2-octanol	45037967	66010251	54499575	59896963	58350533	55196176	69224856	74682478	53381735	64277877
Nonanoato de metilo	82718458	93987912	92178585	96027116	90476202	89550791	92491976	91746037	75839839	90767028
Ácido 2-metil-hexanóico	12452348	20082741	15119379	15560776	16854334	17995341	20033682	25254497	25361168	21639136

Tabla A4. Áreas de los patrones internos de concentración conocida utilizados en vinos envejecidos. Fuente propia

Código	C.1.1.12	C.1.2.12	C.2.1.12	C.2.2.12	S.1.1.12	S.1.2.12	S.2.1.12	S.2.2.12
2-octanol	55188001	66355579	54480697	54170550	59304593	74336562	70374081	79334115
Nonanoato de metilo	63942200	90865497	82840338	83481596	82027119	68412960	82019836	83604916
Ácido 2-metil-hexanóico	15762147	15682398	15853256	17668327	17311554	20183815	22246644	21469234

Referencias correspondientes a la tabla 4.

- (1) Marchante Cuevas, L., Mena Morales, A., & Martínez Gascuña, J. (2020). *Perfil aromático y sensorial de los vinos albillo real y albillo dorado. Revista Enologos*, 123, 56-62.
- (2) Jackson R. S. *Olfactory Sensations*. Elsevier. Wine tasting: a professional handbook. Third Edition. Ontario: Academic Press; 2017. p. 41-101
- (3) Pineau, B., Barbe, J.-C., Van Leeuwen, C., & Dubourdiou, D. (2007). *Which Impact for β -Damascenone on Red Wines Aroma?. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10), 4103–4108.
- (4) Vilanova, M., Oliveira, J. M., Rivas, R., Alonso, J. C., Martínez-Zapater, J. M., Ibáñez, J., & Cacho, J. El potencial aromático de las variedades de vid cultivadas en Galicia. Santiago de Compostela: Xunta de Galicia, Consellería del Medio Rural. 2017
- (5) Burdock, G. A. *Encyclopedia of Food and Color Additives*. Boca Raton: CRC Press. 1997. Vol. 1
- (6) Cedrón Fernández, M. T. (2004). *Estudio analítico de compuestos volátiles en vino. Caracterización quimiométrica de distintas denominaciones de origen. Tesis doctoral por la Universidad de La Rioja*.
- (7) Lewis R. A., Lewis R.J. Sr., & Larrañaga M. D. *Hawley's Condensed Chemical Dictionary*. Sixteenth Edition. New Jersey: Wiley & Sons; 2002
- (8) Han, J. H. *Innovations in Food Packaging*. Second Edition, TX (USA): Academic Press. 2014. p. 459
- (9) Verschueren, K. *Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals*. Fourth Edition, New York: Wiley & Sons; 2001. Vol. 1-2.
- (10) Fenaroli, G., Bellanca, N., & Furia, T. E. *Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients*. Second Edition. Cleveland: CRC Press, 1975. Vol. 2.
- (11) Furia, T. E. *Handbook of Food Additives*. Second Edition. Boca Raton, Florida: CRC Press. 1980. Vol. 2
- (12) Burdock, G. A. *Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients*. Sixth Edition. Boca Raton: CRC Press. 2010.
- (13) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Meeting, World Health. *Compendium of Food Additive Specifications: Addendum 5*. p. 206
- (14) Arctander, S. *Perfume & Flavor Chemicals (Aroma Chemicals)*. Denmark. 1969. Vol. 2
- (15) Hui, Y. H. *Handbook of Food Science, Technology, and Engineering*, Boca raton: Taylor & Francis. 2006. Vol 4
- (16) Lewis, R.J. Sr. *Hawley's Condensed Chemical Dictionary*. Fourteenth Edition. New York: John Wiley & Sons; 2001. p. 373
- (17) Arctander, S. *Perfume and Flavor Materials of Natural Origin*. N.J (U.S.A): Elizabeth; 1960. p. 117
- (18) Myers, R. L. *The 100 Most Important Chemical Compounds: A Reference Guide*. CT (USA): Greenwood Press. 2007. p. 188
- (19) Burdock, G. A. *Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients*. Fourth Edition. Boca Raton: CRC Press. 2001. p. 554
- (20) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Meeting, World Health. *Compendium of Food Additive Specifications: Addendum 9*. p. 116
- (21) Jackisch, P. *Modern Winemaking*. Ithaca and London: Cornell University Press. 1985. p. 51
- (22) Lee, J.-E., Hyun Yun, J., Ran Lee, A., & Soo Kim, S. (2018). *Volatile components and sensory properties of jujube wine as affected by material preprocessing. International Journal of Food Properties*, 21:1, 2052-2061.

Uso de levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* y su influencia en el perfil aromático durante la vinificación.

(23) Selli, S., Canbas, A., Varlet, V., Kelebek, H., Prost, C., & Serot, T. (2008). *Characterization of the Most Odor-Active Volatiles of Orange Wine Made from a Turkish cv. Kozan (Citrus sinensis L. Osbeck)*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(1), 227-234.

(24) Yu, H., Xie, T., Xie, J., Ai, L., & Tian, H. (2019). *Characterization of key aroma compounds in Chinese rice wine using gas chromatography mass spectrometry and gas chromatography olfactometry*. *Food Chemistry*. 293, 8-4.