



---

**Universidad de Valladolid**  
**Campus de Palencia**

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR  
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

**Grado en Enología**

Estudio del impacto de levaduras  
no-*Saccharomyces* para mejorar la  
calidad de vinos tintos

Alumna: Patricia Sánchez

Tutora: Josefina Vila  
Cotutora: Violeta Ruipérez



## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	3
<b>INTRODUCCIÓN</b>	4
1. Proceso de vinificación	4
2. Levaduras en el proceso de vinificación	4
3. Fermentaciones mixtas: <i>Saccharomyces</i> /no- <i>Saccharomyces</i>	6
4. Influencia de no- <i>Saccharomyces</i> en la composición de vinos tintos	8
4.1. Alcoholes	9
4.1.1. Etanol	9
4.1.2. Glicerol	10
4.1.3. Alcoholes superiores	11
4.2. Ácidos	11
4.2.1. Tartárico, málico, láctico, succínico, cítrico y pirúvico	11
4.2.2. Acético	12
4.3. Ésteres	13
4.4. Polisacáridos	14
4.5. Compuestos responsables del color	14
<b>OBJETIVOS</b>	16
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	16
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	17
5. Contribución de las levaduras no- <i>Saccharomyces</i> en la elaboración de vinos tintos	17
5.1. Tolerancia, producción de etanol y rendimiento alcohólico	17
5.2. Producción de ácido acético y otros ácidos	20
5.3. Influencia sobre las características sensoriales	22
5.3.1. Compuestos responsables de la estructura	22
5.3.2. Compuestos responsables del color	23
5.3.3. Compuestos aromáticos de fermentación	25
<b>CONCLUSIONES</b>	28
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	29
<b>ANEXOS</b>	33
<b>ABREVIATURAS</b>	37



## RESUMEN

Este trabajo Fin de Grado, trata de comprender el impacto de las levaduras no-*Saccharomyces* en la elaboración de vinos tintos, con el fin de conocer el papel que estas desempeñan durante este proceso, identificar la influencia de cada una de ellas en el producto final y poder así modular algunos componentes que influyen en la calidad como los alcoholes, ácidos, polisacáridos, compuestos responsables del color y del aroma, para obtener vinos con una mayor complejidad que permita mantener las características particulares de cada variedad y mejorar la calidad de los mismos.

Para su realización ha sido necesaria una amplia revisión bibliográfica de artículos científicos y libros de microbiología enológica que abordan este tema, para comparar los resultados de los diferentes autores respecto al papel que juegan los distintos géneros y especies de levaduras sobre los componentes más importantes del vino.

Tal y como se ha comprobado con la elaboración de este trabajo, existe gran interés en el mundo de la enología acerca del uso de distintos géneros y especies de levaduras, ya que ello podría suponer una gran ventaja competitiva para los actuales enólogos en la búsqueda de la elaboración de vinos con mayor calidad y complejidad.

**Palabras clave:** Fermentación alcohólica, levadura, vino, no-*Saccharomyces*

## ABSTRACT

This Final Degree Project, tries to understand the impact of no-*Saccharomyces* yeast in the production of red wines. The objective is to know the role that yeast play during the winemaking process, identify the influence of each of them on the final product and in this way, with the possibility of modulating some components that influence quality, such as alcohols, acids, polysaccharides, compounds responsible for colour and aroma, to obtain wines with higher complexity that allow maintaining the particular characteristics of each variety and improving their quality.

For its realization it was necessary a great bibliographic review of scientific articles and oenological microbiology books about this topic, to compare the results of the different authors, regarding the role that different genus and species of yeast play on the most important components of wine.

As it has been verified with the elaboration of this work, there is great interest in the world of oenology about the use of different genera and species of yeast, since this could be a great competitive advantage for current oenologists in the search for making wines with higher quality and complexity.

**Keywords:** Alcoholic fermentation, yeast, wine, no-*Saccharomyces*



# INTRODUCCIÓN

## 1. Proceso de vinificación

El proceso de vinificación comienza una vez se ha recolectado la uva, se ha trasladado a la bodega y ha sido despalillada y estrujada. El primer proceso clave a lo largo de la vinificación es la fermentación alcohólica, en ella se suceden complejas interacciones entre levaduras, bacterias y otras especies microbianas (Beltran et al., 2002), produciéndose numerosas reacciones bioquímicas donde las levaduras juegan un papel fundamental (Ciani et al., 2010). Las levaduras son los microorganismos responsables de transformar el azúcar del mosto en etanol y anhídrido carbónico principalmente, pero además se forman cientos de subproductos con gran importancia para la calidad del producto final, el vino. Por lo tanto, el vino es un producto natural, resultado de la combinación y sucesión de todas las interacciones microbianas que tienen lugar a lo largo del proceso (Esteve-Zarzoso et al., 1998).

En el Neolítico, fue cuando por primera vez se produjo vino de forma accidental, pero no fue hasta la década de 1860 cuando se comenzó a estudiar este proceso en profundidad y a considerar a las levaduras como un factor clave en la elaboración de vino. Aunque tradicionalmente la fermentación alcohólica se realizaba de forma espontánea, debido a la presencia de levaduras en el hollejo de la uva, en el ambiente y en las superficies de la bodega, actualmente es más común llevarla a cabo mediante inoculación de cepas de levaduras comerciales para evitar riesgos durante el proceso. Las estrategias de vinificación actuales están enfocadas a la búsqueda de vinos más complejos y controlados, capaces de mantener las características típicas de la variedad y de la zona, evitando la estandarización para obtener vinos de mayor calidad y diferenciados, cada vez más demandados por los consumidores.

El vino tinto es producto de la maceración del mosto con las partes sólidas de la baya durante la fermentación alcohólica, encontrándose en el hollejo la pigmentación característica de estos vinos. La intensidad y duración de la maceración dependen del tipo de vino que se quiera obtener, por lo que este proceso también es uno de los más importantes durante la fermentación, ya que de él depende una de las características fundamentales en este tipo de vinos, su color. Aunque la fermentación alcohólica es el único proceso imprescindible en la elaboración del vino, durante la vinificación de vinos tintos se suceden posteriormente otros procesos como la fermentación maloláctica, que consiste en la transformación de ácido málico en ácido láctico por acción de bacterias lácticas (normalmente *Oenococcus oeni*, debido a su tolerancia a pH ácido y altas concentraciones de etanol) (Minnar et al., 2019), la crianza o envejecimiento en bodega o en depósito, la estabilización, la clarificación o el embotellado.

El objetivo de la vinificación es conseguir vinos de calidad y para ello, es necesario conocer la microbiota responsable del proceso, trazando una estrategia capaz de conseguir el resultado que se quiera obtener y realizar posteriormente un análisis químico (etanol, compuestos volátiles, ácidos) y sensorial (color, aroma, astringencia, amargura, estructura) para evaluar el producto obtenido.

## 2. Levaduras en el proceso de vinificación

Hasta mediados del siglo XIX se desconocía qué microorganismos estaban implicados en el proceso de vinificación, y en 1866 Louis Pasteur demostró que las levaduras presentes en la uva eran las responsables de la fermentación espontánea del mosto, influyendo en las características gustativas y produciendo además productos secundarios (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Desde hace más de 60 años numerosos estudios han realizado investigaciones para comprender la ecología, la bioquímica, la fisiología y la biología molecular de las levaduras implicadas en la producción de vino



y el impacto que tienen en la química y en sus propiedades sensoriales (Fleet et al., 2008).

Las levaduras están presentes de forma natural en la pruina del hollejo durante el desarrollo de la uva, variando su población en función de las condiciones climáticas, pero también de otros factores como el suelo, la variedad, la edad del viñedo, las técnicas de cultivo o la sanidad de la uva, entre otras (Padilla et al., 2016). Las levaduras son las responsables de la fermentación alcohólica, dado que son los microorganismos que mejor se adaptan a las condiciones del mosto, como su bajo pH y las elevadas concentraciones de azúcar, además de poseer una gran actividad enzimática capaz de influir en el proceso de vinificación y en su calidad.

Aunque la fermentación alcohólica es completada normalmente por levaduras del género *Saccharomyces*, en particular *Saccharomyces cerevisiae*, levaduras de otros géneros no-*Saccharomyces*, también intervienen en el proceso (Hranilovic et al., 2018), influyendo en la composición química y sensorial del vino gracias a la producción de metabolitos secundarios que son capaces de producir (Esteve-Zarzoso et al., 1998). Las levaduras no-*Saccharomyces* aportan su contribución mayoritariamente en las primeras etapas de la fermentación, pero normalmente no son capaces de completarla y su tiempo de permanencia en el mosto depende de diferentes factores como el género, la especie y la cepa, además de las condiciones de fermentación (composición química del mosto, la temperatura de fermentación, la concentración de sulfuroso) y las interacciones entre los distintos microorganismos presentes.

Según el momento en el que predominan en el proceso fermentativo, las levaduras vínicas se pueden clasificar en tres grandes grupos (Suárez-Lepe et al., 2015):

- De primera fase. Poseen bajo poder fermentativo y frecuentemente elevada producción de acidez volátil, en muchos casos son de morfología apiculada, tienen más capacidad de producir compuestos volátiles que el resto de levaduras vínicas, influyendo en las características organolépticas y la calidad del vino (ej. *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Metschnikowia*).
- Intermedias. Con gran pureza fermentativa y baja producción de acidez volátil, normalmente producen elevadas concentraciones de glicerina y no tienen capacidad de metabolizar de forma completa los azúcares del mosto (ej. *Torulaspota delbrueckii*).
- De elevado poder fermentativo. Normalmente predominan desde el primer tercio al final de la fermentación, algunas cepas poseen un elevado poder fermentativo y en general producen bajos contenidos de acidez volátil y son capaces de completar la fermentación (ej. *S. cerevisiae*, *S. bayanus*).

Aunque existen cientos de géneros de levaduras, solo algunos están relacionados con el proceso de vinificación, como: *Candida*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Metschnikowia*, *Torulaspota*, *Rhodotorula*, *Zygosaccharomyces*, *Hansenula*, *Schizosaccharomyces*, *Lachancea*, *Kluyveromyces*, *Starmerella*, *Zygotorula*, *Debaryomyces*, *Saccharomycodes*, *Saccharomyces*. El conocimiento de las levaduras responsables de la fermentación y su cinética de crecimiento es esencial para comprender el impacto de éstas en la calidad del vino (Fleet et al., 2003), por ello actualmente una técnica que permite un mayor control microbiológico y la mejora del perfil químico y sensorial del vino, es el uso de cepas de levaduras seleccionadas y caracterizadas durante la fermentación. El principal requisito en la elección de la levadura debe ser el de asegurar la fermentación total de los azúcares (más asociado con levaduras del género *Saccharomyces*), sin producción anómala de subproductos y con una aceptable y discreta cinética fermentativa (Suárez-Lepe et al., 2015), pero

existen otros criterios que también hay que tener en cuenta y se muestran en el siguiente gráfico:

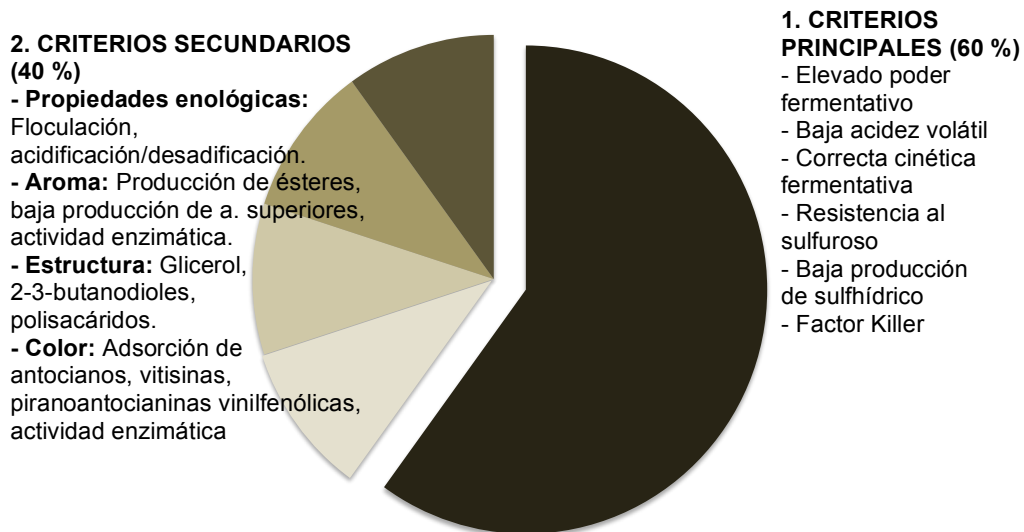


Gráfico 1. Criterios de selección de las levaduras vínicas (Adaptación de Suárez-Lepe et al., 2015)

Por lo tanto, la elección de géneros y especies de levadura para realizar la fermentación es clave, ya que influyen en el perfil químico y sensorial del vino, por ello, el uso de levaduras seleccionadas se ha convertido en una práctica común, ya que contribuye a la supresión de la microbiota nativa, permitiendo realizar un proceso más confiable, mejorando el perfil aromático debido a la formación de algunos compuestos como alcoholes superiores o ésteres y favoreciendo la formación de pigmentos más estables.

### 3. Fermentaciones mixtas: *Saccharomyces*/no-*Saccharomyces*

En las fermentaciones espontáneas se suceden de forma natural y secuencial diversas especies de levaduras indígenas (Jolly et al., 2014), no-*Saccharomyces* y *S. cerevisiae*, presentes en la uva y en el entorno enológico, por lo tanto múltiples especies de levadura contribuyen a la fermentación. Sin embargo, esta práctica carece de previsibilidad y es considerada de riesgo al no contar con una población microbiana identificada y controlada. Por ello, una práctica que está empezando a utilizarse en vinificación, como alternativa a las fermentaciones espontáneas, es la coinoculación de no-*Saccharomyces* y *S. cerevisiae* de una forma controlada, con el objetivo de mejorar el perfil aromático del vino (Kong et al., 2019; Padilla et al., 2016), así como mejorar la calidad y la seguridad del producto final (Capozzi et al., 2019). Por esta razón, el uso conjunto de inóculos de levaduras no-*Saccharomyces* y *S. cerevisiae*, permite llevar a cabo un proceso más controlado, que mejore la composición química y organoléptica para obtener un producto final más complejo.

Aunque las fermentaciones mixtas han demostrado aportar ventajas en la calidad del vino, hay que tener en cuenta la cepa de no-*Saccharomyces* utilizada en la fermentación, la estrategia fermentativa, el tamaño del inóculo y las interacciones entre las distintas levaduras y bacterias implicadas en el proceso. Además, el impacto de la no-*Saccharomyces* dependerá de su capacidad de producir biomasa y del tiempo que permanezca metabólicamente activa (Shekhawat et al., 2017; Escribano-Viana et al., 2018). Estos factores pueden tener implicaciones durante la fermentación, ya que las levaduras no-*Saccharomyces* pueden inhibir el crecimiento de *S. cerevisiae* por falta de nutrientes o por parte de *S. cerevisiae* producir metabolitos que limiten el crecimiento de las no-*Saccharomyces* (Varela et al., 2016), afectando el rendimiento de la fermentación.





Las fermentaciones mixtas implican la inoculación de levaduras no-*Saccharomyces* y *S. cerevisiae*, pudiéndose adicionar al mosto al mismo tiempo, lo cual sería una fermentación simultánea, o secuencial en el caso de que la adición sea primero de no-*Saccharomyces* y posteriormente de *S. cerevisiae*. Este tipo de fermentaciones han sido descritas como más lentas que las fermentaciones con monocultivo (Englezos et al., 2019).

Las fermentaciones simultáneas pueden presentar problemas si la levadura no-*Saccharomyces* tiene una cinética fermentativa lenta, pudiéndose desarrollar rápidamente *S. cerevisiae* e impidiendo el desarrollo de la no-*Saccharomyces* (Suárez-Lepe et al., 2015). Sin embargo, también se han reportado ventajas en fermentación simultánea frente a las fermentaciones únicas de *S. cerevisiae* por algunos autores (Comitini et al., 2011; Lencioni et al., 2016; Shekhawat et al., 2017; Varela et al., 2017; Capozzi et al., 2019; Belda et al., 2015) como se describe a continuación y se muestra en las tablas del Anexo. Así, el empleo de *Lachancea thermotolerans*, mostró una reducción del pH y por lo tanto una mejora de la acidez total, reducción de la acidez volátil y aumento del contenido de glicerol y polisacáridos, con *Metschnikowia pulcherrima* se comprobó una correlación positiva de ácidos grasos de cadena media, de 2-fenil-etanol, de acetato de isoamilo y de polisacáridos, *T. delbrueckii* mejoró también el contenido de polisacáridos y el perfil aromático del vino además de reducir la acidez volátil, con mayor proporción de inóculo de no-*Saccharomyces* que de *S. cerevisiae* (Comitini et al., 2011). Con aireación controlada *L. thermotolerans*, *M. pulcherrima* y *T. delbrueckii* produjeron menor concentración de etanol que *S. cerevisiae*, lo que sugiere que en los cultivos mixtos parte del azúcar se respira, además *T. delbrueckii* mantuvo niveles bajos de ácido acético en las mismas condiciones y se observó que *L. thermotolerans* y *T. delbrueckii* produjeron mayor concentración de alcoholes superiores (2-fenil-etanol, alcohol isoamílico e isobutanol), encontrando una correlación positiva entre la producción de estos alcoholes, el crecimiento de no-*Saccharomyces* y el nivel de oxígeno, esto puede deberse al aumento de biomasa en condiciones aerobias y a una mayor adsorción de aminoácidos de cadena ramificada (Shekhawat et al., 2017). Con variedad de uva Merlot, *M. pulcherrima* también obtuvo menor concentración de etanol y mayor concentración de glicerol, de alcoholes superiores, de ácido succínico y ésteres que *S. cerevisiae* en fermentación única (Varela et al., 2017). *Zygorhynchus florentina* formó menor concentración de etanol y ácido acético y mayor de glicerol que *S. cerevisiae* (Lencioni et al., 2016). Con algunas cepas de *Hanseniaspora uvarum* y *S. cerevisiae* en fermentación simultánea, junto con una bacteria (*O. oeni*), las concentraciones de etanol y ácido acético fueron menores que en fermentación única de *S. cerevisiae* (Capozzi et al., 2019). *T. delbrueckii* en fermentación simultánea obtuvo menor concentración de ácido málico y ácido láctico, pero sin embargo mayor contenido de acidez total que *T. delbrueckii* en fermentación única y secuencial (Belda et al., 2015).

A pesar de lo anterior, las fermentaciones secuenciales suelen ser una opción más adecuada de cara a imponer alguna característica metabólica de las no-*Saccharomyces* con influencia en la calidad (Azzolini et al., 2012; Contreras et al., 2014; Contreras et al., 2015; Hu et al., 2016; Maturano et al., 2019; Escott et al., 2018; Englezos et al., 2019; Escribano-Viana et al., 2018). *T. delbrueckii* en fermentación secuencial produjo menos etanol que en fermentación única y simultánea (Azzolini et al., 2012). *M. pulcherrima* produjo menor concentración de etanol y de ácido acético pero mayor de glicerol y ácido succínico (Contreras et al., 2014). En condiciones de aireación controlada, *T. delbrueckii* y *Zygosaccharomyces bailii* produjeron menor concentración de etanol y en el caso de *T. delbrueckii* mayor concentración de glicerol (Contreras et al., 2015). *H. uvarum* por su alta actividad  $\beta$ -glucosidasa, formó compuestos aromáticos C<sub>13</sub>-norisoprenoides y terpenos que aportaron aromas frescos



y florales (Hu et al., 2016), también *H. uvarum* produjo menos etanol y más glicerol que *S. cerevisiae* (Maturano et al., 2019). Por otro lado, *L. thermotolerans* obtuvo mayor concentración de compuestos estables relacionados con el color (Escott et al., 2019). *S. bacillaris* formó menos etanol y ácido acético y más glicerol (Englezos et al., 2019). Con uva Tempranillo, *T. delbrueckii* y *L. thermotolerans* frente a otras no-*Saccharomyces* (*M. pulcherrima*, *Z. bailii*, *Williopsis pratensis* y *C. zeylanoides*) tuvieron mayor permanencia en el depósito y por lo tanto una mayor influencia en las características del vino (Escribano-Viana et al., 2018).

Por todo ello, para realizar una estrategia eficiente en el uso de cultivos mixtos, es importante conocer los factores ambientales que modulan la dinámica de la población microbiana (Shekhawat et al., 2017), así como elegir la levadura que mejor se adapte a los objetivos.

#### 4. Influencia de no-*Saccharomyces* en la elaboración de vinos tintos

Las levaduras no-*Saccharomyces* son reconocidas por presentar bajos rendimientos de fermentación, en algunos casos un carácter fructífero, no siendo capaces de dominar ni completar la fermentación por su débil tolerancia al etanol, por ello su crecimiento suele limitarse a los primeros días de fermentación (Pinna et al., 2004; Fleet et al., 2008). También se ha observado que la causa de su crecimiento limitado se debe a la falta de nutrientes que suele consumirse rápidamente por *S. cerevisiae* (Wang et al., 2015). Por el contrario, suelen afectar de forma positiva la composición química del vino y su perfil sensorial, aportando perfiles volátiles más complejos, por su menor rendimiento de etanol y mayor concentración de glicerol, ácidos orgánicos, compuestos volátiles, polisacáridos y compuestos relacionados con el color. Se ha confirmado que la presencia de no-*Saccharomyces* con mayor relación de inóculo que *S. cerevisiae*, suele relacionarse con vinos más complejos (Fleet et al., 2003) y con un crecimiento menor o retrasado de *S. cerevisiae* (Comitini et al., 2011).

Otra de las características de las no-*Saccharomyces* es su alta capacidad de producir y secretar enzimas extracelulares con importancia enológica ( $\beta$ -glucosidasas, pectinasas, proteasas y xilanasas), pero ello depende de la cepa de levadura y de algunas condiciones de fermentación como el pH, la temperatura, la presencia de inhibidores como el azúcar o el etanol y las interacciones entre levaduras (Ciani et al., 2010; Maturano et al., 2012; López et al., 2015). Las enzimas que liberan las levaduras pueden transformar compuestos neutros de las uvas en compuestos aromáticos activos, mejorando los atributos sensoriales de los vinos (Maturano et al., 2012; Hu et al., 2016), además de mejorar algunos procesos durante la vinificación como la clarificación, la filtración o la estabilización (Pretorius et al., 2000). *H. uvarum*, *Pichia membranefaciens* y *Rhodotorula mucilaginosa* mostraron una alta actividad  $\beta$ -glucosidasa, siendo *H. uvarum* la que mostró mayor actividad (Hu et al., 2016). Maturano et al., 2012, estudió la actividad enzimática ( $\beta$ -glucosidasa, pectinasa, proteasa, amilasa y xilanasas) de *T. delbrueckii* y *Hanseniaspora vineae* en fermentación única y simultánea junto con *S. cerevisiae*, los resultados mostraron mayor actividad pectinasa y amilasa para *T. delbrueckii* en fermentación única, *H. vineae* mostró en fermentación única la mayor actividad xilanasas, mientras que para las actividades  $\beta$ -glucosidasa y proteasa la mayor actividad la obtuvo *S. cerevisiae*, seguido por la fermentación mixta de 1 % de *S. cerevisiae* y 99 % de *H. vineae* para ambas enzimas. En otros estudios, se han descrito a los géneros *Pichia*, *Hanseniaspora* y *Wickerhamomyces* como los mayores productores de enzimas glucolíticas (López et al., 2015), y anteriormente también se había definido a *H. uvarum* como una levadura con capacidad para secretar enzimas  $\beta$ -glucosidasa y proteasas al medio (Zott et al., 2008). *L. thermotolerans* ha sido relacionada con una mayor actividad enzimática, relacionada con una mayor producción de ésteres (Whitener et al., 2017).





También se ha estudiado la actividad antimicrobiana de algunas levaduras no-*Saccharomyces*, como *M. pulcherrima* frente a levaduras no deseadas como *Brettanomyces* o géneros de *Hanseniaspora* y *Pichia*, pero se confirmó que esta actividad no tuvo influencia sobre *S. cerevisiae*, *Hanseniaspora valbyensis* y *P. membranefaciens*. Esta actividad antimicrobiana está relacionada con la producción de una sal férrica de ácido pulcherrimínico (Oro et al., 2014).

Recientemente se ha demostrado que la limitación de oxígeno ejerce una fuerte presión selectiva durante la fermentación y que el crecimiento y persistencia de especies de no-*Saccharomyces* como *L. thermotolerans*, *T. delbrueckii* o *M. pulcherrima* son dependientes de la disponibilidad de oxígeno (Shekhawat et al., 2017; Canonico et al., 2019). Cada especie responde de forma diferente a la disponibilidad de oxígeno, habiéndose demostrado que *L. thermotolerans* requiere menor cantidad de oxígeno, seguido de *T. delbrueckii* y de *M. pulcherrima* (Shekhawat et al., 2017), esto se debe a que las dos primeras son anaerobias facultativas mientras que la última es aerobia. De hecho, estudios previos también demostraron que *M. pulcherrima* muestra un metabolismo de glucosa completamente respiratorio (Contreras et al., 2014; Quiros et al., 2014). Por lo tanto la adición de oxígeno disuelto puede tener una influencia positiva sobre algunas levaduras no-*Saccharomyces* afectando a la dinámica de población y a la producción de compuestos volátiles como ésteres y alcoholes superiores. Además, uno de los usos potenciales de algunas especies de levaduras no-*Saccharomyces* con aireación controlada de oxígeno permite producir vinos con una menor concentración de etanol (Contreras et al., 2015; Shekhawat et al., 2017).

Algunos investigadores como Comitini et al., 2011; Azzolini et al., 2012; Belda et al., 2015 y Binati et al., 2020 entre otros, han estudiado las levaduras no-*Saccharomyces* por sus propiedades fisiológicas y metabólicas únicas, que pueden ser ventajosas para la vinificación y prestando especial atención a algunos géneros como *Candida*, *Hanseniaspora*, *Rhodotorula*, *Hansenula*, *Metschnikowia*, *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, *Lachancea*, *Torulasporea*, *Schizosaccharomyces*, *Saccharomycodes*.

Es por ello que actualmente casas comerciales como Agrovin, Lallemand, Laffort, Erbsloeh y Hansen, están comercializando cepas de especies no-*Saccharomyces*, principalmente *T. delbrueckii* (Agrovin, Lallemand, Laffort, Erbsloeh, Hansen), *L. thermotolerans* (Lallemand, Hansen), *M. pulcherrima* (Lallemand, Laffort) y *Pichia kluyveri* (Hansen), con el objetivo de aumentar la fracción del aroma varietal de los vinos (Azzolini et al., 2012; Binati et al., 2020), controlar la acidez (Gobbi et al., 2013), mejorar la extracción de color y la sensación en boca (Belda et al., 2016; Domizio et al., 2014; Escott et al., 2018) o reducir el contenido de etanol en el vino (Canonico et al., 2019; Contreras et al., 2014; Contreras et al., 2015; Varela et al., 2017).

## 4.1. Alcoholes

Durante la fermentación del azúcar presente en el mosto, las levaduras forman cientos de metabolitos que afectan a la calidad del vino, siendo los alcoholes uno de los compuestos más importantes. Aunque el principal alcohol formado es el etanol o alcohol etílico, del cual depende la graduación alcohólica del vino, existen otros alcoholes como el glicerol, con influencia en las características organolépticas del vino, por lo que también es necesario conocer su concentración.

### 4.1.1. Etanol

El etanol o alcohol etílico, se forma durante la fermentación alcohólica y es el componente más abundante en el vino, debido a la presencia de azúcares fermentables en el mosto, como la glucosa y la fructosa, encontrándose ambos azúcares en proporciones similares. La glucosa suele consumirse en primer lugar dado el carácter glucófilo de *S. cerevisiae*, mientras que algunas no-*Saccharomyces*



han sido descritas por presentar un carácter más fructífero, por la presencia de transportadores específicos de la membrana plasmática más eficientes para la fructosa (Suárez-Lepe et al., 2015).

En las últimas décadas debido al cambio climático, se ha observado un incremento de alcohol en los vinos en un 2% v/v aproximadamente, y es por ello que se están estudiando distintas estrategias capaces de reducir su concentración, ya que las concentraciones elevadas de alcohol en el vino reducen la complejidad de las propiedades sensoriales, impactando de forma negativa en su sabor al aumentar la percepción de amargor, de astringencia y de calidez, que enmascaran algunos compuestos volátiles, algo que no gusta a los consumidores que demandan vinos con menores concentraciones de etanol. Las estrategias para disminuir el contenido de alcohol van desde prácticas en viticultura o prefermentativas, hasta el uso de levaduras no-*Saccharomyces*, ya que una de sus características es su potencial para producir menor concentración de alcohol, tanto en anaerobiosis como en condiciones de aireación controlada, por el desvío de la fermentación alcohólica hacia la formación de abundantes compuestos secundarios (Gobbi et al., 2014). Este hecho ha sido confirmado por algunos autores, que han indicado que las fermentaciones secuenciales con levaduras no-*Saccharomyces* en coinoculación con *S. cerevisiae* reducen la concentración de etanol (Pina et al., 2004; Quiros et al., 2014; Contreras et al., 2014, 2015; Varela et al., 2016; Canonico et al., 2019; Maturano et al. 2019). También se ha confirmado la influencia de *T. delbrueckii* en la menor producción de etanol permitiendo una mayor percepción de aromas varietales (Belda et al., 2015) o de *M. pulcherrima* que en fermentación secuencial obtuvo 1,0% menos de etanol que los vinos producidos por *S. cerevisiae* (Varela et al., 2017). Otra estrategia unida al uso de levaduras no-*Saccharomyces* con el mismo objetivo, es la dosificación de oxígeno disuelto en el mosto durante la fermentación de forma controlada, práctica que ha resultado disminuir la concentración de etanol en fermentaciones secuenciales con *L. thermotolerans*, *T. delbrueckii* y *M. pulcherrima* (Shekhawat et al., 2017).

#### 4.1.2. Glicerol

Otro de los componentes principales del vino junto con el agua y el etanol, que se forma durante la fermentación es el glicerol, su concentración oscila entre los 5 y 20 g/l, siendo el segundo compuesto de origen fermentativo con mayor concentración en el vino. Este componente tiene gran influencia en las características organolépticas ya que aporta dulzor, cuerpo y densidad en boca.

Durante las primeras etapas de la fermentación del mosto, las levaduras son las responsables de la formación de glicerina por fermentación gliceropirúvica, sometiéndose a esta fermentación aproximadamente el 8 % de las moléculas de azúcar, mientras que el 92 % restante son transformadas por fermentación alcohólica. Su concentración está relacionada también con condiciones de fermentación como, el nivel de sulfuroso en el mosto, formándose mayor concentración de glicerol con mayores dosis de sulfuroso y la temperatura de fermentación, formándose mayores concentraciones con temperaturas más altas de fermentación. Su concentración además está influenciada por el género y especie de levadura responsable del proceso. Algunos autores han afirmado que las levaduras no-*Saccharomyces* forman mayor concentración de glicerol que las levaduras del género *Saccharomyces*, y en mayor proporción en fermentaciones mixtas que en monocultivo, como se muestra en el Anexo 2 (Comitini et al., 2011; Contreras et al., 2014; Contreras et al., 2015; Lencioni et al., 2016; Shekhawat et al., 2017; Varela et al., 2017; Maturano et al., 2019; Englezos et al., 2019; Binati et al., 2020). También algunas levaduras no-*Saccharomyces* menos convencionales como *Kazachstania aerobia* y *Kazachstania servazzii* en fermentación mixta produjeron un aumento de 2 g/l de glicerol en comparación a las fermentaciones únicas (Man-Hsi et al., 2020).



En fermentaciones de monocultivo, algunas levaduras no-*Saccharomyces* como *H. vineae* (Maturano et al., 2012), *T. delbrueckii* (Minnaar et al., 2014), *Zygoascus hellenicus* (Teixeira et al., 2015), *Z. bailii* (Escribano et al., 2018), *M. pulcherrima* (Hranilovic et al., 2018) y *Schizosaccharomyces pombe* (Benito et al., 2014), han confirmado tener una vía gliceropirúvica más desarrollada al producir más glicerol que *S. cerevisiae* (Anexo 2).

### 4.1.3. Alcoholes superiores

Los alcoholes superiores son componentes del vino que no proceden directamente del proceso fermentativo, si no que pueden formarse por la desaminación de aminoácidos mediante la reacción de Ehrlich (Ribéreau-Gayon et al. 2006). Su formación depende de la variedad de uva, la composición del mosto, el grado de oxigenación, las condiciones de fermentación (especialmente la temperatura), la cepa de levadura y la dosis de inóculo (Suárez-Lepe et al., 2015) y su concentración oscila en el vino entre los 130 y 520 mg/l. Los alcoholes superiores son compuestos que juegan un papel relevante en el aroma del vino pero depende de la concentración y el tipo de alcohol (Pretorius et al., 2000), resultando organolépticamente favorable y contribuyendo a su complejidad en concentraciones no muy elevadas (300 mg/l), aportando aromas frutales y vegetales, sin embargo, en concentraciones elevadas (400 mg/l), resultan negativos a nivel organoléptico. Por lo tanto para resaltar los aromas varietales y mejorar la complejidad de los vinos tintos es importante la selección y empleo de cepas de levaduras con producciones de alcoholes superiores moderadas, es decir, que no superen los 350 mg/l. Algunos de los alcoholes superiores presentes en el vino son, el alcohol amílico, el tirosol, el feniletanol y el alcohol isoamílico (3-metil-1-butanol) que suele ser el mayoritario en concentraciones entre 90 y 300 mg/l (Suárez-Lepe et al. 2015).

Normalmente las levaduras no-*Saccharomyces* producen menores concentraciones de alcoholes superiores que *S. cerevisiae* (Jolly et al., 2014), pero existe una gran variabilidad entre cepas (Belda et al., 2015). En algunas investigaciones tanto en fermentaciones únicas como mixtas, levaduras no-*Saccharomyces* han confirmado producir concentraciones de alcoholes superiores mayores que *S. cerevisiae* como se muestra en el Anexo 3. En los estudios revisados, *M. pulcherrima* ha resultado ser una levadura muy productora de alcoholes superiores en comparación con otras no-*Saccharomyces* y con *S. cerevisiae*, incluso en algunas ocasiones en valores superiores a los 350 mg/l (Escott et al., 2018). *Hansenula anomala* también ha sido identificada como una especie muy productora de alcoholes superiores en condiciones aerobias (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

## 4.2. Ácidos

En el vino, existen ácidos que pueden tener su origen en la uva (orgánicos) como el málico, el tartárico o el cítrico o formarse durante el proceso de fermentación como el succínico, el láctico, el pirúvico o el acético. Los más abundantes en el vino son el tartárico y el málico, suponiendo el 90 % de la totalidad de los ácidos de la uva. Todos ellos contribuyen a la acidez total del vino y por lo tanto, su concentración tiene influencia en la calidad del vino y por ello debe estar equilibrada con el resto de los componentes.

### 4.2.1. Tartárico, málico, láctico, succínico, cítrico y pirúvico

El calentamiento global, debido al aumento de las temperaturas medias en los últimos años, está provocando una disminución de la acidez de la uva y por lo tanto del mosto, ya que las altas temperaturas disminuyen la concentración de los ácidos, por lo que el uso de levaduras que incrementen la acidez puede resultar una estrategia interesante en la actualidad para obtener vinos más equilibrados. El uso de algunas levaduras no-*Saccharomyces* se ha asociado con una mayor producción de algunos ácidos, lo que



favorecería el incremento de la acidez total. Así, por ejemplo, *M. pulcherrima* ha sido capaz de producir mayores niveles de acidez total en fermentación mixta, en comparación a otras no-*Saccharomyces* o a *S. cerevisiae* (Comitini et al., 2011; Chen et al., 2018; Varela et al., 2017).

Algunas levaduras no-*Saccharomyces* tienen como característica específica la degradación de ácido málico a través de la fermentación maloalcohólica, por lo tanto podrían utilizarse para la desacidificación de mostos (Suárez-Lepe et al., 2015). Puede resultar interesante su uso en climas fríos, habiendo demostrado esta característica *Schizosaccharomyces pombe* (Ciani et al., 2010).

Uno de los ácidos presentes en el vino que se forma durante la fermentación alcohólica es el succínico. Es un compuesto no volátil, que se encuentra en el vino en concentraciones entre los 0,5 y 1,5 g/l (Suárez-Lepe et al., 2015), pero pudiendo ser superior en algunos casos. Su concentración contribuye también a la acidez total del vino, por lo que tiene influencia en el perfil analítico y en el sensorial, aportando un “sabor vinoso” amargo y salado que contribuye a su complejidad en concentraciones moderadas, mientras que en concentraciones excesivas puede resultar negativo para la calidad del vino. Su mayor producción se relaciona con una actividad acetaldéhidó deshidrogenasa menor de la levadura y también con una mayor concentración de glicerol, ácido málico (Suárez-Lepe et al., 2015) y etanol (Jolly et al., 2014). Algunas levaduras no-*Saccharomyces* pueden formar más ácido succínico que *S. cerevisiae* según han demostrado algunos autores. Ciani et al., 2010 y Belda et al., 2015 confirmaron mayor producción de ácido succínico por parte de *T. delbrueckii*, y posteriormente también lo confirmó Contreras et al., 2015, que en su estudio la concentración de este ácido producido por *T. delbrueckii* fue de 3,6 g/l frente a los 1,3 g/l que obtuvo *S. cerevisiae*. Otras no-*Saccharomyces* como *H. uvarum*, *Z. bailii* o *M. pulcherrima* también han demostrado producir más ácido succínico que *S. cerevisiae*, por lo que el uso de levaduras no-*Saccharomyces* con mayor producción de este ácido podría resultar interesante para aumentar la acidez total en vinos con acidez insuficiente (Escribano et al., 2018).

Otro ácido orgánico es el cítrico, que está presente en el mosto en bajas concentraciones (0-0,5 g/l) y suele desaparecer durante la fermentación debido a la acción de las bacterias, por ello no se tratará posteriormente. Sin embargo el ácido pirúvico se forma durante la fermentación pero se encuentra en concentraciones bajas o inexistentes en el vino y a partir de él se forma ácido láctico (Ribéreau-Gayon et al., 2006) y piranoantocianos al reaccionar con los antocianos, formando pigmentos de color como la vitisina A.

#### 4.2.2. Acético

El ácido acético se forma durante la fermentación alcohólica por una ruta secundaria, la vía gliceropirúvica. Aunque su concentración depende del metabolismo de la levadura, suele estar presente en el vino en cantidades entre 0,1 y 1,1 g/l, considerándose desagradable en valores entre 0,7 y 1,1 g/l (Pretorius et al., 2000), ya que aporta sabores agrios y amargos que perjudican la calidad del vino, por lo que un criterio importante en la elección de la levadura es que sus producciones de ácido acético sean bajas, entre 0,3 o 0,4 g/l ya que ello contribuye a la complejidad del vino (Suárez-Lepe et al., 2015).

Aunque tradicionalmente se ha considerado a las levaduras no-*Saccharomyces* como altas productoras de acidez volátil, en la actualidad gracias a algunos estudios se ha demostrado que no en todos los casos estas levaduras producen mayor concentración de ácido acético que *S. cerevisiae*, incluso en condiciones de aerobiosis y en fermentaciones únicas (Maturano et al., 2012; Ruiz et al., 2019; Shekhawat et al., 2017; Englezos et al., 2019; Hranilovic et al., 2018; Chen et al., 2018; Whitener et al.,





2017; Lencioni et al., 2016). En fermentaciones mixtas anaerobias de *M. pulcherrima* con *S. cerevisiae*, la concentración final de ácido acético resultó menor que en fermentación única de *S. cerevisiae*, sin embargo esa misma mezcla en fermentación mixta y aireación controlada produjo cantidades excesivas de ácido acético, llegando incluso a las 2,06 g/l con 5 % de oxígeno disuelto (Shekhawat et al. 2017). Sin embargo, Canonico et al., 2019 no obtuvo mayores concentraciones de ácido acético en vinos fermentados secuencialmente con *M. pulcherrima* y *S. cerevisiae*. Estos resultados indican que la composición del medio puede ser clave a la hora de modular su formación, no dependiendo únicamente de la cepa de levadura utilizada. En fermentaciones secuenciales anaerobias de no-*Saccharomyces* y *S. cerevisiae* también se ha confirmado una menor concentración de ácido acético respecto a las fermentaciones únicas con *S. cerevisiae* (Comitini et al., 2011; Man-Hsi et al., 2020; Shi et al. 2019; Varela et al. 2017; Chen et al., 2018; Contreras et al., 2014; Escribano et al., 2018; Jolly et al., 2014), y en varios de ellos utilizando *T. delbrueckii* y *M. pulcherrima*.

### 4.3. Ésteres

Los ésteres son compuestos que se forman en el vino por la combinación de ácidos y alcoholes y pueden formarse por la acción de microorganismos como las levaduras o las bacterias (esterificación biológica) o durante la conservación o envejecimiento (esterificación química). Las levaduras los forman debido a su actividad esterasa, pudiendo ser volátiles o no volátiles. Desde el punto de vista enológico, los ésteres volátiles son los más representativos debido a que aportan aromas primarios (Hidalgo et al., 2011). Los ésteres son sustancias menos estables que otros compuestos aromáticos, y su mayor intensidad se percibe al final de la fermentación alcohólica, pero durante las fases de elaboración posteriores se van degradando.

Su formación está influenciada por factores como la capacidad esterásica de la levadura, el momento de vendimia (Hranilovic et al., 2018) o algunas condiciones de fermentación, como la presión, el nitrógeno fácilmente asimilable, el pH, la concentración de lípidos, el oxígeno disuelto (Whitener et al., 2017) o la temperatura, viéndose favorecida la formación de ésteres de etilo e isoamilo a bajas temperaturas. La formación de ésteres también depende de la cepa de levadura utilizada en la fermentación y algunas no-*Saccharomyces* como *Pichia anomala*, *Kloeckera apiculata*, *H. uvarum*, *T. delbrueckii*, *Candida spp*, *L. thermotolerans*, *Saccharomycodes ludwiggi* y *M. pulcherrima* acentúan su formación. *S. ludwiggi* ha sido descrita como productora de altas concentraciones de acetato de etilo (Suárez-Lepe et al. 2015).

En el vino se han identificado más de 160 ésteres, aunque muchos de ellos están por debajo del umbral de percepción y frecuentemente en cantidades traza (<100 mg/l). Algunos de los ésteres presentes en el vino son, el acetato de etilo, con olores que recuerdan a laca de uñas o pegamento, el acetato de isoamilo, que recuerda al plátano, el propanoato de etilo, con aroma a manzana, el acetato de feniletilo con notas a rosa o el lactato de etilo, que aporta notas a café, fresa y frambuesa. El acetato de etilo es uno de los principales ésteres producidos durante la fermentación, formándose a partir del ácido acético y con un umbral de detección entre los 150-200 mg/l. La percepción sensorial del acetato de etilo es negativa, recordando a aromas a pegamento y a barniz a altas concentraciones mientras que a bajas concentraciones contribuye a la complejidad del vino, aportando aromas afrutados y balsámicos (Suárez-Lepe et al., 2015).

En algunos estudios se han confirmado las altas concentraciones de ésteres producidas por algunas no-*Saccharomyces*. Hranilovic et al, 2018 confirmó mayor concentración de ésteres totales de acetato (acetato de etilo y acetato de isoamilo) en uvas vendimiadas de forma tardía, en el caso de acetato de etilo la mayor concentración se observó en *L. thermotolerans*, sin embargo la mayor concentración



de acetato de isoamilo la obtuvieron los vinos fermentados con *M. pulcherrima* y *T. delbrueckii*. Algunas especies de levaduras como *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia* y *Metschnikowia* se han identificado también como productoras de ésteres. Escott et al., 2018 confirmó que en fermentación secuencial, *M. pulcherrima* destacó por su mayor producción de ésteres. *M. pulcherrima* también mostró mayores concentraciones de acetato de etilo en vinos producidos con variedad Merlot, en el estudio de Varela et al., 2017 y en fermentación simultánea y aerobiosis en el estudio de Shekhawat et al., 2017, lo que hace creer que esta levadura utiliza la producción de acetato de etilo como mecanismo de desintoxicación para eliminar el etanol y el acetato de las células (Shekhawat et al., 2017).

#### 4.4. Polisacáridos

Las levaduras son la segunda fuente de polisacáridos en el vino, ya que su pared celular, formada por polisacáridos (85 %) y proteínas (15%), constituye el 30 % del peso seco de la célula (Suárez-Lepe et al. 2015). Los polisacáridos son liberados al medio durante la autólisis celular, que comienza después de la muerte de la célula y se ve favorecida por enzimas de la propia levadura, que producen la degradación de la pared celular, suponiendo además un aporte de nutrientes.

Los polisacáridos son compuestos solubles en alcohol, que influyen de forma positiva en la estructura, la densidad y el cuerpo de los vinos ya que aumentan la sensación de viscosidad y plenitud en boca, aportan complejidad y persistencia aromática y disminuyen la astringencia, debido a la combinación de los polisacáridos con taninos y antocianinas (Fleet et al., 2003). La cantidad de polisacáridos liberados, depende de la cepa de levadura utilizada y la temperatura de fermentación, viéndose favorecida su liberación a mayores temperaturas de fermentación (Suárez-Lepe et al., 2015). Estos compuestos tienen propiedades enológicas positivas, además de su influencia en las características organolépticas, como su importante efecto estabilizador y en la cristalización de tartratos (Ribéreau-Gayon et al., 2006) o su capacidad de adsorber compuestos tóxicos como la ocratoxina A (Domizio et al., 2014).

A pesar de que la liberación de polisacáridos depende del género, especie y cepa de levadura por su diferente composición celular, algunos autores han confirmado que el uso de algunas levaduras no-*Saccharomyces* durante la fermentación como *L. thermotolerans*, *M. pulcherrima*, *Schizosaccharomyces spp.*, *Pichia fermentans*, *T. delbrueckii*, *S. ludwigii* o *Zygosaccharomyces florentinus* tienen mayor capacidad de liberar polisacáridos totales en el vino que *S. cerevisiae* (Domizio et al., 2014), debido a su diferente estructura de la pared celular y pudiendo superar en algunos casos los 200 mg/l. *T. delbrueckii* mostró los mayores niveles de polisacáridos en el estudio de Belda et al., 2015, también en los estudios de Comitini et al., 2011 y Azzolini et al. 2012, las fermentaciones mixtas con *T. delbrueckii* obtuvieron un mejor contenido de polisacáridos y es acorde con la afirmación anterior de Domizio et al., 2014 que definía a *T. delbrueckii* como la levadura del vino con mayor contenido de polisacáridos en la pared.

#### 4.5. Compuestos responsables del color

El color es considerado uno de los atributos sensoriales más importantes en los vinos tintos, ya que generalmente supone la primera impresión visual junto con la limpidez, relacionada con la estabilidad del color y por lo tanto con su composición fenólica, además de darnos información sobre algunas de sus características relacionadas con la variedad, la elaboración o el envejecimiento. Son numerosos los compuestos químicos que influyen en el color, pudiendo proceder de la uva (compuestos fenólicos) o formarse durante la vinificación. Los compuestos fenólicos se localizan en el hollejo y las pepitas de las uvas y su formación está influenciada por las condiciones climatológicas, la variedad y el grado de maduración de la uva, estas moléculas son





las responsables del color del vino tinto, y tienen influencia sobre otras propiedades sensoriales como la astringencia, el cuerpo, el amargor, la complejidad y la estructura. Los compuestos fenólicos se clasifican en no-flavonoides (ácidos fenólicos) y flavonoides (flavanoles, antocianos y flavonoles), siendo los mayoritarios en el vino tinto los antocianos, así por lo tanto, son los pigmentos que más influyen en el color.

Como consecuencia de la condensación de las antocianinas de la uva y de metabolitos fermentativos como el acetaldehído o el piruvato, durante la fermentación se forman otros pigmentos más estables y minoritarios que los naturales de la uva, las vitisinas (piranoantocianos) que pueden ser A o B en función del compuesto a partir del que se formen (Suárez-Lepe et al., 2015). La formación de estos metabolitos está relacionada con algunos factores como la diversidad de cepas, los factores competitivos que influyen en las tasas de crecimiento y transporte de nutrientes, la presencia de sustancias inhibitoras del crecimiento como el etanol o los ácidos, las condiciones redox, la comunicación célula-célula (Medina et al., 2016), y su formación se ve favorecida por bajas dosis de sulfuroso y bajas temperaturas (20°C) de fermentación (Suárez-Lepe et al., 2015).

La concentración de polifenoles totales en los vinos tintos, oscila entre los 1.500-5.000 mg/l pero depende de factores como la madurez fenólica de la uva, las condiciones de vinificación (temperatura, alcohol y concentración de sulfuroso) o las técnicas realizadas a lo largo de todo el proceso (maceración, envejecimiento). Las levaduras influyen en la concentración de compuestos fenólicos, debido a las reacciones metabólicas o enzimáticas que se suceden durante la fermentación alcohólica (Ribéreau-Gayon et al. 2006). Es importante conocer los géneros y especies responsables del proceso ya que existen interacciones levadura-antociano claves en este atributo que podrían afectar a la concentración de antocianinas. Esto puede deberse a algunos procesos como la adsorción de antocianinas en la pared celular, la reacción de las antocianinas con metabolitos secundarios que liberan las levaduras como el ácido pirúvico o el acetaldehído para producir piranoantocianos, o la hidrólisis de las antocianinas. Además, la composición química y la arquitectura molecular de la pared de la levadura influyen en los polisacáridos liberados de la pared, que forman un complejo con los taninos y antocianos que pueden incrementar la estabilidad del color y como consecuencia disminuir la astringencia del vino (Suárez-Lepe et al., 2015). Otras acciones realizadas a lo largo del proceso de vinificación como la maceración o la conservación y envejecimiento característico en la elaboración de vino tinto, influyen en la degradación o formación de pigmentos responsables del color, habiéndose demostrado que durante el envejecimiento, los niveles de antocianinas disminuyen, pero de forma menor en barrica que en otros sistemas alternativos (duelas o astillas) (Del Álamo et al., 2004).

Se ha confirmado que algunas levaduras de distintos géneros no-*Saccharomyces* pueden jugar un papel importante en la concentración de compuestos responsables del color del vino tinto. *S. pombe* aumenta el nivel de piranoantocianina vinilfenólica, lo que implica una mayor estabilidad de color (Chen et al., 2018), también debido a su alta formación de ácido pirúvico formó más vitisina A que *S. cerevisiae* y que *S. uvarum* (Morata et al., 2012). *T. delbrueckii* formó concentraciones más altas de antocianinas y flavanoles en comparación con *S. cerevisiae*, en vinos de variedad Pinotage y Cabernet Franc, sin embargo, *S. cerevisiae* obtuvo mayor concentración de antocianinas totales que *T. delbrueckii* en los vinos de Pinotage, mientras que en los vinos de Cabernet Franc la concentración más alta de antocianinas totales la obtuvo *T. delbrueckii* (Minnar et al., 2014). Estos datos nos confirman que el género y la especie de levadura utilizada durante la fermentación, influye en la concentración de compuestos fenólicos, incluso dentro de una misma variedad de uva.



## OBJETIVOS

El presente trabajo se realiza con el objetivo principal de identificar a través de una revisión bibliográfica, el impacto que tiene en la calidad de los vinos tintos, el uso de levaduras no-*Saccharomyces* durante el proceso de vinificación. Debido a que los consumidores demandan cada vez vinos más complejos, singulares y con mayor calidad, en la actualidad el uso de levaduras no-*Saccharomyces* es una herramienta para la mejora de la composición química y sensorial. También se han planteado algunos objetivos específicos sobre las levaduras no-*Saccharomyces*:

- Determinar qué levaduras favorecen una menor producción de etanol, tanto en fermentación única, si son capaces de completarla, como en fermentación mixta junto con *S. cerevisiae*, realizando una comparativa con los resultados obtenidos por *S. cerevisiae* en fermentación única.
- Conocer las condiciones de fermentación y las especies de levaduras no-*Saccharomyces* que presentan mayor tolerancia al etanol.
- Identificar los géneros y especies de levaduras y combinaciones de las mismas, con producciones moderadas de ácido acético, con influencia positiva en las características organolépticas del vino, así como identificar también los géneros y especies que favorecen la producción de otros ácidos responsables de la acidez total necesarios para mejorar las características del producto final.
- Analizar qué levaduras no-*Saccharomyces* producen mayor concentración de glicerol o metabolitos secundarios con influencia positiva sobre las principales características sensoriales como el color, el aroma, la estructura y el cuerpo del vino.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para llevar a cabo el presente estudio, se ha realizado una revisión de artículos científicos, relacionados con el uso e influencia de las levaduras no-*Saccharomyces* en la elaboración de vinos tintos, para poder conocer así su influencia en la composición final del vino y realizar un manejo adecuado de las mismas para mejorar su calidad.

Los artículos científicos seleccionados, han sido consultados en bases de datos como Scopus y Science Direct, teniendo como criterios de selección, que en el título o en el abstract tuvieran las palabras no-*Saccharomyces* y vino tinto mayoritariamente, aunque se ha seleccionado algún artículo de vino blanco debido a su importancia. También se han tenido en cuenta conceptos como reducción de etanol, actividad enzimática, compuestos volátiles, color, aroma, propiedades sensoriales y fermentación mixta y secuencial. Otro de los criterios de búsqueda ha sido el año de publicación, procurando que la mayoría de ellos fueran lo más actuales posible, con el fin de conseguir un estudio con datos recientes y actualizados.

Como existen multitud de estudios científicos abordando este tema, primero se realizó una primera búsqueda de artículos más amplia, de los que se hizo una lectura inicial, descartando algunos de ellos por considerarlos menos relevantes en base a los objetivos de este trabajo. Finalmente se han seleccionado un total de 57 artículos ya que son los representativos para la realización de este trabajo, de acuerdo con los objetivos marcados. Posteriormente se ha realizado una comparativa de los resultados obtenidos por cada uno de ellos. Como apoyo para la realización del trabajo, también se han utilizado algunos libros de Microbiología enológica de autores como Ribéreau-Gayon y Suárez-Lepe.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Contribución de las levaduras no-*Saccharomyces* en la elaboración de vinos tintos

Tras realizar una búsqueda bibliográfica sobre cómo influyen las levaduras no-*Saccharomyces* en la calidad de los vinos tintos, se ha podido comprobar que gracias a los estudios que se están realizando actualmente, son muy amplias las posibilidades que existen acerca del uso de estas levaduras para mejorar la calidad de los vinos tintos. Entre ellas, destacan la disminución de la concentración de etanol, una mayor producción de glicerol y de metabolitos secundarios, la producción de concentraciones moderadas de ácido acético, la formación de ácidos que permiten aumentar la acidez total, la degradación de ácido málico o una mayor formación de compuestos con impacto en las características organolépticas como el color o el aroma.

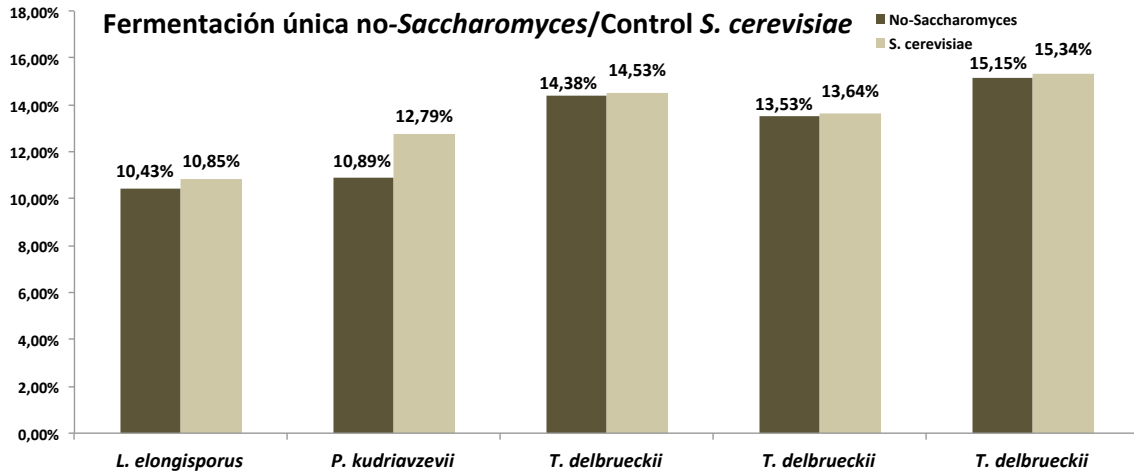
#### 1.1. Tolerancia, producción de etanol y rendimiento alcohólico

Generalmente las levaduras no-*Saccharomyces* solo están presentes en las primeras etapas de la fermentación, tienen baja tolerancia al etanol y no son capaces de completar la fermentación alcohólica. Esto está relacionado con el mayor consumo de azúcar en las primeras etapas de fermentación, por lo tanto, en las últimas etapas la disponibilidad de nitrógeno es menor y la concentración de etanol es mayor, convirtiendo el medio en tóxico para la célula, por lo que la actividad metabólica y fermentativa de la levadura se ve reducida (Suárez-Lepe et al., 2015). Algunas levaduras no-*Saccharomyces* como *Candida stellata*, *Candida zemplinina*, *H. uvarum*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Zygosaccharomyces bisporus* y *Z. bailli* (Magyar et al., 2011; Teixeira et al., 2015; Whitener et al., 2017; Escribano et al., 2018; Englezos et al., 2019) han sido descritas como fructófilas, además de poseer una baja tolerancia al etanol.

Los esteroides y los ácidos grasos influyen en la tolerancia al etanol (Pina et al., 2004), ya que son factores de supervivencia necesarios para la levadura. Por ello, la especie de levadura utilizada, así como las condiciones del cultivo, deben conocerse porque la tolerancia al etanol puede variar incluso entre especies de un mismo género de levaduras.

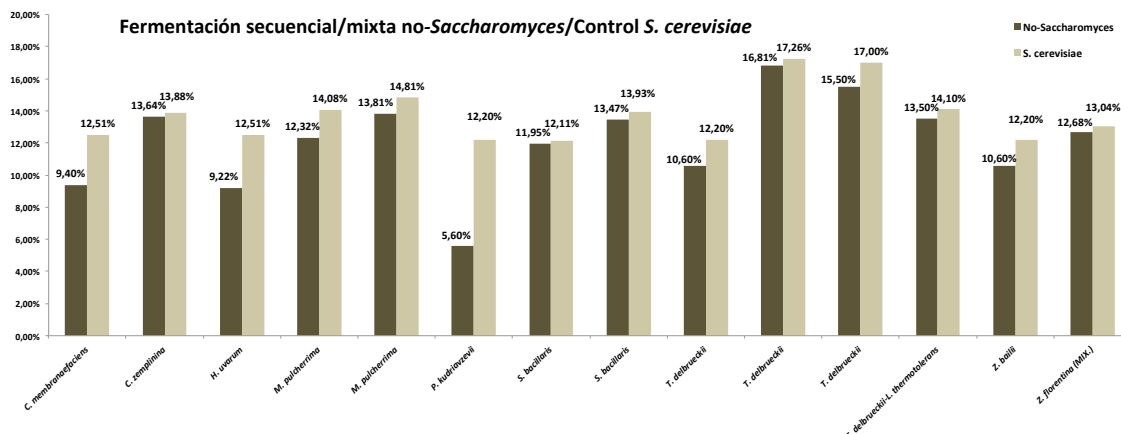
El oxígeno en el medio de crecimiento también podría aumentar la tolerancia al etanol de algunos géneros ya que favorece el crecimiento de la levadura, su viabilidad y su actividad fermentativa, pero sin embargo también se ha demostrado, que algunas levaduras como *C. stellata* son tolerantes al etanol en condiciones de anaerobiosis, aerobiosis y semiaerobiosis, por lo que esta cepa no está influenciada por las condiciones de cultivo (Fleet et al., 2003; Pina et al., 2004). Las fermentaciones a temperaturas bajas (10-15°C), también aumentan la tolerancia al etanol y a las altas concentraciones de azúcar de ciertas no-*Saccharomyces*, lo que podría permitirles permanecer mayor tiempo en el proceso (Zott et al., 2008).

Algunas de las levaduras no-*Saccharomyces* que han confirmado tener una alta tolerancia al etanol son *H. uvarum* (Wang et al., 2015), *Lodderomyces elongisporus* (Ruiz et al., 2019), *H. guilliermondii*, *C. stellata* (Pina et al., 2004), *S. pombe*, *S. baillii*, *Z. fermentati* (Fleet et al., 2003), *W. anomalus* (Man-Hsi et al., 2020). Sin embargo, actualmente como consecuencia de los estudios realizados, ya se han reconocido algunas no-*Saccharomyces* con capacidad para completar la fermentación alcohólica además de producir menores concentraciones de etanol que *S. cerevisiae*, tanto en fermentación única como mixta, sin obtener en algunos casos elevadas concentraciones de ácido acético.



**Gráfico 2.** Comparativa del grado alcohólico en fermentaciones únicas de no-*Saccharomyces* y *S. cerevisiae*. (Fuente propia, con datos obtenidos de los estudios de Ruiz et al., 2019; Teixeira et al., 2015; Belda et al., 2015; Minnaar et al., 2014).

Tal y como se observa en el gráfico 2, algunas levaduras no-*Saccharomyces* en fermentación única produjeron menores concentraciones de etanol que *S. cerevisiae*. *L. elongisporus* produjo 0,42 % v/v menos de etanol que *S. cerevisiae*, además fue capaz de completar la fermentación en 19 días, con unos azúcares residuales de 1,63 g/l y una producción de ácido acético no superior a los 0,40 g/l (Ruiz et al., 2019). *P. kudriavzevii* en el estudio de Teixeira et al., 2015, también obtuvo menos concentración de etanol en fermentación única que *S. cerevisiae*, obteniendo la mayor diferencia de las no-*Saccharomyces* representadas en el gráfico 2, con 1,90 % v/v menos, sin embargo, los azúcares residuales fueron de 35,53 g/l, correspondiendo el 94 % a fructosa, mostrando un carácter más glucófilo que el resto de las no-*Saccharomyces*, además la concentración de acidez volátil fue elevada (1,09 g/l). *T. delbrueckii* también obtuvo una concentración de etanol inferior a *S. cerevisiae*, en los estudios de Belda et al., 2015 y Minnaar et al., 2014. En el estudio de Belda et al., 2015 en el que se fermentó uva Tempranillo con *T. delbrueckii* en fermentación única, se completó la fermentación con unos azúcares residuales de 2,49 g/l y una concentración de ácido acético de 0,37 g/l, en el caso del estudio de Minnaar et al., 2014 se muestran 2 comparativas con *S. cerevisiae*, el primero, con mosto de la variedad Pinotage y la segunda con Cabernet Franc, se obtuvieron unas concentraciones de azúcares residuales de 1,61 y 3,32 g/l respectivamente, siendo en ambos casos mayor la concentración de fructosa que de glucosa y en ambos casos con unas concentraciones de ácido acético inferiores a 0,49 g/l.



**Gráfico 3.** Comparativa del grado alcohólico en fermentaciones secuenciales y mixta con no-*Saccharomyces* y *S. cerevisiae*. (MIX: fermentación mixta). (Fuente propia, con datos obtenidos de los estudios de Maturano et al., 2019;



Comitini et al., 2011; Contreras et al., 2014; Varela et al., 2017; Contreras et al., 2015; Binati et al., 2020; Englezos et al., 2019; Azzolini et al., 2012; Hranilovic et al., 2018; Lencioni et al., 2016).

En fermentación mixta, también se ha confirmado menor concentración de etanol por parte de algunas levaduras no-*Saccharomyces*, tal y como se muestra en el gráfico 3. En el estudio de Maturano et al., 2019, *Candida membranaefaciens* y *H. uvarum* fueron las levaduras no-*Saccharomyces* con más diferencia respecto a *S. cerevisiae*. En el caso de *C. membranaefaciens*, la producción de etanol antes de la inoculación de *S. cerevisiae* fue menor que con *H. uvarum*, 0,5 % y 1,89 % respectivamente, y en ambos casos el ácido acético fue menor a 0,70 g/l y completaron la fermentación en 9 días. En el caso de *M. pulcherrima* también obtuvo menor concentración de etanol que *S. cerevisiae* en los estudios de Contreras et al., 2014 y Varela et al., 2017, siendo mayor la diferencia en el primero de ellos con 1,76 % v/v en la variedad Shiraz, con unos azúcares residuales de 1 g/l y una concentración de ácido acético muy baja. Sin embargo, en el estudio de Whitener et al., 2017, *M. pulcherrima* en fermentación secuencial produjo la misma concentración de etanol que *S. cerevisiae*. *P. kudriavzevii* fue la no-*Saccharomyces* con la mayor diferencia respecto a *S. cerevisiae*, con un tratamiento de aireación de 10 ml/min hasta el 50 % del consumo de azúcar, sin embargo, el consumo de azúcar fue el más bajo de todos los tratamientos con 73,6 %, el resto de las no-*Saccharomyces* (*T. delbrueckii*, *Z. bailii*) fermentadas en este estudio (Contreras et al., 2015) y con el mismo tratamiento de aireación obtuvieron 10,6 % v/v, también menor que *S. cerevisiae* y con un consumo de azúcar superior al 97 % y una acidez volátil no superior a 0,5 g/l en todos los casos. En el estudio de Englezos et al., 2019 se realizaron fermentaciones mixtas con distintas cepas de *Starmmerella bacillaris*, y fermentaciones únicas con distintas cepas de *S. cerevisiae* y comparando las fermentaciones únicas de cada cepa de *S. cerevisiae* con las mixtas de esas mismas cepas con *S. bacillaris*, en todos los casos la fermentación mixta obtuvo menos contenido de etanol con una reducción media de 0,55 % v/v, esto se debe al alto carácter fructófilo de *S. bacillaris*, su alta capacidad de persistir en las etapas medias y tardías de la fermentación, además mostró capacidad de dominar y reducir el crecimiento y tamaño de *S. cerevisiae*, posiblemente por el consumo temprano de nutrientes, principalmente amonio, por parte de la no-*Saccharomyces*. *T. delbrueckii* también se ha confirmado como una levadura capaz de producir menor concentración de etanol que *S. cerevisiae* (Contreras et al., 2015; Azzolini et al., 2012; Hranilovic et al., 2018), obteniendo una diferencia mayor en el estudio de Contreras et al., 2015, en el cual se confirmó menor concentración de etanol que *S. cerevisiae* con diferentes dosis de aireación por parte de todas las no-*Saccharomyces*. También *H. uvarum* en fermentación mixta con *S. cerevisiae* y *O. oeni* obtuvo una concentración de etanol menor (Minnaar et al., 2019).

En algunos estudios de forma contraria, no se confirmó una disminución significativa en la concentración de etanol, en comparación a *S. cerevisiae* (Maturano et al., 2012; Escott et al., 2018; Minnaar et al., 2014). Se ha confirmado en algunos estudios también menor concentración de etanol en fermentaciones secuenciales que simultáneas (Shi et al., 2019; Capozzi et al., 2019).

El efecto Crabtree negativo de algunas levaduras no-*Saccharomyces*, permite usar el oxígeno para desviar el carbono hacia la formación de otros metabolitos que no son el etanol, por lo que en presencia de oxígeno pueden metabolizar el azúcar de forma aeróbica. *H. uvarum*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* (Contreras et al., 2015) son algunas de las levaduras que tienen este efecto. Quiros et al., 2014 en su estudio determinó el coeficiente respiratorio en condiciones aerobias (RQ) y confirmó a *M. pulcherrima* como una levadura capaz de respirar azúcares en condiciones de aireación. Se ha estudiado también el porcentaje de rendimiento de etanol en condiciones de anaerobiosis y aerobiosis, confirmando que a mayores dosis de oxígeno disuelto el rendimiento de etanol es menor (Shekhawat et al., 2017).

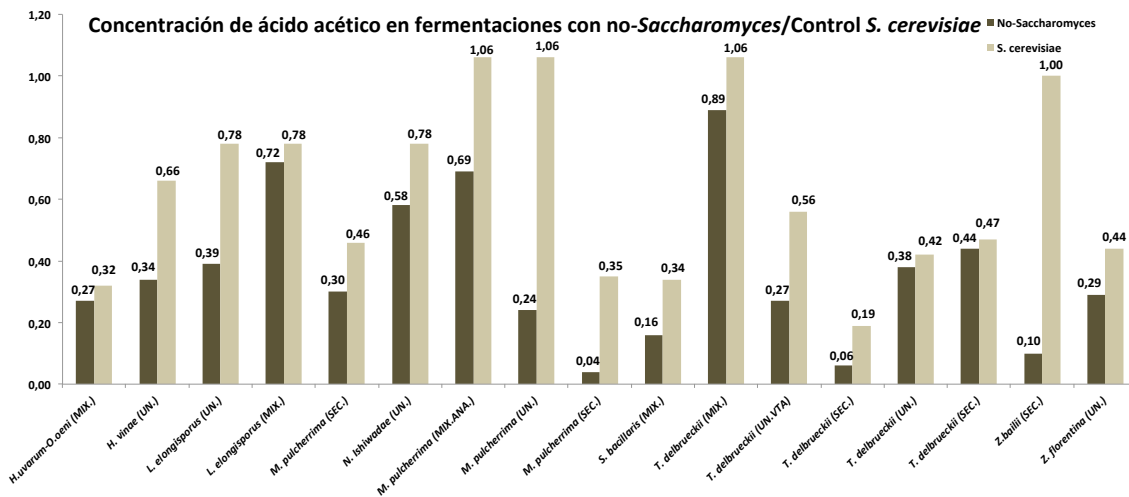


El contenido de etanol del vino está determinado en gran medida por la madurez de la uva, y por lo tanto por su contenido de azúcares, pero debido a que el mercado está demandando vinos con menor concentración de etanol, el uso de levaduras no-*Saccharomyces* menos eficientes en la transformación de azúcares de la uva en etanol, puede resultar una estrategia adecuada para disminuir su concentración.

## 1.2. Producción de ácido acético y otros ácidos

Tradicionalmente *S. pombe* ha sido una de las levaduras no-*Saccharomyces* considerada productora de altas concentraciones de acidez volátil, al igual que otras no-*Saccharomyces* de primera fase como *P. anomala*, *K. apiculata*, *H. uvarum* y *M. pulcherrima*, sin embargo, *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* han sido descritas como levaduras con baja producción de ácido acético (Suárez-Lepe et al., 2015).

Tras la realización de este trabajo, se ha comprobado que otras levaduras no-*Saccharomyces* además de *T. delbrueckii*, pueden producir menor concentración de ácido acético que *S. cerevisiae*, tanto en fermentaciones únicas, secuenciales y mixtas, llegando en algunos casos incluso a no superar los valores que son considerados como defecto olfativo (0,7-1,1 g/l de ácido acético), por parte de las no-*Saccharomyces*.



**Gráfico 4** . Comparativa de la concentración de ácido acético expresada en g/l de ácido acético, de fermentaciones con no-*Saccharomyces* y *S. cerevisiae* (UN: fermentación única; SEC: fermentación secuencial no-*Saccharomyces*/*S. cerevisiae*; MIX: fermentación mixta no-*Saccharomyces*/*S. cerevisiae*; VTA: Vendimia tardía; ANA: Anaerobiosis). (Fuente propia, con los datos obtenidos de los estudios de Capozzi et al., 2019; Maturano et al., 2012; Ruiz et al., 2019; Comitini et al., 2011; Shekhawat et al., 2017; Contreras et al., 2014; Englezos et al., 2019; Hranilovic et al., 2018; Chen et al., 2018; Whitener et al., 2017; Azzolini et al., 2012; Contreras et al., 2015; Lencioni et al., 2016).

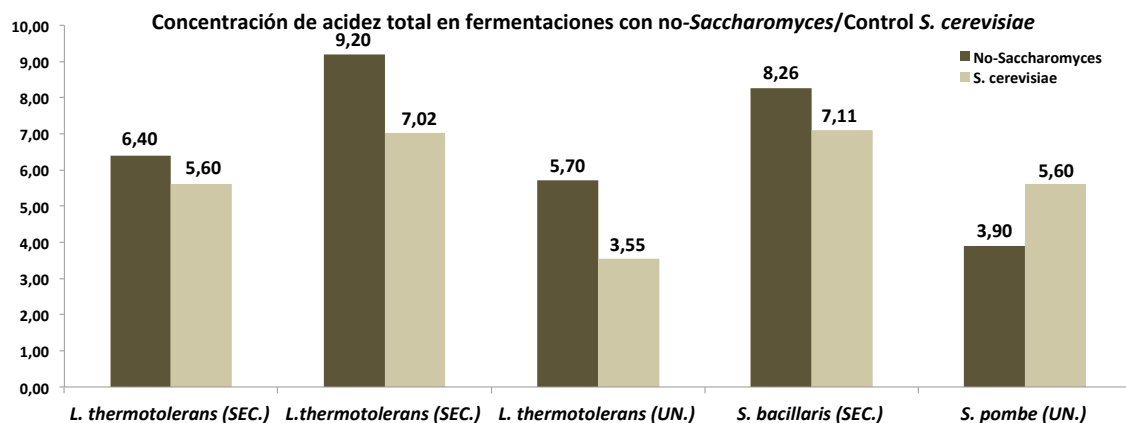
Tal y como se muestra en el gráfico 4, en fermentaciones únicas con levaduras de los géneros *Hanseniaspora*, *Lodderomyces*, *Metschnikowia*, *Torulasporea* o *Zygorulasporea* se obtuvo menor concentración de ácido acético que *S. cerevisiae*, llegando incluso en el caso de *M. pulcherrima* a una diferencia de 0,82 g/l respecto a *S. cerevisiae* en fermentación única en el estudio de Shekhawat et al., 2017, suponiendo un 77 % menos la concentración de ácido acético que la levadura no-*Saccharomyces*. Sin embargo, en este mismo estudio pero en fermentación simultánea de *M. pulcherrima* y *S. cerevisiae* con diferentes dosis de oxigenación, se generaron cantidades excesivas de ácido acético (1,44-2,06 g/l) y en condiciones de anaerobiosis también fueron bajas. También cabe destacar, la baja concentración de ácido acético producida en fermentación única por parte de *L. elongisporus*, una levadura no-*Saccharomyces* poco convencional estudiada por Ruiz et al., 2019, y que además fue capaz de completar la fermentación alcohólica, tanto en fermentación única como en coinoculación con *S. cerevisiae*. Sin embargo, en fermentación simultánea, *L. elongisporus* junto con *S. cerevisiae*, aunque obtuvo menor



concentración de ácido acético que *S. cerevisiae*, el valor fue mayor que en fermentación única.

En el caso de fermentaciones mixtas con no-*Saccharomyces* y *S. cerevisiae*, algunos autores (Capozzi et al., 2019; Ruiz et al., 2019; Comitini et al., 2011; Shekhawat et al., 2017; Contreras et al., 2014 Englezos et al., 2019; Azzolini et al., 2012; Contreras et al., 2015) han confirmado menor concentración de ácido acético en comparación con las fermentaciones únicas de *S. cerevisiae*. Destaca la diferencia obtenida por *Z. bailli* en el estudio de Contreras et al., 2015, en el que la no-*Saccharomyces* produjo 0,90 g/l menos de ácido acético que *S. cerevisiae*, suponiendo un 90 % menos, teniendo en cuenta además, que estos datos corresponden con un tratamiento de aireación controlada con una dosis de 5 ml/min durante toda la fermentación y que se completó la fermentación alcohólica, en este estudio la fermentación control (*S. cerevisiae* en anaerobiosis) también obtuvo mayor concentración de ácido acético que en la fermentación secuencial, con 0,4 g/l.

A menudo, *T. delbrueckii* ha sido descrita como baja productora de ácido acético en condiciones de vinificación estándar y ha demostrado mantener esta característica además con suministro de oxígeno (Shekhawat et al., 2017).



**Gráfico 5.** Comparativa de la concentración de acidez total expresada en g/l de ácido tartárico de fermentaciones con no-*Saccharomyces* y *S. cerevisiae* (UN: fermentación única; SEC: fermentación secuencial no-*Saccharomyces*/*S. cerevisiae*; MIX). (Fuente propia, con los datos obtenidos de los estudios de Chen et al., 2018; Comitini et al., 2011; Escribano et al., 2018; Englezos et al., 2019).

También algunas levaduras no-*Saccharomyces* de los géneros *L. thermotolerans* y *S. bacillaris* han demostrado aumentar los niveles de acidez total del vino, por lo que podrían utilizarse para ajustar la acidez, tal y como se muestra en el gráfico 5.

En el estudio de Chen et al., 2018, *L. thermotolerans* produjo más acidez total en fermentación secuencial, en comparación con otras no-*Saccharomyces* (*M. pulcherrima*, *S. pombe* y *T. delbrueckii*) y con *S. cerevisiae*. Fueron vinos fermentados con la variedad Merlot y sin tratamiento de tanino enológico, y su aumento de concentración está relacionado con una menor degradación de los ácidos orgánicos por parte de *L. thermotolerans*, quién también tuvo la concentración más alta de ácido L- láctico al final de la fermentación secuencial con 1,7 g/l. Binati et al., 2020 también confirmó que *L. thermotolerans* produjo cantidades relevantes de ácido láctico. También confirmaron un aumento de acidez total por parte de *L. thermotolerans*, Comitini et al., 2011 y Escribano et al., 2018 en fermentación secuencial y única respectivamente. En el primero de ellos la mayor concentración de acidez total con esta no-*Saccharomyces* se obtuvo con tamaño de inóculo  $10^3$  cell/ml para *S. cerevisiae* y se vio relacionado con una reducción de la acidez volátil en comparación con la fermentación de *S. cerevisiae* de forma única.

También se muestra en el gráfico 5 un aumento de la acidez total, respecto a *S. cerevisiae*, por parte de *S. bacillaris* en fermentación secuencial con *S. cerevisiae* en

el estudio de Englezos et al., 2019, en el que se realizaron fermentaciones únicas con diferentes cepas de *S. cerevisiae* y fermentaciones secuenciales de *S. bacillaris* con las distintas cepas de *S. cerevisiae*, también se mostró que los promedios en las fermentaciones secuenciales de la acidez total fueron de 7,60 g/l, mientras que en las fermentaciones únicas se obtuvo 6,91 g/l. Estos resultados también fueron confirmados por Escribano et al., 2018.

Al contrario de lo comentado hasta ahora, también hay levaduras no-*Saccharomyces* que disminuyen la acidez total, como se demostró en el estudio de Chen et al., 2018, en el que *S. pombe* obtuvo menor concentración de acidez total que *S. cerevisiae* (Gráfico 5), y esto podría resultar interesante para disminuir la acidez total en climas fríos.

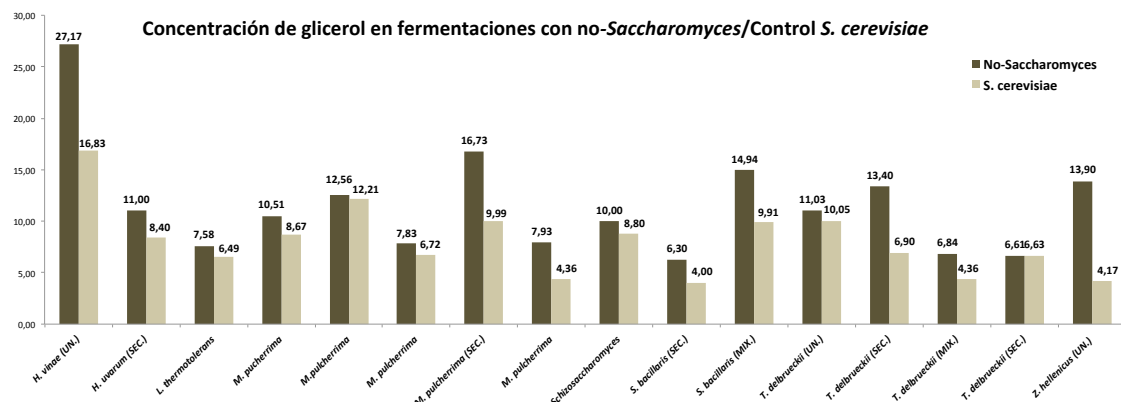
Por lo que se puede afirmar que el uso de levaduras no-*Saccharomyces* influye en la formación o degradación de ácidos, resultando una estrategia interesante para poder modular la acidez.

### 1.3. Influencia sobre las características sensoriales

Las levaduras no-*Saccharomyces* pueden contribuir a mejorar el aroma del vino, así como favorecer la formación de pigmentos estables durante la fermentación por la producción de metabolitos como el acetaldehído o el piruvato, obteniendo una mejora en las características organolépticas del vino.

#### 1.3.1. Compuestos responsables de la estructura

Las levaduras durante su actividad fermentativa participan también en la formación de compuestos que influyen en la estructura y cuerpo del vino, como la glicerina, o en la liberación de polisacáridos durante la autólisis de la pared celular (Suárez-Lepe et al., 2015).



**Gráfico 6** . Comparativa de la concentración de glicerol expresada en g/l de fermentaciones con no-*Saccharomyces* y *S. cerevisiae* (UN: fermentación única; SEC: fermentación secuencial no-*Saccharomyces*/*S. cerevisiae*; MIX: fermentación mixta no-*Saccharomyces*/*S. cerevisiae*; VTE: vendimia temprana; VTA: vendimia tardía). (Fuente propia, con los datos obtenidos de los estudios de Maturano et al., 2012; Maturano et al., 2019; Comitini et al., 2011; Hranilovic et al., 2018; Varela et al., 2017; Contreras et al., 2014; Shekhawat et al., 2017; Benito et al., 2014; Binati et al., 2020; Englezos et al., 2019; Minnaar et al., 2014; Contreras et al., 2015; Belda et al., 2015; Teixeira et al., 2015).

Se ha reconocido que algunas levaduras no-*Saccharomyces* aumentan el contenido de glicerol, teniendo un impacto positivo en la calidad (Jolly et al., 2006), mostrándose algunos de los resultados en el gráfico 6. Levaduras del género *Hanseniaspora* (*H. vineae* y *H. uvarum*) tanto en fermentación única como secuencial produjeron mayor concentración de glicerol que *S. cerevisiae* (Maturano et al., 2012; Maturano et al., 2019). En el primero caso, la no-*Saccharomyces* también obtuvo en fermentación única menor concentración de etanol y ácido acético que *S. cerevisiae*. Sin embargo, en fermentación secuencial, con 10 % de *S. cerevisiae* y 90 % de *H. vineae*, la concentración de glicerol fue superior para *S. cerevisiae*. *T. delbrueckii* en varios estudios también ha producido mayor concentración de glicerol que *S. cerevisiae*



(Gráfico 6) (Minnaar et al., 2014; Contreras et al., 2015; Shekhawat et al., 2017; Belda et al., 2015). Con variedad Cabernet Franc, la no-*Saccharomyces* obtuvo también menor concentración de etanol que *S. cerevisiae*, pero mayor acidez volátil, pero con una concentración moderada (0,48 g/l) (Minnaar et al., 2014). La no-*Saccharomyces* obtuvo menor concentración de etanol y la misma acidez volátil que *S. cerevisiae*, aplicando un tratamiento de aireación de 5 ml/min durante las primeras 24 horas (Contreras et al., 2015). En el tercero de ellos, *T. delbrueckii* en fermentación mixta obtuvo mayor concentración de glicerol en condiciones de anaerobiosis que de aerobiosis, y su concentración de ácido acético fue menor que la de *S. cerevisiae* (Shekhawat et al., 2017). Sin embargo, en el último estudio, aunque el glicerol también fue mayor que *S. cerevisiae*, la diferencia fue menos significativa, pero la concentración de azúcares residuales, ácido acético y etanol fue menor que *S. cerevisiae*, por lo que el consumo de azúcares se desvió hacia la formación de otros compuestos (Belda et al., 2015). En otros estudios, la producción de glicerol por parte de *T. delbrueckii* no fue superior a *S. cerevisiae* (Loira et al., 2014; Hranilovic et al., 2018).

*Schizosaccharomyces* spp. también produce una cantidad mayor de glicerol que *S. cerevisiae* (Benito et al., 2014), por lo que podría tener una vía gliceropirúvica más desarrollada y ello justificaría su mayor producción de ácido pirúvico y glicerol en comparación a otras levaduras (Suárez-Lepe et al., 2012).

La cantidad de polisacáridos (Anexo 5) liberados por parte de algunas levaduras no-*Saccharomyces* como *Nakazawaea ishiwadae* (Ruiz et al., 2019), *P. fermentans* (Domizio et al., 2014), *Z. bailii* (Contreras et al., 2015), *Schizosaccharomyces* spp. (Benito et al., 2014), *Z. florentina* (Lencioni et al., 2016; Domizio et al., 2014), *T. delbrueckii* (Comitini et al., 2011; Belda et al., 2015; Domizio et al., 2014; Azzolini et al., 2012) es superior que el de *S. cerevisiae* debido a la compleja estructura de su pared celular, relacionada con su porosidad (Suárez-Lepe et al., 2015), y a una degradación temprana de la pared celular durante el proceso autolítico, dependiendo de la tensión de la levadura a estímulos externos que causan estrés en la pared (Domizio et al., 2014). Su concentración está relacionada con la estructura del vino, la suavidad en boca, aumentando la percepción de viscosidad (Minnaar et al., 2014) además de tener un papel importante en la estabilidad coloidal (Suárez-Lepe et al., 2015).

### 1.3.2. Compuestos responsables del color

De los compuestos con influencia en el color, las antocianinas son los compuestos fenólicos con mayor influencia en las características cromáticas del vino tinto, y su influencia en la estabilidad del color depende de la combinación de algunos factores como la estructura y la concentración de la antocianina, el pH y la temperatura (Del Álamo et al., 2004), siendo más estables en medios ácidos y presentando una tonalidad roja (Ribéreau-Gayon et al., 2006). El malvidín-3-glucósido (M3G) es el antociano mayoritario de la uva, y algunos autores han informado de una mayor concentración de este compuesto en fermentaciones únicas con no-*Saccharomyces* (Minnaar et al., 2014; Morata et al., 2012) y en fermentaciones mixtas con no-*Saccharomyces* y *S. cerevisiae*, incluso también con presencia de una bacteria láctica (Minnaar et al., 2019).

En el estudio de Minnaar et al., 2019 se realizaron coinoculaciones mixtas, con no-*Saccharomyces* (*M. pulcherrima*, *H. uvarum*), *S. cerevisiae* y bacterias lácticas (*O. oeni* y *L. plantarum*) en mosto de variedad Shiraz. En la coinoculación con *M. pulcherrima*, *S. cerevisiae* y *O. oeni* se obtuvo la mayor concentración de malvidín-3-glucósido con 82,31 mg/l comparado con el resto de coinoculaciones y con *S. cerevisiae* (63,49 mg/l). Sin embargo no obtuvo mayor concentración de polifenoles totales, siendo la coinoculación con *H. uvarum*, *S. cerevisiae* y *L. plantarum* la superior



con 191,74 mg/l, debido a una mayor concentración de ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido cafeico, p-ácido cumárico y ácido clorogénico) y también una elevada concentración de M3G (67,33 mg/l). *T. delbrueckii* también ha conseguido una mayor concentración de M3G en fermentación única con variedad Pinotage, en comparación con *S. cerevisiae*, 62,17 mg/l y 37,93 mg/l respectivamente, sin embargo, con variedad Cabernet Franc obtuvo más concentración *S. cerevisiae* que *T. delbrueckii* (Minnaar et al., 2014). Mayor índice de polifenoles totales obtuvieron las fermentaciones mixtas de *M. pulcherrima*-*S. cerevisiae* y *M. pulcherrima*-*S. pombe* (Escott et al., 2018), también *S. pombe* en fermentación única obtuvo más polifenoles totales que las fermentaciones secuenciales de *M. pulcherrima*, *L. thermotolerans* y *T. delbrueckii* con *S. cerevisiae* y *S. cerevisiae* en fermentación única, y en todas las fermentaciones se observó un incremento de los polifenoles totales adicionando un tratamiento de taninos de semilla de uva pero no fue significativo (Chen et al., 2018), quizá debido a la combinación de los taninos con los polisacáridos, sin embargo, la concentración de antocianinas fue mayor en la fermentación única de *S. cerevisiae*.

El momento de vendimia tiene un efecto significativo sobre la composición fenólica y los parámetros del color, excepto el tono del vino, tal y como ha confirmado Hranilovic et al., 2018, donde en su estudio realizó fermentaciones con vendimia temprana y tardía, obteniendo en vendimia tardía mayor concentración de taninos, antocianinas, sustancias fenólicas y mayor densidad de color en las fermentaciones con cepas comerciales de *T. delbrueckii*, una mezcla de *T. delbrueckii*, *L. thermotolerans* y *S. cerevisiae* y *S. cerevisiae* en fermentación única.

Respecto a las vitisinas, algunos autores han confirmado una mayor concentración en fermentaciones mixtas de no-*Saccharomyces* y *S. cerevisiae* que en fermentaciones puras de *S. cerevisiae* (Medina et al., 2016; Escott et al., 2018; Minnaar et al., 2019; Belda et al., 2015; Azzolini et al., 2012). *L. thermotolerans* y *S. cerevisiae* en fermentación secuencial con tratamiento de procianidina C1 y *T. delbrueckii* con *S. pombe* con tratamiento de procianidina B2 obtuvieron los mayores niveles de vitisinas con 1,3 mg/l en ambos casos (Escott et al., 2018), también Benito et al., 2014 confirmó que cepas de *Schizosaccharomyces* tiene una mayor producción de ácido pirúvico relacionado con la formación de vitisina A que *S. cerevisiae*. En el estudio de Medina et al., 2016, aunque en fermentaciones puras *S. cerevisiae* obtuvo mayor concentración de vitisina B que las no-*Saccharomyces* estudiadas (*M. pulcherrima*, *H. guilliermondii*, *H. opuntiae*, *H. vineae* y *H. clermontiae*), en fermentación de *H. vineae* y *H. clermontiae* con *S. cerevisiae* se obtuvo un aumento de la concentración de vitisina B (acetaldehído) respecto a la fermentación pura de *S. cerevisiae*, sin embargo fue menor que en la fermentación de *T. delbrueckii*. *T. delbrueckii* en fermentación única en el estudio de Belda et al., 2015, obtuvo mayor intensidad de color que en la fermentación secuencial, simultánea y en la única con *S. cerevisiae*, con motivo de una mayor formación de a. pirúvico afectando a la estabilidad del color, algo que también confirmó Azzolini et al., 2012, ya que los vinos fermentados por coinoculación con *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* fueron más estables que los fermentados únicamente con *S. cerevisiae* en variedad Amarone. *M. pulcherrima* y *Hanseniaspora* en monocultivo con variedad de uva Tannat obtuvieron mayor intensidad de color que *S. cerevisiae* (Medina et al., 2016). *S. pombe* en fermentación única formó más vitisina A que *S. cerevisiae* y que *S. uvarum*, sin embargo, la producción de vitisina B es similar a los producidos por *S. cerevisiae* (Morata et al., 2012).

Por el contrario, Loira et al., 2014 afirmó que *T. delbrueckii* en fermentación secuencial con *S. cerevisiae* obtuvo menor concentración de vitisinas que *S. cerevisiae* en fermentación única, debido a la baja producción de acetaldehído por parte de *T. delbrueckii* y por lo tanto su baja formación de vitisina B. Binati et al., 2020 describió a *S. bacillaris* como baja productora de acetaldehído.





Algunas levaduras tienen actividad HCDC (hidroxicinamato descarboxilasa), a través de la cual forman piranoantocianos vinilfenólicos durante la fermentación. Tienen propiedades similares a las vitisinas ya que se comportan como pigmentos estables. *T. delbrueckii* en el estudio de Loira et al., 2015 no demostró formar estos pigmentos, ya que se formaron tras la inoculación de *S. cerevisiae*. Sin embargo, *S. pombe* aumentó el nivel de piranoantocianos vinilfenólicos teniendo un efecto positivo para la estabilidad del color (Chen et al., 2018), también *Pichia guillermondii* ha confirmado tener mayor actividad HCDC que *S. cerevisiae* y como consecuencia en fermentación secuencial formó mayor cantidad de piranoantocianinas vinilfenólicas (Benito et al., 2011).

Por todo ello se puede confirmar que la especie de levadura seleccionada para realizar la fermentación afecta a la concentración de compuestos relacionados con el color del vino, así como que algunas levaduras no-*Saccharomyces* son capaces de producir mayores concentraciones de compuestos fenólicos que *S. cerevisiae*, contribuyendo a la formación de metabolitos que forman pigmentos poliméricos estables con influencia en la complejidad del vino.

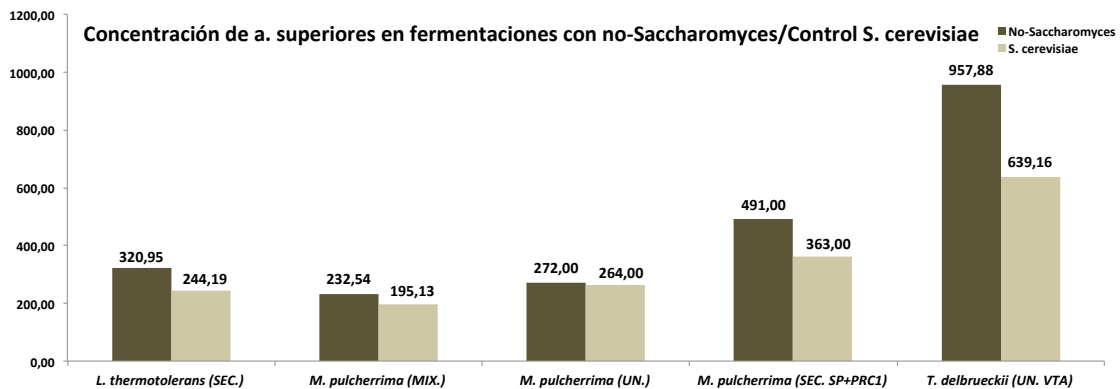
### 1.3.3. Compuestos aromáticos de fermentación

La mayoría de los compuestos aromáticos del vino se forman durante el proceso fermentativo, y su concentración depende de las condiciones de fermentación y de la levadura (Padilla et al., 2016), ya que su actividad enzimática favorece la liberación de compuestos volátiles durante este proceso (Hu et al., 2016), aunque también pueden formarse a lo largo de las demás fases de elaboración. Actualmente se han identificado más de 800 compuestos volátiles con actividad odorante en el vino, pero solo el 10 % generan olores activos (Kong et al., 2019), considerando que los que mayor influencia tienen en los vinos tintos se pueden agrupar en ésteres, alcoholes superiores, aldehídos, compuestos del azufre y ácidos grasos volátiles. Los aromas del vino constituyen un criterio fundamental a tener en cuenta en la calidad del vino y es por ello que se están realizando estudios acerca de la influencia de diferentes levaduras sobre los compuestos aromáticos (Azzolini et al., 2012; Belda et al., 2015; Binati et al., 2020; Escribano et al., 2018; Escribano-Viana et al., 2018; Hu et al., 2016; Kong et al., 2019; Shi et al., 2019; Whitener et al., 2017).

Los alcoholes superiores son el grupo más grande de compuestos aromáticos presentes en el vino (Padilla et al., 2016) y en concentraciones inferiores a los 350 mg/l contribuyen a la complejidad aromática, aumentando la percepción varietal (Belda et al., 2015), mientras que en cantidades superiores aportan aromas desagradables. En el gráfico 7, se muestra como algunas no-*Saccharomyces* son capaces de producir mayor concentración de alcoholes superiores que *S. cerevisiae*, en algunos casos en concentraciones muy elevadas, superando los 350 mg/l (*M. pulcherrima*; *T. delbrueckii*). *M. pulcherrima* produjo concentraciones superiores en los estudios de Varela et al., 2017, Escribano et al., 2018 y Escott et al., 2018. En el estudio de Escribano et al., 2018, excepto *M. pulcherrima*, el resto de las levaduras no-*Saccharomyces* estudiadas (*Debaryomyces hansenii*, *Candida zeylanoides*, *T. delbrueckii*, *L. thermotolerans*, *Z. bailii*) produjeron menores concentraciones que *S. cerevisiae*. Algunas no-*Saccharomyces* de las especies *Hanseniaspora*, *Zygosaccharomyces* han sido descritas por producir menores concentraciones de alcoholes superiores que *S. cerevisiae* (Padilla et al., 2016). Una mayor concentración de 2-feniletanol, alcohol superior con aroma a rosa, se ha relacionado con la actividad metabólica de algunas no-*Saccharomyces* como *T. delbrueckii* y *L. thermotolerans* en fermentación simultánea con *S. cerevisiae* (Comitini et al., 2011).

Algunos estudios han confirmado obtener mayor concentración de alcoholes superiores en fermentación simultánea que en fermentación secuencial, llegando en el primer caso a superar los 350 mg/l (Shi et al., 2019), por lo que la estrategia de

inoculación es clave en la concentración de estos compuestos. Sin embargo, también se ha encontrado una correlación positiva entre la producción de alcoholes superiores, el crecimiento de no-*Saccharomyces* y el nivel de oxígeno (Shekhawat et al., 2017).



**Gráfico 7.** Comparativa de la concentración de alcoholes superiores expresada en mg/l de fermentaciones con no-*Saccharomyces* y *S. cerevisiae* (UN: fermentación única; SEC: fermentación secuencial no-*Saccharomyces*/*S. cerevisiae*; MIX: fermentación mixta no-*Saccharomyces*/*S. cerevisiae*; SEC. SP+PRC1: fermentación secuencial con *S. pombe* y tratamiento de Procionidina C1; VTA: vendimia tardía). (Fuente propia, con los datos obtenidos de los estudios de Comitini et al., 2011; Varela et al., 2017; Escribano et al., 2018; Escott et al., 2018; Hranilovic et al., 2018).

También los ésteres son algunos de los compuestos volátiles con más influencia aromática en los vinos tintos, destacando el acetato 2-feniletilo, que aporta aromas florales y afrutados, el acetato de isoamilo, que recuerda a notas de plátano y pera o el acetato de etilo, siendo el principal éster del vino y que mejora la percepción de aromas frutales y aumenta la complejidad del vino en bajas concentraciones (Loira et al., 2014), pero que en concentraciones superiores a 150 mg/l aporta aromas a pegamento o disolvente. Levaduras no-*Saccharomyces* de especies *Candida*, *Hansenula* y *Pichia* tienen mayor capacidad de producir acetato de etilo que *S. cerevisiae* (Padilla et al., 2016). *M. pulcherrima* ha confirmado producir altas concentraciones de acetato de 2-feniletilo en el estudio de Escribano et al., 2018, sin embargo respecto a la producción de acetato de etilo todas las levaduras no-*Saccharomyces* obtuvieron niveles por debajo de 150-200 mg/l (0,22-51,7 mg/l) a excepción de *M. pulcherrima* que obtuvo 269 mg/l, quién también produjo altas concentraciones de diacetilo y acetoina. Escott et al., 2018 también confirmó mayores concentraciones de ésteres y compuestos volátiles totales por parte de *M. pulcherrima* en fermentación secuencial con *S. cerevisiae*. *Z. florentina* también ha confirmado producir concentraciones bajas de acetato de etilo tanto en fermentación única como mixta con *S. cerevisiae* (Lencioni et al., 2016). Las fermentaciones secuenciales y simultáneas, según afirmó Shi et al., 2019, producen mayores concentraciones de ésteres totales que *S. cerevisiae*.

La actividad enzimática de algunas no-*Saccharomyces* también influye en la formación de compuestos aromáticos. Levaduras como *R. mucilaginosa* y *H. uvarum* han demostrado tener actividad  $\beta$ -glucosidasa, liberando compuestos volátiles asociados a aromas florales y afrutados (Hu et al., 2016).

Vinos elaborados con levaduras no-*Saccharomyces* evaluados sensorialmente, se han descrito como más aromáticos, complejos y afrutados y se han relacionado con una mayor concentración de ésteres totales, menor concentración de volátiles considerados defectos del vino (acetato de etilo, diacetilo, lactato de etilo) y menor concentración de etanol, que enmascara los compuestos volátiles. Estos atributos se han confirmado en la fermentación con las siguientes no-*Saccharomyces*, *M. pulcherrima* con variedad Tempranillo (Belda et al., 2016) y Merlot (Varela et al., 2017). También con *T. delbrueckii* en fermentaciones secuenciales con vinos de variedad Amarone (Azzolini et al., 2012), con variedad Tempranillo (Belda et al., 2015; Escott et al., 2018; Loira et al., 2014) y tratamiento de procianidina B2 (Escott et al.,





2018). En fermentaciones únicas, también se han evaluado esas características sensoriales, con vinos de variedad Cabernet Franc (Minnaar et al., 2014), en vendimia temprana y tardía con variedad Shiraz (Hranilovic et al., 2018) se percibieron aromas más florales y afrutados, igual que con variedad Merlot, que se relacionó con el contenido de ésteres y alcoholes superiores (Chen et al., 2018). En fermentaciones mixtas también ha sido confirmado, con levaduras *P. kudriavzevii* con uvas de la variedad Cabernet Sauvignon (Shi et al., 2019), *S. bacillaris* en vinos con variedad Touriga Nacional (Teixeira et al., 2015), *H. uvarum* y *C. membranaefaciens* (Maturano et al., 2019) en vinos con variedad Malbec en (Maturano et al., 2019) y *H. uvarum* junto con *S. cerevisiae* y *O. oeni* con variedad de uva Negroamaro (Capozzi et al., 2019) y con *Z. florentina* con variedad Sangiovese (Lencioni et al., 2016). En el estudio de Binati et al., 2020, vinos elaborados con variedades de uvas tintas Marzemino y Corvina, con levaduras *M. pulcherrima*, *S. bacillaris* y *L. thermotolerans* fueron evaluados con puntuaciones más altas, asociándolos con una mayor complejidad aromática, menor percepción de atributos vegetales y más intensidad frutal.

Pero durante la fermentación, también pueden aparecer aromas no deseables que influyen de forma negativa en la calidad del vino y a los que es importante prestar atención para procurar evitarlos, ya que algunas no-*Saccharomyces* pueden producirlos. *M. pulcherrima* produjo concentraciones de 125 mg/l de acetato de etilo (éster con aroma a pegamento) (Escott et al., 2018) siendo una cantidad muy elevada en comparación con *S. cerevisiae* (4,7 mg/l) y *T. delbrueckii* (6-20 mg/l) en el estudio de Loira et al., 2014. También *M. pulcherrima* en fermentación mixta con *S. pombe* y tratamiento de procianidina C1 obtuvo los niveles más altos de diacetilo (aroma a mantequilla) (Escott et al., 2018). Otro de los compuestos que en concentraciones elevadas (>350 mg/l) puede suponer un defecto olfativo, son los alcoholes superiores y *M. pulcherrima* en el estudio de Escott et al., 2018 en fermentación mixta también obtuvo los valores superiores con 491 mg/l con el tratamiento de procianidina C1. *T. delbrueckii* produjo mayor concentración de acetato de etilo que *S. cerevisiae* con valores de 71,7 mg/l y 54,7 mg/l respectivamente, y de diacetilo, 6 mg/l y 3 mg/l (Loira et al., 2014). *M. pulcherrima*, *L. thermotolerans* y *T. delbrueckii* produjeron mayores niveles de acetato de etilo que *S. cerevisiae* con concentraciones de acetato de etilo de 51,20-36,52-41,91 mg/l respectivamente y *S. pombe* obtuvo la mayor cantidad de acetaldehído (Chen et al., 2018). Los ácidos grasos en concentraciones elevadas también pueden aportar aromas desagradables, a queso y notas rancias. *P. guilliermondii* aunque ha demostrado tener algunas ventajas relacionadas con la formación de pigmentos de color estables, se ha confirmado que en fermentación única produce altas concentraciones de acetato de etilo y ácido acético (Benito et al., 2011).

Se ha estudiado también la producción de aromas fenólicos extraños en vinificación por parte de algunas levaduras no-*Saccharomyces*, confirmándose que algunas cepas de *Rhodotorula*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Hansenula* y *Brettanomyces* produjeron este tipo de olores. Esto se relacionó con la tasa de descomposición del ácido ferúlico y ácidos fenólicos produciendo compuestos volátiles fenólicos como el 4-vinilguaiacol y 4-etilguaiacol que aportan aromas negativos a cuero, farmacéuticos o ahumados (Shinohara et al., 2000), aunque estos resultados estaban muy relacionados con la sanidad de la uva.



## CONCLUSIONES

El presente estudio revela el gran potencial enológico de algunas levaduras no-*Saccharomyces* para mejorar las características físico-químicas y sensoriales de los vinos tintos, presentando a continuación las siguientes conclusiones:

- Aunque en las fermentaciones secuenciales las no-*Saccharomyces* imponen en mayor medida sus características metabólicas, las fermentaciones mixtas (tanto simultáneas como secuenciales) mejoran algunas características del vino como menor concentración de etanol, menor concentración de ácido acético, mayor concentración de glicerol y mayor concentración de polisacáridos en comparación con las fermentaciones monocultivo de *S. cerevisiae* y a las fermentaciones únicas de levaduras no-*Saccharomyces*.
- Algunas levaduras no-*Saccharomyces* tienen mayor actividad enzimática que *S. cerevisiae*, lo que permite mejorar los atributos sensoriales o algunos procesos durante la vinificación como la clarificación, filtración o estabilización.
- Algunas levaduras no-*Saccharomyces* como *C. membranaefaciens*, *H. uvarum*, *M. pulcherrima*, *S. bacillaris*, *T. delbrueckii* son capaces de producir menor concentración de etanol que *S. cerevisiae*, relacionado además con producciones de ácido acético moderado. Esto se debe a que se produce un desvío hacia la formación de compuestos secundarios durante la fermentación alcohólica.
- El aporte de oxígeno controlado durante la fermentación alcohólica permite a algunas levaduras no-*Saccharomyces* aumentar su tolerancia al etanol y reducir la concentración de etanol. Esta característica la han confirmado algunas levaduras como *L. thermotolerans*, *M. pulcherrima*, *T. delbrueckii*.
- Algunas levaduras no-*Saccharomyces* influyen en la formación o degradación de ácidos, resultando una estrategia interesante para poder modular la acidez. En el caso de *S. bacillaris* y *L. thermotolerans* producen mayor concentración de acidez total, debiéndose en el caso de *L. thermotolerans* a la producción de ácido láctico, por lo que su uso podría ser de interés en climas cálidos. La producción de ácido acético por parte de algunas levaduras no-*Saccharomyces* como *M. pulcherrima*, *T. delbrueckii* y *Z. bailii* es menor que la producida por *S. cerevisiae*.
- Compuestos relacionados con la estructura del vino, como el glicerol o los polisacáridos han sido cuantificados en mayor concentración en fermentaciones con presencia de algunas no-*Saccharomyces* como *H. vineae*, *H. uvarum*, *P. fermentans*, *T. delbrueckii*, *Z. bailii* y *Z. florentina*.
- La formación de compuestos con influencia en el color como las vitisinas o los piranoantocianos vinilfenólicos se ha relacionado con el uso de algunas levaduras no-*Saccharomyces* como *H. vineae*, *L. thermotolerans*, *P. guilliermondii*, *S. pombe*, *T. delbrueckii*.
- Aunque las fermentaciones de cultivos únicos suponen mayor homogeneidad del vino, las vinificaciones con cultivos mixtos, utilizando cepas de levaduras seleccionadas y capaces de mejorar la calidad y la complejidad, suponiendo un desafío que tendrá que seguirse estudiando, ya que algunas pueden tener limitaciones y es por ello necesario analizarlo a escala industrial para buscar las opciones más adecuadas.



## BIBLIOGRAFÍA

- Azzolini, M., Fedrizzi, B., Tosi, E., Finato, F., Vagnoli, P., Scrinzi, C., & Zapparoli, G. (2012). Effects of *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed cultures on fermentation and aroma of Amarona wine. *European Food Research and Technology*, 235 (2), 303-313.
- Belda, I., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., Calderón, F., & Benito, S. (2015). 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., Navascués, E., Marquina, & Santos, A. (2016). Improvement of aromatic thiol release through the selection of yeast with increased  $\beta$ -lyase activity. *International Journal of Food Microbiology*, 225, 1-8.
- Beltrán, G., Torija, M. J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., Rozès, N., & Mas, A. (2002). Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: A six year follow-up study. *Systematic and Applied Microbiology*, 25(2), 287-293.
- Benito, S., Morata, A., Palomero, F., González, M. C., Suárez-Lepe, J. A. (2011). Formation of vinylphenolic pyranoanthocyanins by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia guilliermondii* in red wines produced following different fermentation strategies. *Food Chemistry*, 124, 15-23.
- Benito, S., Palomero, F., Calderón, F., Palmero, D., Suárez-Lepe, J.A. (2014). Selection of appropriate *Schizosaccharomyces* strains for winemaking. *Food Microbiology* 42, 218-224.
- Binati, R., Lemos Junior, W., Luzzini, G., Slaghenaufi, D., Ugliano, M., Torriani, S. (2020). Contribution of non-*Saccharomyces* yeasts to wine volatile and sensory diversity: A study on *Lachancea thermotolerans*, *Metschnikowia spp.* and *Starmmerella bacillaris* strains isolated in Italy. *International Journal of Food Microbiology* 318, 108470.
- Canonico, L., Solomon, M., Comitini, F., Ciani, M., Varela, C. (2019). Volatile profile of reduced alcohol wines fermented with selected non-*Saccharomyces* yeasts under different aeration conditions. *Food Microbiology* 84, 103247.
- Capozzi, V., Berbegal, C., Tufariello, M., Grieco, F., Spano, G., & Grieco, F. (2019). Impact of co-inoculation of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum* and *Oenococcus oeni* autochthonous strains in controlled multi starter grape must fermentations. *LWT-Food Science and Technology* 109, 241-249.
- 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 Research*, 10(2), 123-133.
- Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2011). Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*, 28(5), 873-882.
- Contreras, A., Curtin, C., & Varela, C. (2014). Yeast population dynamics reveal a potential 'collaboration' between *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum* for the production of reduced alcohol wines during Shiraz fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(4), 1885-1895.
- Contreras, A., Hidalgo, C., Schmidt, S., Henschke, P. A., Curtin, C., & Varela, C. (2015). The application of non-*Saccharomyces* yeast in fermentations with limited aeration as a strategy for the production of wine with reduced alcohol content. *International Journal of Food Microbiology*, 205, 7-15.
- Chen, K., Escott, C., Loira, I., Del Fresno, J.M., Morata, A., Tesfaye, W., Calderón, F., Suárez-Lepe, J.A., Han, S., Benito, S. (2018). Use of non-*Saccharomyces* yeast and oenological tannin in red winemaking: Influence on colour, aroma and sensorial properties of young wines. *Food Microbiology* 69, 51-63.



- Del Álamo, M., Nevares, I., & García, S. (2004). Influence of different aging systems and oak woods on aged wine color and Anthocyanin composition. *European Food Research and Technology*, 219: 124-132.
- Domizio, P., Liu, Y., Bisson, L.F., & Barile, D. (2014). Use of non-*Saccharomyces* wine yeasts as novel sources of mannoproteins in wine. *Food Microbiology* 43 (2014) 5-15.
- Englezos, V., Pollon, M., Rantsiou, K., Ortiz-Julien, A., Botto, R., Río Segade, S., Giacosa, S., Rolle, L., & Cocolin, L. (2019). *Saccharomyces cerevisiae*-*Starmerella bacillaris* strains interaction modulates chemical and volatile profile in red wine mixed fermentations. *Food Research International*, 122, 392-401.
- Escott, C., Del Fresno, J. M., Loira, I., Morata, A., Tesfaye, W., González, M. del C., & Suárez-Lepe, J. A. (2018). Formation of polymeric pigments in red wines through sequential fermentation of flavanol-enriched musts with non-*Saccharomyces* yeasts. *Food Chemistry*, 239, 975-983.
- Escribano, R., González-Arenzana, L., Portu, J., Garijo, P., López-Alfaro, I., López, R., Santamaría, P., & Gutiérrez, A. R. (2018). Wine aromatic compound production and fermentative behaviour within different non-*Saccharomyces* species and clones. *Journal of Applied Microbiology*, 124(6), 1521-1531.
- Escribano-Viana, R., González-Arenzana, L., Portu, J., Garijo, P., López-Alfaro, I., López, R., Santamaría, P., & Gutiérrez, A. R. (2018). Wine aroma evolution throughout alcoholic fermentation sequentially inoculated with non-*Saccharomyces*/*Saccharomyces* yeasts. *Food Research International*, 112, 17-24.
- Esteve-Zarzoso, B., Manzanares, P., Ramón, D., & Querol, A (1998). The role of non-*Saccharomyces* yeast in industrial winemaking. *International Microbiology* 1:143-148.
- Fleet, G.H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology* 86, 11-22.
- Fleet, G.H. (2008). Wine yeast for the future. *FEMS Yeast Research* 8, 979-995.
- Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M. (2013). *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentations: a strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiology*. 33, 271-281.
- Gobbi, M., De Vero, L., Solieri, L., Comitini, F., Oro, L., Giudici, P., & Ciani, M. (2014). Fermentative aptitude of non-*Saccharomyces* wine yeast for reduction in the ethanol content in wine. *European Food Research and Technology* 239. 41-48.
- Hidalgo, J. (2011). *Tratado de Enología*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid-México.
- Hu, K., Qin, Y., Tao, Y.-S., Zhu, X.-L., Peng, C.-T., & Ullah, N. (2016). Potential of Glycosidase from non-*Saccharomyces* Isolates for Enhancement of Wine Aroma: Wine aroma improvement by glycosidase. *Journal of Food Science*, 81(4), M935-M943.
- Hranilovic, A., Li, S., Boss, P.K., Bindon, K., Ristic, R., Grbin, P.R., Van Der Westhuizen, T., & Jiranek, V. (2018). Chemical and sensory profiling of Shiraz wines co-fermented with commercial non-*Saccharomyces* inocula. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 24, 166-180.
- Jolly, N. P., Augustyn, O. P. H., & Pretorius, I. S. (2006). The Role and Use of Non-*Saccharomyces* Yeasts in Wine Production. *South African Journal of Enology & Viticulture*, 27(1).
- Jolly, N. P., Varela, C., & Pretorius, I.S. (2014). Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeast in wine production uncovered. *FEMS Yeast Research* 14, 215-237.
- Kong, C., Li, A., Jin, G.-J., Zhu, X., & Tao, Y. (2019). Evolution of volatile compounds treated with selected non-*Saccharomyces* extracellular extract during Pinot Noir winemaking in monsoon climate. *Food Research International*, 119, 177-186.





- Lencioni, L., Romani, C., Gobbi, M., Comitini, F., Ciani, M., & Domizio, P. (2016). Controlled mixed fermentation at winery scale using *Zygotulaspora florentina* and *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology* 234 (2016) 36-44.
- Loira, I., Vejarano, R., Bañuelos, M.A., Morata, A., Tesfaye, W., Uthurry, C., Villa, A., Cintora, I., Suárez-Lepe, J.A. (2014). Influence of sequential fermentation with *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on wine quality. *LWT Food Science and Technology*. 59. 915-922.
- López, M. C., Mateo, J. J., & Maicas, S. (2015). Screening of  $\beta$ -Glucosidase and  $\beta$ -Xylosidase Activities in Four Non-*Saccharomyces* Yeast Isolates. *Journal of Food Science*, 80(8), C1696-C1704.
- Magyar, I., & Tóth, T. (2011). Comparative evaluation of some oenological properties in wine strains of *Candida stellata*, *Candida zemplinina*, *Sacharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology* 28, 94-100.
- Man-Hsi, M., Boss, P., Walker, M., Sumbly, K., Grbin, P., & Jiranek, V. (2020). Evaluation of indigenous non-*Saccharomyces* yeasts isolated from a South Australian vineyard for their potential as wine starter cultures. *International Journal of Food Microbiology* 312, 108373.
- Maturano, Y. P., Mestre, M. V., Kuchen, B., Toro, M. E., Mercado, L. A., Vazquez, F., & Combina, M. (2019). Optimization of fermentation-relevant factors: A strategy to reduce ethanol in red wine by sequential culture of native yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 289, 40-48.
- Maturano, Y. P., Rodríguez Assaf, L. A., Toro, M. E., Nally, M. C., Vallejo, M., Castellanos de Figueroa, L. I., Combina, M., & Vazquez, F. (2012). Multi-enzyme production by pure and mixed cultures of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts during wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 155(1-2), 43-50.
- Medina, K., Boido, E., Fariña, L., Dellacassa, E., & Carrau, F. (2016). Non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* strains co-fermentation increases acetaldehyde accumulation: effect on anthocyanin-derived pigments in Tannat red wines. *Yeast*, 33 (7), 339-343.
- Minnaar, P. P., Du Plessis, H. W., Jolly, N. P., van der Rijst, M., & du Toit, M. (2019). Non-*Saccharomyces* yeast and lactic acid bacteria in Co-inoculated fermentations with two *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains: A strategy to improve the phenolic content of Syrah wine. *Food Chemistry: X*, 4, 100070.
- Minnaar, P. P., Ntushelo, N., Ngqumba, Z., Van Breda, V., & Jolly, N.P. (2014). Effect of *Torulaspora delbrueckii* Yeast on the Anthocyanin and Flavanol Concentrations of Cabernet franc and Pinotage Wine. *South African Journal Enology and Viticulture.*, Vol. 36, No. 1, 50-57.
- Morata, A., Benito, S., Loira, I., Palomero, 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*, 47-53.
- Oro, L., Ciani, M., & Comitini, F. (2014). Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 116(5), 1209-1217.
- Padilla, B., Gil, J.V., & Manzanares, P. (2016). Past and future of non-*Saccharomyces* yeast from spoilage microorganisms to biotechnological tools from improving wine aroma complexity. *Frontiers Microbiology* 7, 411.
- Pina, C., Santos, C., Couto, J. A., & Hogg, T. (2004). Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae*-Influence of different culture conditions. *Food Microbiology*, 21(4), 439-447.
- Pretorius, I.S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millenium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16, 675-729.





- Quirós, M., Rojas, V., González, R., & Morales, P. (2014). Selection of non-*Saccharomyces* yeast strains for reducing alcohol levels in wine by sugar respiration. *International Journal of Food Microbiology*, 181, 85-91.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2006). *Handbook of Enology, Volumen 1, The Microbiology of Wine and Vinifications*, Ed. John Wiley & Sons. 2nd Edition.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2006). *Handbook of Enology, Volumen 2, The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*, Ed. John Wiley & Sons. 2nd Edition.
- Ruiz, J., Ortega, N., Martín-Santamaría, M., Acedo, A., Marquina, D., Pascual, O., Rozès, N., Zamora, F., Santos, A., & Belda, I. (2019). Occurrence and enological properties of two new non-conventional yeasts (*Nakazawaea ishiwadae* and *Lodderomyces elongisporus*) in wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 305, 108255.
- Suárez-Lepe, J.A., Palomero, F., Benito, S., Calderón, F., & Morata, A. (2012). Oenological versatility of *Schizosaccharomyces* spp. *European Food Research and Technology* 235:375–383.
- Suárez-Lepe, J.A., Morata, A. (2015). *Levaduras para vinificación en tinto*. A. Madrid Vicente, Ediciones.
- Shekhawat, K., Bauer, F. F., & Setati, M. E. (2017). Impact of oxygenation on the performance of three non-*Saccharomyces* yeasts in co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(6), 2479-2491.
- Shi, W., Wang, J., Chen, F., & Zhang, X. (2019). Effect of *Issatchenkia terricola* and *Pichia kudriavzevii* on wine flavor and quality through simultaneous and sequential co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *LWT Food Science and Technology* 116, 108477.
- Shinohara, T., Kubodera, S., & Yanagida, F. (2000). Distribution of phenolic yeast and production of phenolic off-flavours in wine fermentation. *Journal of bioscience and bioengineering*. Vol.90, No. 1, 90-97.
- Teixeira, A., Caldeira, I., & Duarte, F. L. (2015). Molecular and oenological characterization of Touriga Nacional non-*Saccharomyces* yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 118(3), 658-671.
- Varela, C. (2016). The impact of non-*Saccharomyces* yeasts in the production of alcoholic beverages. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(23), 9861-9874.
- Varela, C., Barker, A., Tran, T., Borneman, A., & Curtin, C. (2017). Sensory profile and volatile aroma composition of reduced alcohol Merlot wines fermented with *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum*. *International Journal of Food Microbiology* 252, 1-9.
- Wang, C., Mas, A., & Esteve-Zarzoso, B. (2015). Interaction between *Hanseniaspora uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation is species and strains specific. *International Journal of Food Microbiology* 206, 67-74.
- Whitener, M.E.B., Stanstrup, J., Carlin, S., Divol, B., Du Toit, M., & Vrhovsek, U. (2017) Effect of non-*Saccharomyces* yeasts on the volatile chemical profile of Shiraz wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 23, 179-192.
- Zott, K., Miot-Sertier, C., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., & Masneuf-Pomarede, I. (2008). Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. *International Journal of Food Microbiology*, 125(2), 197-203.



ANEXOS

Levadura no-Saccharomyces	Inoculación	Variedad uva	Compuesto	Valor	Impacto en las propiedades físicas, químicas y sensoriales	Referencia
<i>Candida membranaefaciens</i>	Secuencial	Malbec	Etanol	9,40%	Menor concentración de etanol que <i>S. cerevisiae</i> (12,51 %), cuando <i>C. membranaefaciens</i> se inoculó 24 h antes que <i>S. cerevisiae</i> , temperatura de fermentación 25°C.	Maturano et al., 2019
<i>Candida zemplinina</i>	Simultánea	-	Etanol	13,64%	Menor concentración de etanol de no-Saccharomyces y que <i>S. cerevisiae</i> (13,88%) ambos con tamaño de inóculo 10 <sup>3</sup>	Comitini et al., 2011
<i>Candida stellata</i>	Única	Trebbiano	Etanol	9,09 g/100 ml	Obtuvo la menor concentración de etanol en relación a los azúcares residuales (0,07 g/l).	Gobbi et al., 2014
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Simultánea (O. oeni)	Shiraz	Etanol	12,11%	Menor concentración de etanol que <i>S. cerevisiae</i> en fermentación única (13,54 %), que <i>S. cerevisiae</i> con bacterias lácticas y fermentación simultánea con <i>M. pulcherrima</i> .	Minnar et al., 2019
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Secuencial	Malbec	Etanol	9,22%	Menor concentración de etanol que <i>S. cerevisiae</i> (12,51 %) cuando <i>H. uvarum</i> se inoculó 24 h antes, temperatura de fermentación 25°C.	Maturano et al., 2019
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Única	Trebbiano	Etanol	2,66 g/100 ml	Menor concentración de etanol que el resto de no-Saccharomyces ( <i>Z. bailii</i> , <i>C. zemplinina</i> , <i>C. stellata</i> , <i>Z. sapae</i> , <i>Z. bisporus</i> , <i>D. bruxellensis</i> , <i>S. lugwigii</i> ...) y <i>S. cerevisiae</i> . Sin embargo los azúcares residuales fueron muy altos (116,35 g/l).	Gobbi et al., 2014
<i>H. uvarum-O. oeni</i>	Simultánea	Negroamaro	Etanol	11,70%	De las 7 fermentaciones con distintas cepas de <i>H. uvarum</i> , <i>O. oeni</i> y <i>S. cerevisiae</i> autóctonas, el E fue el que obtuvo menor concentración de etanol que el resto y que <i>S. cerevisiae</i> en fermentación única (11,89 %). El azúcar residual fue menor en la fermentación simultánea (1,19 g/l) que en la única de <i>S. cerevisiae</i> (1,25 g/l)	Capozzi et al., 2019
<i>Lachancea thermotolerans</i>	Simultánea	Mosto sintético tinto	Rto Etanol	0,49/0,44-0,40-0,29 %	Datos de rendimiento etanol en anaerobiosis, 1-5-21 % oxígeno disuelto, observando una disminución del rendimiento a mayor oxígeno disuelto. En el caso de <i>S. cerevisiae</i> , la oxigenación también disminuyó el rendimiento de etanol de 0,50 en condiciones anaerobias a 0,36 con 21 % de oxígeno disuelto.	Shekhawat et al., 2017
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	Única	Mosto sintético	Etanol	10,43%	Menor concentración de etanol tanto en fermentación única como simultánea con <i>S. cerevisiae</i> . En fermentación única los azúcares residuales fueron de 1,63 g/l y en el caso de la fermentación simultánea obtuvo un grado alcohólico de 10,27 % y un azúcar residual de 2,27. En el caso de <i>S. cerevisiae</i> su grado alcohólico fue de 10,85 %.	Ruiz et al., 2019
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Simultánea	Merlot	Etanol	13,81%	Menor concentración de etanol y con el mismo azúcar residual (0,23 g/l) que <i>S. cerevisiae</i> (14,81% y 0,25 g/l azúcar residual).	Varela et al., 2017
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Simultánea	Mosto sintético tinto	Rto Etanol	0,50/0,44-0,39-0,23 %	Rendimiento de etanol en anaerobiosis, 1-5-21 % oxígeno disuelto.	Shekhawat et al., 2017
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Secuencial	Shiraz	Etanol	12,32%	Reducción de etanol en 1,7 % respecto a <i>S. cerevisiae</i> (14,08%), siendo la no-Saccharomyces con menor concentración de etanol y con 1 g/l de azúcar residual. Con tamaño de inóculo de 1x10 <sup>6</sup> tanto para <i>S. cerevisiae</i> como para <i>M. pulcherrima</i> .	Contreras et al., 2014
<i>Pichia kudriavzevii</i>	Secuencial	-	Etanol	5,60%	Menor contenido de etanol de todas las no-Saccharomyces y tratamientos. Este dato se obtuvo en el tratamiento con 10 ml/min de aireación hasta que se consumió 50 % de azúcar, pero el consumo de azúcar fue de 73,6 %. El control ( <i>S. cerevisiae</i> ) en anaerobiosis obtuvo 12,2 % v/v y con el mismo tratamiento 10,3 g etanol/g azúcar.	Contreras et al., 2015
<i>Pichia kudriavzevii</i>	Única	Touriga Nacional	Etanol	10,89%	Aunque ninguna no-Saccharomyces completó la fermentación, esta levadura produjo un nivel de alcohol bajo y unos azúcares residuales moderados (33,4 g/l de fructosa y 2,12 g/l de glucosa) y demostró un carácter más glucófilo que el resto de las no-Saccharomyces.	Teixeira et al., 2015
<i>Starmerella bacillaris</i>	Secuencial	Corvina	Etanol	11,95%	Menor concentración de etanol que <i>S. cerevisiae</i> (12,11%), <i>M. pulcherrima</i> (12,02%) y <i>L. thermotolerans</i> (11,97%) y una azúcar residual de 0,07 g/l.	Binati et al., 2020
<i>Starmerella bacillaris</i>	Secuencial	Barbera	Etanol	13,47-13,11 %	Menor concentración de etanol en todas las fermentaciones mixtas ( <i>S. bacillaris</i> - <i>S. cerevisiae</i> ) que en las puras de <i>S. cerevisiae</i> (13,96-13,71 %).	Englezos et al., 2019
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Simultánea	Mosto sintético tinto	Rto Etanol	0,49/0,46-0,46-0,23 %	Rendimiento de etanol en anaerobiosis, 1-5-21 % oxígeno disuelto, observando una disminución a mayor cantidad de oxígeno disuelto.	Shekhawat et al., 2017
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Secuencial	-	Etanol	10,6 % v/v	Menor concentración de <i>T. delbrueckii</i> en el tratamiento IV (con aireación limitada de 10 ml/min hasta que consumo 50 % de azúcar) y con un 99,7 % de azúcares consumidos, fue el grado alcohólico más bajo obtenido por no-Saccharomyces (igual que <i>Z. bailii</i> ) con un consumo elevado de azúcar.	Contreras et al., 2015
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Única	Tempranillo	Etanol	14,38%	Menor concentración de etanol que en fermentación única de <i>S. cerevisiae</i> (14,53 %).	Belda et al., 2015
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Sec. (Vend. tardía)	Shiraz	Etanol	15,50%	Menor concentración de etanol en fermentación única en vendimia tardía frente al resto de no-Saccharomyces y <i>S. cerevisiae</i> (17 %).	Hranilovic et al., 2018
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Única	Pinotage Cabernet Franc	Etanol	13,53%-15,15%	En las fermentaciones en las 2 variedades, <i>T. delbrueckii</i> obtuvo menor concentración de etanol que <i>S. cerevisiae</i> (13,64%-15,34 %) respectivamente, sin embargo la acidez volátil fue superior en ambos casos en la fermentación con la no-Saccharomyces pero en valores aceptables (0,41-0,48 g/l).	Minnar et al., 2014
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Secuencial	Rondinela	Etanol	16,81%	Menor concentración de etanol que en fermentación simultánea (17,12 %) y que <i>S. cerevisiae</i> (17,26 %). También el azúcar residual en la fermentación secuencial (5,97 g/l) fue menor que en la de <i>S. cerevisiae</i> (6,06 g/l).	Azzolini et al., 2012
<i>T. delbrueckii-L. thermotolerans</i>	Sec. (Ven. temprana)	Shiraz	Etanol	13,50%	Menor concentración de etanol en fermentación mixta con <i>T. delbrueckii</i> - <i>L. thermotolerans</i> - <i>S. cerevisiae</i> que en el resto de tratamientos con no-Saccharomyces y <i>S. cerevisiae</i> (14,1 %) en vendimia temprana.	Hranilovic et al., 2018



## Estudio del impacto de levaduras no-Saccharomyces para mejorar la calidad de vinos tintos

Universidad de Valladolid

<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Secuencial	-	Etanol	10,6 % v/v	Menor concentración de no-Saccharomyces (al igual que <i>T. delbrueckii</i> ) en el tratamiento IV (con aireación limitada de 10 ml/min hasta que consumió 50 % de azúcar) y con un 99,9 % de azúcares consumidos, fue el grado alcohólico más bajo obtenido por no-Saccharomyces (igual que <i>T. delbrueckii</i> ) con un consumo elevado de azúcar.	Contreras et al., 2015
<i>Zygorula florentina</i>	Simultánea	Folicello	Etanol	12,68%	Menor concentración de etanol que <i>S. cerevisiae</i> (13,04 %) y la cantidad de azúcar residual fue baja (3,30 g/l) incluso más bajo que <i>S. cerevisiae</i> (5,93 g/l).	Lencioni et al., 2016

**Anexo 1.** Resumen de los datos de etanol y rendimiento alcohólico obtenidos de los artículos objeto del estudio (Fuente propia).

Levadura no-Saccharomyces	Inoculación	Variedad uva	Compuesto	Valor	Impacto en las propiedades físicas, químicas y sensoriales	Referencia
<i>Hanseniaspora vineae</i>	Única	Pedro Ximenez	Glicerol	27,17 g/l	La concentración más alta de glicerol fue para <i>H. vineae</i> y la más baja para <i>T. delbrueckii</i> pura (9,69 g/l). <i>H. vineae</i> también produjo más glicerol que <i>S. cerevisiae</i> (16,83 g/l).	Maturano et al., 2012
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Secuencial	Malbec	Glicerol	11 g/l	Mayor concentración cuando <i>S. cerevisiae</i> se inoculó 72 horas más tarde, temperatura de fermentación 25°C y tamaño del inóculo 3x10 <sup>6</sup> (6) cell/mg. Fue mayor también que la fermentación secuencial de <i>C. membranaefaciens</i> .	Maturano et al., 2019
<i>Lachancea thermotolerans</i>	Simultánea	-	Glicerol	7,58 g/l	Mayor concentración de glicerol que el resto de no-Saccharomyces ( <i>C. zemplinina</i> , <i>T. delbrueckii</i> , <i>M. pulcherrima</i> ) y que <i>S. cerevisiae</i> (6,46 g/l), en todos los casos con tamaño del inóculo 10 <sup>6</sup> (3).	Comitini et al., 2011
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Única	Shiraz	Glicerol	10,51 g/l-12,56 g/l	Concentración más alta de glicerol para <i>M. pulcherrima</i> tanto en vendimia temprana como tardía en comparación con el resto de las fermentaciones de no-Saccharomyces y <i>S. cerevisiae</i> . Las más bajas fueron para <i>T. delbrueckii</i> y <i>S. cerevisiae</i> .	Hranilovic et al., 2018
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Simultánea	Merlot	Glicerol	7,83 g/l	Mayor concentración que <i>S. cerevisiae</i> (6,72 g/l) pero menor que <i>S. uvarum</i> (11,76 g/l).	Varela et al., 2017
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Secuencial	Shiraz	Glicerol	16,73 g/l	Mayor concentración de glicerol que en el resto de fermentaciones secuenciales con no-Saccharomyces ( <i>H. uvarum</i> , <i>P. kluyveri</i> , <i>T. delbrueckii</i> y <i>S. cerevisiae</i> (9,99 g/l) con tamaño de inóculo de no-Saccharomyces 5 x 10 <sup>6</sup> (6) y <i>S. cerevisiae</i> de 1x10 <sup>6</sup> (6).	Contreras et al., 2014
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Simultánea	Mosto sintético tinto	Glicerol	7,93//5,53-4,70-4,41 g/l	Disminución en 1,6 veces de la concentración de glicerol de anaerobiosis a dosificación de oxígeno al 1-5-21 %.	Shekhawat et al., 2017
<i>Starmerella bacillaris</i>	Secuencial	Corvina	Glicerol	6,30 g/l	Mayor contenido de glicerol que <i>M. pulcherrima</i> (4,97 g/l), <i>L. thermotolerans</i> (4,67 g/l) y <i>S. cerevisiae</i> (4,0 g/l).	Binati et al., 2020
<i>Starmerella bacillaris</i>	Secuencial	Barbera	Glicerol	14,94-11,45 g/l	Mayor concentración de glicerol en todas las fermentaciones mixtas ( <i>S. bacillaris</i> - <i>S. cerevisiae</i> ) que en las puras con distintas <i>S. cerevisiae</i> (9,91-7,48 g/l).	Englezos et al., 2019
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Única	Mosto sintético	Glicerol	10 g/l	Mayor concentración de glicerol que <i>S. cerevisiae</i> (8,8 g/l).	Benito et al., 2014
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Única	Cabernet Franc	Glicerol	11,03 g/l	Obtuvo mayor concentración de glicerol que <i>S. cerevisiae</i> (10,05 g/l).	Minnaar et al., 2014
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Secuencial	-	Glicerol	13,4 g/l	Mayor concentración que el resto de no-Saccharomyces ( <i>P. kudriavzevii</i> , <i>Z. Bailli</i> ) y que <i>S. cerevisiae</i> (6,9 g/l) en el tratamiento II (aireación de 5 ml/min durante las primeras 24 horas. <i>T. delbrueckii</i> también obtuvo la segunda mayor concentración de glicerol (10,8 g/l) en el tratamiento I (aireación de 5 ml/min durante toda la fermentación).	Contreras et al., 2015
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Simultánea	Mosto sintético tinto	Glicerol	6,48//6,46-1,74-1,09 g/l	Disminución en 6 veces de la concentración de glicerol de anaerobiosis a dosificación de oxígeno al 1-5-21 %.	Shekhawat et al., 2017
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Única	Viura	Glicerol	5,60 mg/l	Mostró la mayor concentración de glicerol que el resto de las no-Saccharomyces ( <i>C. zeylanoides</i> , <i>M. pulcherrima</i> , <i>T. delbrueckii</i> , <i>L. thermotolerans</i> , <i>D. Hansenii</i> ) y que <i>S. cerevisiae</i> (5,20 mg/l).	Escribano et al., 2018
<i>Zygorula florentina</i>	Simultánea	Folicello	Glicerol	6,95 g/l	Mayor concentración que en fermentación pura (5,39 g/l) pero menor que en fermentación pura de <i>S. cerevisiae</i> (7,04 g/l). Superior que en fermentaciones secuenciales (6,88 g/l y 6,32 g/l).	Lencioni et al., 2016
<i>Zygoascus hellenicus</i>	Única	Touriga Nacional	Glicerol	13,90 g/l	Mayor concentración de glicerol que el resto de las no-Saccharomyces ( <i>C. diversa</i> , <i>H. guilliermondii</i> , <i>H. opuntiae</i> , <i>P. kudriavzevii</i> , <i>P. terricola</i> , <i>S. bacillaris</i> , <i>Z. bailli</i> , <i>Z. Bisporus</i> ) y que <i>S. cerevisiae</i> (4,17 g/l).	Teixeira et al., 2015

**Anexo 2.** Resumen de los datos de glicerol obtenidos de los artículos objeto del estudio. (Fuente propia).

Levadura no-Saccharomyces	Inoculación	Variedad uva	Compuesto	Valor	Impacto en las propiedades físicas, químicas y sensoriales	Referencia
<i>Kazachstania aerobia</i>	Secuencial	Shiraz	A. superiores	0,268 mg/l-0,698 mg/l	Mayor concentración de alcohol isoamílico y alcohol fenilético que <i>S. cerevisiae</i> y el resto de las no-Saccharomyces estudiadas, autóctonas de Australia.	Man-Hsi et al., 2020
<i>Lachancea thermotolerans</i>	Única	Viura	A. superiores	32,9-124 mg/l	Mayores producciones de 1-propanol y alcohol amílico que el resto de no-Saccharomyces.	Escribano et al., 2018
<i>Lachancea thermotolerans</i>	Simultánea	-	A. superiores	320,95 mg/l	Mayor concentración que el resto de no-Saccharomyces y <i>S. cerevisiae</i> (244,19 mg/l) con tamaño de inóculo 10 <sup>7</sup> (7). El menor con el mismo tamaño de inóculo fue <i>C. zemplinina</i> (229,99 mg/l).	Comitini et al., 2011
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Secuencial	Pinot grigio	A. superiores	-	Mayor concentración de alcoholes superiores que <i>S. cerevisiae</i> y <i>S. bacillaris</i> .	Binati et al., 2020
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Simultánea	Merlot	A. superiores	232,54 mg/l	Mayor concentración de alcoholes superiores que <i>S. cerevisiae</i> (195,13 mg/l) pero inferior que <i>S. uvarum</i> (340,67 mg/l).	Varela et al., 2017
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Única	Viura	A. superiores totales	272 mg/l	Mayor productor de alcoholes superiores totales en comparación al resto de no-Saccharomyces y <i>S. cerevisiae</i> (264 mg/l). Mayor concentración también de isobutanol y 2-fenil etanol que <i>S. cerevisiae</i> .	Escribano et al., 2018



## Estudio del impacto de levaduras no-Saccharomyces para mejorar la calidad de vinos tintos

Universidad de Valladolid

<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Secuencial (S.pombe)	Tempranillo	A. superiores	491 mg/l	Mayor concentración de alcoholes superiores con tratamiento de proclanidina C1 en coinoculación con <i>S. pombe</i> comparando con el resto de fermentaciones secuenciales con no-Saccharomyces ( <i>L. thermotolerans</i> , <i>T. delbrueckii</i> , <i>M. pulcherrima</i> ). El segundo con más concentración fue en este mismo tratamiento en la fermentación secuencial de <i>L. thermotolerans</i> con <i>S. cerevisiae</i> (476 mg/l).	Escott et al., 2018
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Única	Shiraz	A. superiores	957,8 mg/l	Mayor concentración de alcoholes superiores totales en vendimia tardía.	Hranilovic et al., 2018

**Anexo 3.** Resumen de los datos de alcoholes superiores obtenidos de los artículos objeto del estudio. (Fuente propia).

Levadura no-Saccharomyces	Inoculación	Variedad uva	Compuesto	Valor	Impacto en las propiedades físicas, químicas y sensoriales	Referencia
<i>H. uvarum-O. oeni</i>	Simultánea	Negroamaro	A. acético	0,27 g/l	Menor concentración de a. acético en fermentación mixta con no-Saccharomyces y bacteria láctica (en 5 de 7 fermentaciones) que con fermentación única de <i>S. cerevisiae</i> (0,33 g/l) y con fermentaciones mixtas sin bacteria.	Capozzi et al., 2019
<i>Hanseniaspora vineae</i>	Única	Pedro Ximenez	A. acético	0,34 g/l	Menor concentración de a. acético por <i>H. vineae</i> , la mayor la obtuvo <i>T. delbrueckii</i> (1,43 g/l) en fermentación única y respecto a las fermentaciones secuenciales también la que obtuvo mayor concentración fue en la que estuvo presente <i>T. delbrueckii</i> (0,83 g/l). <i>S. cerevisiae</i> tuvo una concentración de 0,66 g/l, similar a las fermentaciones mixtas con <i>H. vineae</i> (0,64-0,68 g/l) y <i>T. delbrueckii</i> (0,83-0,63 g/l).	Maturano et al., 2012
<i>Lachancea thermotolerans</i>	Secuencial	Merlot	A. total	6,4 g/l	Mayor contenido de a. total sin tratamiento de tanino enológico que <i>M. pulcherrima</i> (5,2 g/l), <i>T. delbrueckii</i> (5,3 g/l) y <i>S. cerevisiae</i> (5,6 g/l). También obtuvo mayor a. total con tratamiento de tanino (6,1 g/l) al igual que <i>M. pulcherrima</i> .	Chen et al., 2018
<i>Lachancea thermotolerans</i>	Secuencial	Merlot	A. málico	1,70 g/l	Incremento un 13 % con adición de tanino enológico, levadura que produce ácido láctico. El resto de levaduras tuvieron entre 0-0,4 g/l de a. láctico.	Chen et al., 2018
<i>Lachancea thermotolerans</i>	Simultánea	-	A. total	9,20 g/l	Mayor concentración de a. total que el resto de no-Saccharomyces y <i>S. cerevisiae</i> (7,02 g/l) en todos los casos con tamaño de inóculo 10 (3). Disminución de pH (2,90) sin aumento de acidez volátil (0,40 g/l).	Comitini et al., 2011
<i>Lachancea thermotolerans</i>	Secuencial	Marzemino	A. láctico	0,53 g/l	Levadura que contribuye a la producción de ácido láctico, más que <i>S. cerevisiae</i> (0,15 g/l).	Binati et al., 2020
<i>Lachancea thermotolerans</i>	Única	Viura	A. total	5,70 g/l	Levadura que más acidez total produjo en comparación al resto de no-Saccharomyces y <i>S. cerevisiae</i> (3,55 g/l).	Escribano et al., 2018
<i>Lachancea thermotolerans</i>	Única	Shiraz	A. málico	0,25 g/l	Menor concentración de a. málico que <i>C. zemplinina</i> , <i>Pichia kluyveri</i> , <i>M. pulcherrima</i> , <i>T. delbrueckii</i> y <i>S. cerevisiae</i> (0,32 g/l).	Whitener et al., 2017
<i>Lachancea thermotolerans</i>	Única	Shiraz	A. málico	1,49 g/l	Menor concentración de a. málico tanto en vendimia temprana como tardía. En vendimia temprana 48 % menos de ácido málico que <i>S. cerevisiae</i> (3,09 g/l).	Hranilovic et al., 2018
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	Única	-	A. acético	0,39 g/l	Menor concentración de a. acético que <i>S. cerevisiae</i> (0,78 g/l) y en fermentación mixta de esta no-Saccharomyces con <i>S. cerevisiae</i> (0,72 g/l), además en fermentación única completó la fermentación.	Ruiz et al., 2019
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	Única	-	A. málico	2,40 g/l	Obtuvo la menor concentración de a. málico en comparación con las fermentaciones mixtas y <i>S. cerevisiae</i> (3,50 g/l).	Ruiz et al., 2019
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Simultánea	-	A. acético	0,30 g/l	Menor concentración de a. acético que el resto de las no-Saccharomyces y <i>S. cerevisiae</i> (0,46 g/l). El mayor contenido lo obtuvo <i>C. zemplinina</i> en fermentación secuencial (0,52 g/l). Todos los valores fueron aceptables.	Comitini et al., 2011
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Simultánea	Merlot	A. acético	0,15 g/l	Misma concentración de a. acético que <i>S. cerevisiae</i> teniendo en cuenta que en fermentación mixta <i>M. pulcherrima</i> completó la fermentación con menor grado.	Varela et al., 2017
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Secuencial	Shiraz	A. succínico	3,23 g/l	Mayor concentración de las no-Saccharomyces pero fue superior en la fermentación única de <i>S. cerevisiae</i> (3,53 g/l).	Contreras et al., 2014
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Simultánea	Merlot	A. succínico	0,79 g/l	Mayor producción de a. succínico que <i>S. cerevisiae</i> (0,53 g/l) pero menor que <i>S. uvarum</i> (2,02 g/l).	Varela et al., 2017
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Simultánea	Mosto sintético tinto	A. acético	0,69/1,44-2,06-2,05 g/l	Menor concentración de a. acético en fermentación mixta y anaerobiosis pero incrementó en condiciones de oxigenación controlada.	Shekhawat et al., 2017
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Única	Mosto sintético	A. acético	0,24 g/l	En anaerobiosis, sin adición de oxígeno y fermentación única de <i>M. pulcherrima</i> se obtuvo la menor concentración de a. acético en comparación con el resto de las fermentaciones, incluso menos que <i>S. cerevisiae</i> en condiciones de anaerobiosis y sin oxígeno (1,06 g/l).	Shekhawat et al., 2017
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Secuencial	Shiraz	A. acético	0,04 g/l	Menor concentración de a. acético para <i>M. pulcherrima</i> en fermentación secuencial en 2 tratamientos con diferente tamaño de inóculo de no-Saccharomyces, inoculando <i>S. cerevisiae</i> cuando se ha consumido el 50 % del azúcar. <i>S. cerevisiae</i> en fermentación única obtuvo 0,35 g/l y 0,08 g/l en diferentes momentos de inoculación, el primero a tiempo 0 y el segundo cuando se había consumido el 50 % de azúcar.	Contreras et al., 2014
<i>Starmerella bacillaris</i>	Secuencial	Barbera	A. total	8,26-7,07 g/l	Levadura que influyó en el pH y acidez total, aumentando hasta 1 g/l de acidez total respecto a las fermentaciones puras de <i>S. cerevisiae</i> (7,11-6,68 g/l).	Englezos et al., 2019
<i>Starmerella bacillaris</i>	Secuencial	Barbera	A. acético	0,10-0,16 g/l	Menor contenido de a. acético en todas las fermentaciones mixtas ( <i>S. bacillaris</i> - <i>S. cerevisiae</i> ) que en las fermentaciones puras con distintas <i>S. cerevisiae</i> (0,16-0,34 g/l), pero en ambos casos dentro de valores normales.	Englezos et al., 2019
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Única	Merlot	A. total	3,9 g/l	Obtuvo la menor concentración de acidez total en comparación con otras no-Saccharomyces ( <i>M. pulcherrima</i> , <i>T. delbrueckii</i> , <i>L. thermotolerans</i> ) y que <i>S. cerevisiae</i> (5,6 g/l), podría ser útil para disminuir la acidez en regiones frías.	Chen et al., 2018
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Única	Mosto sintético	A. málico	-	Levadura que degrada ácido málico, algunas cepas degradan hasta el 62 %.	Benito et al., 2014
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Simultánea	Mosto sintético tinto	A. acético	0,71 g/l-1,03g/l	Menor producción de a. acético con anaerobiosis controlada de 1 y 5 % que <i>L. thermotolerans</i> (2,03 g/l) y <i>M. pulcherrima</i> (1,44-2,06 g/l) en fermentación secuencial y <i>S. cerevisiae</i> en fermentación única y anaerobiosis (1,06 g/l). <i>T. delbrueckii</i> obtuvo niveles no deseables de a. acético con 21 % de oxígeno (2,06 g/l).	Shekhawat et al., 2017





## Estudio del impacto de levaduras no-Saccharomyces para mejorar la calidad de vinos tintos

Universidad de Valladolid

<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Única	Shiraz	A. acético	0,27 g/l	Menor concentración de a. acético de todas las fermentaciones de no-Saccharomyces y <i>S. cerevisiae</i> . En este caso el valor corresponde a vendimia tardía. La mayor fue <i>L. thermotolerans</i> (0,66 g/l) y para <i>S. cerevisiae</i> en vendimia tardía 0,56 g/l y en vendimia temprana 0,35 g/l.	Hranilovic et al., 2018
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Secuencial	Merlot	A. acético	0,06 g/l	Menor concentración de a. acético que <i>L. thermotolerans</i> (0,16 g/l), <i>M. pulcherrima</i> (0,17 g/l), <i>S. cerevisiae</i> (0,19 g/l). <i>S. pombe</i> 938 fue la que mayor obtuvo con 0,73 g/l. En todos los casos sin tratamiento de tanino enológico.	Chen et al., 2018
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Única	Shiraz	A. acético	0,38 g/l	Menor concentración de a. acético que el resto de no-Saccharomyces ( <i>C. zemplinina</i> , <i>K. aerobia</i> , <i>L. thermotolerans</i> , <i>M. pulcherrima</i> y <i>P. kluyveri</i> ) y que <i>S. cerevisiae</i> (0,42 g/l).	Whitener et al., 2017
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Secuencial	Rondinela	A. acético	0,44 g/l	Menor concentración de a. acético que en fermentación simultánea (0,43 g/l) y que <i>S. cerevisiae</i> (0,47 g/l).	Azzolini et al., 2012
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Secuencial	-	A. málico	0,3 g/l	Consumo más ácido málico en el tratamiento III (aireación de 5 ml/min hasta el 50 % del consumo de azúcares que es cuando se inoculó <i>S. cerevisiae</i> ) que el resto de no-Saccharomyces y que <i>S. cerevisiae</i> (2,4 g/l). En todos los tratamientos los valores más bajos de a. málico fueron por parte de no-Saccharomyces.	Contreras et al., 2015
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Secuencial	-	A. succínico	5 g/l	Mayor concentración que el resto de no-Saccharomyces de a. succínico en el tratamiento II (aireación controlada de 5 ml/min durante las primeras 24 horas) que <i>S. cerevisiae</i> (1,3 g/l). El siguiente con mayor concentración lo obtuvo <i>T. delbrueckii</i> en este mismo tratamiento (3,6 g/l).	Contreras et al., 2015
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Única	Viura	A. succínico	0,702 mg/l	Mayor productor de a. succínico que el resto de no-Saccharomyces y <i>S. cerevisiae</i> . Contribuye de forma positiva a la acidez total.	Escribano et al., 2018
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Secuencial	-	A. acético	0,1 g/l	Menor concentración de a. acético de todas las no-Saccharomyces ( <i>T. delbrueckii</i> y <i>P. kudriavzevii</i> ) y <i>S. cerevisiae</i> . Este dato se obtuvo en el tratamiento I (aireación de 5 ml/min durante toda la fermentación) y en el <i>S. cerevisiae</i> produjo 1 g/l de a. acético. En todos los tratamientos ninguna no-Saccharomyces superó los 0,8 g/l ( <i>T. delbrueckii</i> ) en tratamiento I que fue el mayor dato de las no-Saccharomyces pero sin embargo la máxima concentración de a. acético la obtuvo <i>S. cerevisiae</i> .	Contreras et al., 2015
<i>Zygorula florentina</i>	Única/Simultánea	Folicello	A. acético	0,29-0,32 g/l	Menor concentración de a. acético que en fermentación secuencial (0,42-0,43 g/l) y que <i>S. cerevisiae</i> en fermentación única (0,44 g/l).	Lencioni et al., 2016

**Anexo 4.** Resumen de los datos de ácidos obtenidos de los artículos objeto del estudio. (Fuente propia).

Levadura no-Saccharomyces	Inoculación	Variedad uva	Compuesto	Valor	Impacto en las propiedades físicas, químicas y sensoriales	Referencia
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Secuencial	Pinot noir	Terpenos	-	Incrementó la concentración de terpenos.	Hu et al., 2016
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Secuencial ( <i>S. pombe</i> )	Tempranillo	Esteres	299 mg/l	Mayor producción de ésteres de todos los tratamientos, en este caso siendo el superior en el tratamiento con proclanidina C1 en fermentación secuencial con <i>S. pombe</i> . <i>M. pulcherrima</i> también obtuvo la mayor concentración de acetato de etilo en este tratamiento (196 mg/l).	Escott et al., 2018
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Simultánea	Merlot	Esteres	4,59 mg/l	Mayor concentración de acetato de etilo (52,25 mg/l) y ésteres totales, también más que <i>S. cerevisiae</i> (3,69 mg/l).	Varela et al., 2017
<i>Nakazawaea ishii</i>	Única	-	Polisacáridos	800 mg/l	Gran liberación de polisacáridos aunque no pudo terminar la fermentación ya que tuvo 80,93 g/l de azúcar residual.	Ruiz et al., 2019
<i>Pichia fermentans</i>	Única	Mosto sintético	Polisacáridos	170 mg/g de peso seco	Mayor liberación de polisacáridos que el resto de no-Saccharomyces ( <i>L. thermotolerans</i> , <i>M. pulcherrima</i> , <i>T. delbrueckii</i> , <i>S. ludwigii</i> ...) y <i>S. cerevisiae</i> (60 mg/g de peso seco).	Domizio et al., 2014
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Única	Shiraz	A. isoamilo	2,283 mg/l	Mayor concentración de acetato de isoamilo en vendimia tardía.	Hranilovic et al., 2018
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Simultánea	-	Polisacáridos	308 mg/l	Mayor concentración que el resto de no-Saccharomyces y que <i>S. cerevisiae</i> (68 mg/l) con tamaño de inóculo 10 <sup>3</sup> .	Comitini et al., 2011
<i>Zygorula florentina</i>	Única	Folicello	Polisacáridos	218,6 mg/l	Mayor concentración de polisacáridos totales que en fermentación mixta (135,2 mg/l) y secuencial (156,1-157,3 mg/l) y que <i>S. cerevisiae</i> en fermentación única (100,3 mg/l).	Lencioni et al., 2016

**Anexo 5.** Resumen de los datos de compuestos aromáticos y polisacáridos obtenidos de los artículos objeto del estudio. (Fuente propia).

Levadura no-Saccharomyces	Inoculación	Variedad uva	Compuesto	Valor	Impacto en las propiedades físicas, químicas y sensoriales	Referencia
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Secuencial	Shiraz	Polifenoles totales	191,74 mg/l	Mayor concentración de compuestos fenólicos totales en la fermentación mixta con <i>H. uvarum</i> , <i>S. cerevisiae</i> y <i>L. plantarum</i> que el resto de las co-inoculaciones secuenciales y <i>S. cerevisiae</i> (140,11 mg/l).	Minnar et al., 2019
<i>Lachancea thermotolerans</i>	Secuencial ( <i>S. pombe</i> )	Tempranillo	Color	83,8 mg/l	Mayor producción de pigmentos totales (antocianinas y piranoantocianinas) de todos los tratamientos y fermentaciones secuenciales de no-Saccharomyces lo obtuvo <i>L. thermotolerans</i> en el tratamiento de proclanidina C1.	Escott et al., 2018
<i>Lachancea thermotolerans</i>	Secuencial	Tempranillo	Vitisinas	1,29 mg/l	Mayor concentración de vitisinas de todos los tratamientos con tratamiento de proclanidina C1.	Escott et al., 2018
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Única	Merlot	Color	420,9 mg/l	Mayor concentración de antocianinas.	Varela et al., 2017
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Única	Shiraz	Antocianinas	644 mg/l	Mayor concentración de antocianinas, en vendimia temprana respecto al resto de fermentaciones no-Saccharomyces y <i>S. cerevisiae</i> (615 mg/l).	Hranilovic et al., 2018
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Única	Pinotage	Color	-	Mayor concentración de antocianinas y flavanoles que <i>S. cerevisiae</i> , sin embargo <i>S. cerevisiae</i> obtuvo el mayor contenido de antocianinas totales.	Minnar et al., 2014
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Única	Cabernet Franc	Color	-	Mayor concentración de antocianina glucósido, flavanol y antocianinas totales.	Minnar et al., 2014
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Única	Tempranillo	Intensidad de color	3,16	Incrementó la intensidad de color, respecto a <i>T. delbrueckii</i> en fermentación simultánea, secuencial y <i>S. cerevisiae</i> en fermentación única (2,77), la impresión general y la calidad del aroma.	Belda et al., 2015
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Única	Merlot	Color	-	Aumenta el nivel de piranoantocianina vinilfenólica.	Chen et al., 2018

**Anexo 6.** Resumen de los datos de compuestos relacionados con el color obtenidos de los artículos objeto del estudio. (Fuente propia).





## ABREVIATURAS

- C. membranaefaciens*: *Candida membranaefaciens*  
*C. stellata*: *Candida stellata*  
*C. zemplinina*: *Candida zemplinina* (Sinónimo de *S. bacillaris*)  
*C. zeylanoides* : *Candida zeylanoides*  
*D. hansenii* : *Debaryomyces hansenii*  
*H. uvarum*: *Hanseniaspora uvarum*  
*H. guilliermondii*: *Hanseniaspora guilliermondii*  
*H. anomala*: *Hansenula anomala*  
*H. clermontiae* : *Hanseniaspora clermontiae*  
*H. opuntiae* : *Hanseniaspora opuntiae*  
*H. valbyensis* : *Hanseniaspora valbyensis*  
*H. vinae*: *Hanseniaspora vinae*  
*K. aerobia* : *Kazachstania aerobia*  
*K. servazzii* : *Kazachstania servazzii*  
*K. apiculata*: *Kloeckera apiculata*  
*K. lactis*: *Kluyveromyces lactis*  
*K. marxianus*: *Kluyveromyces marxianus*  
*L. elongisporus*: *Lodderomyces elongisporus*  
*L. thermotolerans*: *Lachancea thermotolerans*  
*M. pulcherrima*: *Metschnikowia pulcherrima*  
*N. ishiwadae*: *Nakazawaea ishiwadae*  
*O. oeni*: *Oenococcus oeni*  
*P. anomala*: *Pichia anomala*  
*P. fermentans*: *Pichia fermentans*  
*P. guilliermondii* : *Pichia guilliermondii*  
*P. kudriavzevii* : *Pichia kudriavzevii*  
*P. membranefaciens* : *Pichia membranefaciens*  
*R. mucilaginosa* : *Rhodotorula mucilaginosa*  
*S. bacillaris* : *Starmerella bacillaris*  
*S. cerevisiae*: *Saccharomyces cerevisiae*  
*S. ludwiggi*: *Saccharomycodes ludwiggi*  
*S. pombe*: *Schizosaccharomyces pombe*  
*T. delbrueckii* : *Torulaspora delbrueckii*  
*W. anomalus* : *Wickerhamomyces anomalus*  
*W. pratensis* : *Williopsis pratensis*  
*Z. hellenicus* : *Zygoascus hellenicus*  
*Z. bailii*: *Zygosaccharomyces bailii*  
*Z. bisporus* : *Zygosaccharomyces bisporus*  
*Z. florentina*: *Zygotorulaspora florentina*  
*Z. florentinus*: *Zygosaccharomyces florentinus*