



Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

Grado en Enología

**Evaluación del potencial biotecnológico de
Aureobasidium pullulans en la elaboración de vino**

Alumno

Espinosa Hernández, Adrián

Tutora

Ruipérez Prádanos, Violeta

Palencia, 2022

Índice

1. Resumen.....	3
2. Introducción	4
2.1. <i>Aureobasidium pullulans</i>	4
2.2. Actividad enzimática. β -glucosidasa.....	5
3. Justificación y objetivos	7
4. Material y métodos	8
4.1. Microorganismos	8
4.1.1. <i>Aureobasidium pullulans</i>	8
4.1.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
4.1.3. Conservación y cultivo de los microorganismos	8
4.1.4. Multiplicación y cuantificación de los microorganismos	8
4.2. Medios de cultivo	9
4.2.1. Medio YPD agar	9
4.2.2. Medio YPD líquido	9
4.2.3. Medio β -glucosidasa	9
4.2.4. Mosto concentrado.....	10
4.2.5. Mosto Verdejo.....	10
4.3. Microvinificaciones	10
4.3.1. Coinoculación simultánea.....	10
4.3.2. Coinoculación secuencial.....	11
4.3.3. Mosto Verdejo.....	11
4.3.4. Análisis químicos	12
4.3.5. Aromas	13
4.3.6. Tratamiento estadístico de datos	13
5. Resultados.....	13
5.1. Microvinificaciones en mosto concentrado	13
5.2. Microvinificación en Verdejo	18
5.2.1. Cinética fermentativa.....	19
5.2.2. Análisis fisicoquímicos	20
5.2.3. Estudio de la composición aromática.....	21
6. Conclusiones.....	27
7. Bibliografía.....	28
8. Anexos	31

1. Resumen

Desde hace unos años se está estudiando el efecto en el proceso fermentativo de la coinoculación de *Saccharomyces cerevisiae* con otros microorganismos como levaduras no-*Saccharomyces* o bacterias lácticas, prestando atención a aspectos como la competencia entre los diferentes microorganismos y las modificaciones sobre el producto final.

Aureobasidium pullulans, un hongo con una interesante actividad enzimática, está presente de manera natural en suelos de las zonas templadas del planeta. Es competidor natural de microorganismos como *Botrytis cinerea*, *Erwinia amylovora* o *Penicillium* sp., siendo aplicado en algunos casos como tratamiento preventivo en viñedo y otros cultivos de frutales. Se desarrolla en la pruina de la uva y puede aparecer en el mosto recién extraído y permanecer durante los primeros días de la fermentación.

En el presente trabajo se estudia la interacción entre *Saccharomyces cerevisiae* y *Aureobasidium pullulans* en la fermentación de mosto de uva, evaluando en primer lugar la cinética fermentativa en un mosto concentrado y posteriormente, la fermentación en mosto de la variedad Verdejo, analizando al finalizar el vino obtenido y la producción de aromas.

Abstract

For some years now, the effect on the fermentative process of the coinoculation of *Saccharomyces cerevisiae* with other microorganisms such as non-*Saccharomyces* yeasts or lactic bacteria has been studied, paying attention to aspects such as competition between the different microorganisms and changes in the final product.

Aureobasidium pullulans, a fungus with an interesting enzymatic activity, is naturally present in soils of the temperate zones of the planet. It is a natural competitor of microorganisms such as *Botrytis cinerea*, *Erwinia amylovora* or *Penicillium* sp., being applied in some cases as a preventive treatment in vineyards and other fruit crops. It develops in the bloom of the grape and can appear in the freshly extracted must and remain during the first days of fermentation.

In the present work, the interaction between *Saccharomyces cerevisiae* and *Aureobasidium pullulans* in the fermentation of grape must is studied, evaluating firstly the fermentation kinetics in a concentrated must and later, the fermentation in must of the Verdejo variety, analyzing at the end of the wine obtained and the production of aromas.

2. Introducción

La fermentación alcohólica es el proceso por el que las levaduras transforman el mosto de uva en vino. Consumen los azúcares del mosto y liberan etanol y dióxido de carbono, además de numerosos metabolitos secundarios que aportan diversas cualidades organolépticas (Liu et al., 2016). Además de levaduras, al inicio de la fermentación existen en el mosto gran cantidad de microorganismos (levaduras no-*Saccharomyces*, mohos, bacterias, etc.) que compiten por establecerse en el medio (Barata et al., 2012a).

La mayoría de los microorganismos que pasan de la naturaleza al mosto residen en la pruina, la capa cerosa que recubre las uvas (Lorenzini et al., 2019). Se ha estudiado la población microbiana de las uvas y se ha observado que la variedad de microorganismos y su abundancia depende del estado fenológico, de la sanidad del racimo y de la disponibilidad de nutrientes. Se han encontrado levaduras basidiomicetas (*Cryptococcus* spp., *Rhodotorula* spp., *Sporobolomyces* spp.), levaduras ascomicetas oxidativas (*Candida* spp., *Hanseniaspora* spp., *Metschnikowia* spp., *Pichia* spp.), levaduras peligrosas para la calidad del vino (*Zygosaccharomyces* spp., *Torulaspota* spp.), bacterias acéticas (*Gluconobacter* spp., *Acetobacter* spp.), hongos filamentosos (*Botrytis cinerea*, *Aspergillus* spp.), levaduras fermentativas (*Saccharomyces cerevisiae*) y hongos *yeast-like* (*Aureobasidium pullulans*) (Barata et al., 2012a).

La presencia de hongos filamentosos, especialmente aquellos más infecciosos, como *Botrytis* y *Penicillium*, afecta a la estructura de la comunidad de levaduras (Nisiotou et al., 2007a) y pueden estar presentes en el mosto, afectando a la calidad de los vinos producidos, provocando alteraciones en la fermentación e incluso llegando a pararla en los casos más graves (Nisiotou et al., 2007b). En muchas ocasiones, el desarrollo de estos microorganismos infecciosos se ve beneficiado por daños físicos en las bayas y por las condiciones meteorológicas, provocando infecciones mayores, desaparición de comunidades microbianas e incluso podredumbre del racimo. (Nisiotou et al., 2007b).

2.1. *Aureobasidium pullulans*

El microorganismo objeto de este estudio es *Aureobasidium pullulans*, un hongo *yeast-like* saprófito, de los más extendidos y adaptados a nivel mundial, con una extrema variabilidad e inestabilidad genética. Esto supone que podamos encontrar una gran variabilidad morfológica entre cepas (Schena et al., 1999). También le permite adaptarse a un gran número de situaciones para reducir el estrés al que se ve sometido (Gostinčar et al., 2008).

La presencia y utilidad de *A. pullulans* ha sido estudiada en varias investigaciones. Se ha encontrado en uvas marchitas y afectadas por otros microorganismos (Barata et al., 2012b), pudiendo en muy escasas ocasiones causar podredumbre en las uvas por sí mismo (Lorenzini et al., 2015). También es muy común en la filosfera y carposfera de cultivos hortofrutícolas y tiene una potencial acción de defensa frente a hongos fitopatógenos (Barata et al. 2012; Rathnayake et al., 2018), como *Botrytis cinerea*, que es responsable de disminuir la producción y calidad cuando causa podredumbre en los racimos (Don et al., 2020).

Dicha capacidad de defensa ha sido evaluada en numerosos estudios, comprobando que generalmente es debida a que ocupa el nicho de otros microorganismos perjudiciales, compitiendo por el espacio y los nutrientes (Nisiotou et al., 2007a; Pantelides et al., 2015).

Dado que se ha comprobado que los beneficios de *A. pullulans* en la defensa contra microorganismos perjudiciales son mayores a los escasos inconvenientes que podría presentar (Schena et al., 1999), lleva un tiempo siendo utilizado como herramienta biotecnológica en la lucha contra enfermedades de viñedo y otros cultivos frutales (Don et al., 2020), con el inconveniente de que a diferencia de los productos químicos fitosanitarios, debe implantarse y prosperar en la superficie de las plantas para resultar efectivo (Bozoudi et al., 2018).

Además de por su utilidad en la lucha contra enfermedades de viñedo, *A. pullulans* destaca por su capacidad de producir diferentes enzimas, sideróforos y pululanos (Chi et al., 2009). Para el presente trabajo vamos a centrarnos en una enzima concreta, la β -glucosidasa.

2.2. Actividad enzimática. β -glucosidasa

La β -glucosidasa es una enzima del grupo de las glucosidasas, encargadas de catalizar la hidrólisis de enlaces glucosídicos. Concretamente, la β -glucosidasa escinde los enlaces β -glucosídicos en disacáridos o moléculas sustituidas con glucosa, actuando sobre los enlaces $\beta 1 \rightarrow 4$ (Jeng et al., 2011).

En el vino, parte de los compuestos aromáticos que definen su perfil organoléptico están inmovilizados, unidos a azúcares formando glucósidos. Estos compuestos definen el carácter varietal de los vinos, habitualmente con aromas frutales, florales o vegetales. La β -glucosidasa es capaz de aumentar la proporción de estos compuestos en el vino, al liberarlos rompiendo los enlaces glucosídicos (Fernández-Pacheco et al., 2021).

Dado que la actividad β -glucosidasa de *S. cerevisiae* es prácticamente inexistente, al terminar la vinificación, parte de los glucósidos aún permanecen en el vino, sin aportar aromas (Villena, 2005; Zhu et al., 2014).

Se ha estudiado la forma de incrementar la cantidad de β -glucosidasa disponible en el mosto o en el vino para liberar compuestos aromáticos (Kang et al., 2012). Ciertas variedades tienen de manera natural mayor concentración de terpenos, como Moscatel, Riesling, Gewürztraminer, Macabeo, Airén y Albariño, por lo que pueden ver más incrementados los aromas que otras variedades al utilizar la β -glucosidasa. Variedades como Verdejo o Sauvignon blanc tienen baja concentración de terpenos, mientras que en otras como Chardonnay es prácticamente nula (Villena et al. 2007).

Autores como Zhu et al. (2014), han extraído β -glucosidasa de cepas de *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus niger*, y han estudiado la modificación aromática que producía en vinos de Cabernet sauvignon. Consiguieron un incremento significativo en los siguientes compuestos: formiato de 3-metil-1-butanol, 3-pentanol, furfural, ácido 3-metil-butanoico, ácido 2-metil-butanoico, éster etílico del ácido 3-hidroxi-butanoico, ácido hexanoico, éster etílico del ácido hexanoico, alcohol bencílico, ácido octanoico, éster etílico de ácido octanoico y éster etílico del ácido dodecanoico. Al analizar sensorialmente los vinos se determinó que la intensidad aromática era más alta.

Se ha estudiado la utilización de β -glucosidasa comercial inmovilizada en perlas de alginato de sodio en vinos acabados. Aumentó la cantidad de compuestos aromáticos terpénicos en el vino y su intensidad aromática, además de que se pudo reutilizar la enzima inmovilizada siete veces sin apenas pérdida de actividad enzimática (Fernández-Pacheco et al., 2021).

En el estudio de Villena et al. (2007) comprobaron que algunas levaduras no-*Saccharomyces* son capaces de producir β -glucosidasa y liberarla en el mosto, aumentando la cantidad de terpenos en el vino final. Destacan *Debaryomyces pseudopolymorphus*, *Hanseniaspora uvarum*, *Candida oleófila*, *Debaryomyces polymorphus* y *Brettanomyces* spp, siendo la primera la mayor productora de enzimas β -glucosidasa. Estas levaduras están siempre presentes durante las primeras etapas de la fermentación, pero debido a las condiciones extremas del mosto (pH bajo, altas concentraciones iniciales de azúcar, conversión en etanol, adición de anhídrido sulfuroso como antioxidante, condiciones anaeróbicas), solo las levaduras mejor adaptadas sobreviven hasta el final del proceso de vinificación; *Saccharomyces cerevisiae* desplaza gradualmente a otras levaduras hasta imponerse sobre las demás (Villena, 2005).

Otros autores han inoculado *A. pullulans* junto con *S. cerevisiae* en mosto y estudiado sus efectos. Por un lado, se ha comprobado que *A. pullulans* es capaz de sobrevivir en el mosto en las primeras etapas de la fermentación, pero puede tener un efecto antagónico sobre las levaduras a través de competencia por metales como Fe y Zn (Onetto et al., 2020). Por otro lado, se ha conseguido una mejora de color y reducción de turbidez en vino tinto de la variedad Malbec, junto con un aumento de compuestos aromáticos como terpenos (Merín et al., 2018).

3. Justificación y objetivos

Estudios previos realizados en el laboratorio de microbiología de la Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias de Palencia (ETSIIAA), donde aisló este microorganismo en mosto recién estrujado, demuestran la capacidad de *A. pullulans* de producir enzima β -glucosidasa, así como otras características de interés enológico (De la Higuera, 2022).

El objetivo de este estudio es evaluar el desarrollo de la fermentación alcohólica y la influencia en el vino final al coinocular *S. cerevisiae* y *A. pullulans*. Para esto se plantean los siguientes objetivos:

- Estudio del comportamiento fermentativo en mosto concentrado:
 - Coinoculación simultánea de *S. cerevisiae* y *A. pullulans*.
 - Coinoculación secuencial, inoculando en primer lugar *A. pullulans* y 48 horas después *S. cerevisiae*.
- Estudio en mosto Verdejo:
 - Inoculación secuencial de *A. pullulans* y *S. cerevisiae* y seguimiento de la fermentación.
 - Estudio de las características finales del vino fermentado.

4. Material y métodos

4.1. Microorganismos

4.1.1. *Aureobasidium pullulans*

Se han utilizado nueve aislados procedentes de uva de la variedad Tempranillo, vendimiada en Pesquera de Duero en 2021. Estos microorganismos se aislaron en un estudio previo en el laboratorio de microbiología de la ETSIAA. Cada muestra se ha identificado numéricamente del 1 al 9.

4.1.2. *Saccharomyces cerevisiae*

Para realizar la fermentación del mosto en las diferentes vinificaciones de este estudio se ha empleado la cepa WAM de la casa comercial Lallemand. Esta cepa de *S. cerevisiae* procedente de la D.O. Rueda fue aislada en la ETSIAA en 1998. Nos referiremos a ella como WAM en este estudio.

4.1.3. Conservación y cultivo de los microorganismos

Los microorganismos utilizados en el estudio se mantuvieron en tubos con medio YPD sólido a 4°C para su conservación. Antes de su inoculación en el mosto se sembraron en placas de Petri en medio YPD para disponer de un *stock* de microorganismos al que recurrir en cada siembra. Los aislados 1, 4, 5, 6 y 9 mostraron un mayor crecimiento que los demás.

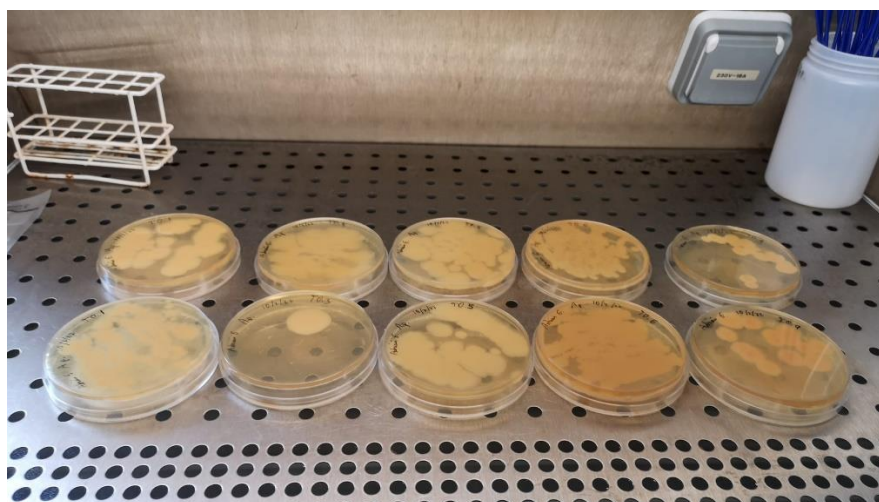


Figura 1. Crecimiento de *A. pullulans* en medio YPD

4.1.4. Multiplicación y cuantificación de los microorganismos

Antes de inocular los matraces con los microorganismos, se multiplicaron en tubos de ensayo estériles con medio YPD líquido durante 48 horas a 26°C. Para determinar la concentración de microorganismos e inocular cada matraz con la concentración deseada, se empleó la técnica de turbidimetría. Este método consiste en determinar la turbidez de una serie de patrones de sulfato de bario a una longitud de onda de 600 nm empleando un espectrofotómetro (Thermo Scientific™ UV-Vis Genesys™ 150). Al medir la turbidez del medio YPD líquido donde se han multiplicado los organismos, se estima el número de unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL) de la muestra para calcular el volumen necesario a inocular en cada matraz.

4.2. Medios de cultivo

4.2.1. Medio YPD agar

El medio YPD (Yeast extract-Peptone-Dextrose o extracto de levadura-peptona-dextrosa) sólido es un medio de cultivo de microorganismos. Se utilizó para crear un *stock* de los microorganismos utilizados en el estudio.

Extracto de levadura	10 g/L
Peptona	20 g/L
Glucosa	20 g/L
Agar	15 g/L

Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos antes de repartirlo en placas Petri estériles en la cabina de flujo laminar, para evitar contaminaciones.

4.2.2. Medio YPD líquido

Medio muy similar al anterior con la diferencia de no contener agar, lo que lo mantiene líquido. Se utilizó en tubos de ensayo para multiplicar los microorganismos inoculados en los matraces para las vinificaciones.

Extracto de levadura	10 g/L
Peptona	20 g/L
Glucosa	20 g/L

Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos antes de repartirlo en tubos de ensayo estériles en la cabina de flujo laminar, para evitar contaminaciones.

4.2.3. Medio β -glucosidasa

El medio β -glucosidasa se emplea para detectar la presencia de actividad β -glucosídica. Si el medio alrededor de las colonias formadas toma una coloración oscura significa que existe actividad de β -glucosidasa. Dado que *A. pullulans* tiene dicha actividad y *S. cerevisiae* no, se puede emplear para detectar la presencia o ausencia de dicho microorganismo. La coloración oscura es debida a que la enzima β -glucosidasa hidroliza la arbutina del medio, liberando una quinona que reacciona con el hierro presente por la adición de cloruro férrico. (Baffi et al., 2013).

Arbutina	0,5% (p/v)
Extracto de levadura	0,1 % (p/v)
Agar	2 % (p/v)
Solución de cloruro férrico al 1%	2 % (p/v)

Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos antes de repartirlo en placas Petri estériles en la cabina de flujo laminar, para evitar contaminaciones.

4.2.4. Mosto concentrado

El mosto concentrado se diluyó con agua destilada y se acidificó con ácido tartárico para ajustar el pH. Se analizó el pH mediante un pH-metro (BASIC 20, CRISON) y el grado probable con un refractómetro de mano (ATAGO, Hand refractometer ATC-1).

Tabla 2. Analítica mosto elaborado a partir de mosto concentrado.

Analítica	Valores
pH	3,63 ± 0,1
Grado probable	20 ± 0,2 °Brix

4.2.5. Mosto Verdejo

Mosto de la variedad Verdejo de la añada 2020, que fue desfangado y sulfitado a 30 mg/L antes de su conservación en cámara de congelación. Se analizó el pH y el grado probable tras descongelar y esterilizar.

Tabla 3. Analítica mosto elaborado a partir de mosto de la variedad Verdejo.

Analítica	Valores
pH	3,69 ± 0,1
Grado probable	23,2 ± 0,2 °Brix

4.3. Microvinificaciones

Todas las vinificaciones realizadas en este estudio han sido elaboradas en el laboratorio microbiología de la ETSIIAA.

4.3.1. Coinoculación simultánea

En la primera parte experimental de este estudio se han utilizado los nueve aislados de *A. pullulans* junto con la *S. cerevisiae* (WAM) en coinoculación simultánea en mosto concentrado, usando como microvinificación control el mosto inoculado sólo con la WAM. Cada ensayo se hizo por triplicado, teniendo en total 30 matraces. Cada matraz se cerró con válvulas Müller, para poder valorar el desprendimiento de CO₂ durante la fermentación.

El mosto concentrado se repartió en los matraces de 100 mL. Cada matraz se llenó con 50 mL de mosto y se esterilizó en autoclave.



Figura 4. Matraces de 100 mL cerrados con válvulas Müller

Los matraces se inocularon con *A. pullulans* y *S. cerevisiae* (WAM) en cabina de flujo laminar para evitar contaminaciones. Ambos microorganismos se inocularon a una concentración de 10⁶ UFC/mL cada uno.

Se pesó cada matraz y se llevaron a la estufa a 21°C, para llevar a cabo la fermentación a temperatura controlada. El seguimiento de la fermentación se realizó pesando diariamente cada matraz.

La fermentación se consideró finalizada a los 11 días de la siembra. Se guardó a -20°C una muestra de cada matraz en tubos Eppendorf para medir la concentración de glucosa residual.

4.3.2. Coinoculación secuencial

La segunda parte experimental fue muy similar a la primera. Nuevamente se utilizaron los nueve aislados de *A. pullulans* y la *S. cerevisiae* (WAM) por triplicado en 30 matraces de 100 mL llenados con 50 mL del mismo mosto proveniente de mosto concentrado. Se inocularon a una concentración de 10⁶ UFC/mL cada uno.

En esta ocasión, la inoculación de microorganismos se realizó secuencialmente. Primero se sembraron los nueve aislados de *A. pullulans* por triplicado en 27 matraces. Se taparon con las válvulas Müller y se dejaron incubar 48 horas en estufa a 21°C. Tras este tiempo, se realizó una siembra en estría de cada matraz en placas de medio β-glucosidasa para comprobar la presencia de *A. pullulans* en el mosto tras este tiempo. A continuación, se inoculó *S. cerevisiae* en los matraces anteriores más otros tres como control en los que sólo se inocula *S. cerevisiae*. Al igual que en el primer ensayo, los matraces se incubaron en la estufa a 21°C y se pesaron los 30 matraces a diario para cuantificar el desprendimiento de CO₂.

A los 18 días se consideró acabada la fermentación. Se guardó a -20°C una muestra de cada matraz en tubos Eppendorf para medir la concentración de glucosa residual.

4.3.3. Mosto Verdejo

En la tercera parte experimental se utilizaron dos de los nueve aislados iniciales, seleccionados tras evaluar los resultados en los anteriores experimentos.

Se inocularon los aislados 4 y 6 por duplicado en matraces estériles con 300 mL de mosto de uva de la variedad Verdejo de la añada 2020 a una concentración de 10⁶ UFC/mL. Se cerraron los matraces con algodón y aluminio y se dejaron incubar a 21°C en la estufa.

Tras 48 horas se extrajo una muestra de cada matraz para guardar a -20°C y se sembró en estría en placas de medio β-glucosidasa. Se sembraron los cuatro matraces y dos nuevos que servirían como control con *S. cerevisiae* (WAM). Como seguimiento, dos veces por semana se extrajo una muestra de cada matraz y se guardó a -20°C para el posterior análisis de glucosa/fructosa, y se sembró en estría placas de medio β-glucosidasa, para detectar el momento en el que *A. pullulans* deja de estar presente.

Tras 18 días desde la siembra de la levadura, se declaró el final de fermentación y se realizaron analíticas básicas, análisis de glucosa/fructosa y perfil aromático.

4.3.4. Análisis químicos

Todos los análisis realizados en este estudio han sido realizados en el laboratorio de microbiología de la Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias de Palencia, excepto el análisis de aromas de las muestras de vino Verdejo, que fue realizado por el Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de Valladolid, en el edificio de I+D del Campus Miguel Delibes.

- **Grado alcohólico probable**

El grado alcohólico probable de los mostos de partida se determinó por el método refractométrico (ATAGO, Hand refractometer ATC-1), método indirecto con el que se determina la concentración de azúcares mediante el índice de refracción. Los resultados se expresan como grado alcohólico probable % vol.

- **Acidez total**

Se empleó el método potenciométrico, en el que se lleva la muestra a pH 7 con una solución de NaOH 0,1 N. (OIV-MA-AS313-01). La acidez total se expresa en g/L de ácido tartárico.

- **pH**

Se determinó con un pHmetro (BASIC 20, CRISON), basado en la diferencia de potencial entre dos electrodos sumergidos en la muestra de estudio. (OIV-MA-AS313-15).

- **Grado alcohólico**

Se determinó por ebulloimetría, utilizando un ebulómetro (GAB). Este método se fundamenta en la notable diferencia entre los puntos de ebullición del agua (100°C) y el alcohol (78°C). Los resultados se expresan como grado alcohólico % vol.

- **Azúcares reductores**

Se utilizó el método Rebelein, basado en la oxidación de los azúcares residuales del vino mediante una disolución divalente de cobre, en medio alcalino y en ebullición. (OIV-MA-AS313-01^a). El resultado se expresa en g/L de azúcar residual.

- **Acidez volátil**

Se determinó por el método de García Tena, basado en la separación directa o parcial del vino de una fracción del ácido acético contenido en él y posterior valoración con NaOH 0,01 N. (OIV-MA-AS313-02). La acidez volátil se expresa como g/L de ácido acético.

- **Glucosa/fructosa. Método enzimático**

El contenido en glucosa y fructosa de las muestras fue analizado en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la ETSIIAA. Se utilizó el kit de ensayo D-Fructosa / D-Glucosa de Megazyme y un espectrofotómetro de microplaca MultiskanTMGo (Thermo-Scientific). El contenido en glucosa y fructosa se puede determinar midiendo la absorbancia de las muestras tratadas con el kit enzimático (Charnock et al., 2006).

4.3.5. Aromas

Las muestras recogidas en el ensayo con mosto Verdejo fueron enviadas al Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) del Edificio I+D del Campus Miguel Delibes de la Universidad de Valladolid. Las muestras fueron enviadas en tubos Falcon de 50 mL.

La técnica utilizada fue cromatografía de gases con un detector de masas. Las áreas obtenidas se han estandarizado utilizando un patrón interno, añadido en cada ensayo para eliminar las diferencias en la cantidad analizada. Se usó como patrón interno 2-octanol. Se ha calculado el área relativa de cada compuesto dividiendo el área del pico de cada compuesto entre el área del compuesto de referencia, 2-octanol, para poder tratar adecuadamente los resultados. Como cada vinificación se realizó por duplicado se ha realizado la media entre ambas vinificaciones.

4.3.6. Tratamiento estadístico de datos

Para el tratamiento estadístico de los datos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) mediante el programa Statgraphics Centurion 19-X64. El ANOVA permite determinar si existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las varianzas de las diferentes muestras. Para el análisis de los aromas entre las distintas vinificaciones de Verdejo se ha realizado un análisis de componentes principales (PCA).

5. Resultados

5.1. Microvinificaciones en mosto concentrado

Con el objetivo de evaluar la interacción con *S. cerevisiae* y el efecto fermentación de *A. pullulans*, se ha estudiado su permanencia en el mosto, la cinética fermentativa y la glucosa residual en el vino final.

En la figura 5 se muestra representada la cinética de fermentación alcohólica del ensayo de coinoculación simultánea, donde se observa que todos los aislados siguieron un desarrollo muy similar. Se confirma estadísticamente que no hay diferencias significativas en cinética fermentativa entre los diferentes aislados en ninguna de las etapas ni en comparación con la inoculación única de WAM.

Esto indica que la presencia de *A. pullulans* cuando se inocula al mismo tiempo *S. cerevisiae* no afecta a la cinética fermentativa. Podemos suponer que *A. pullulans* no ha sido capaz de desarrollarse al ser inoculada simultáneamente junto a una levadura tan dominante como es *S. cerevisiae* (Onetto et al., 2020).

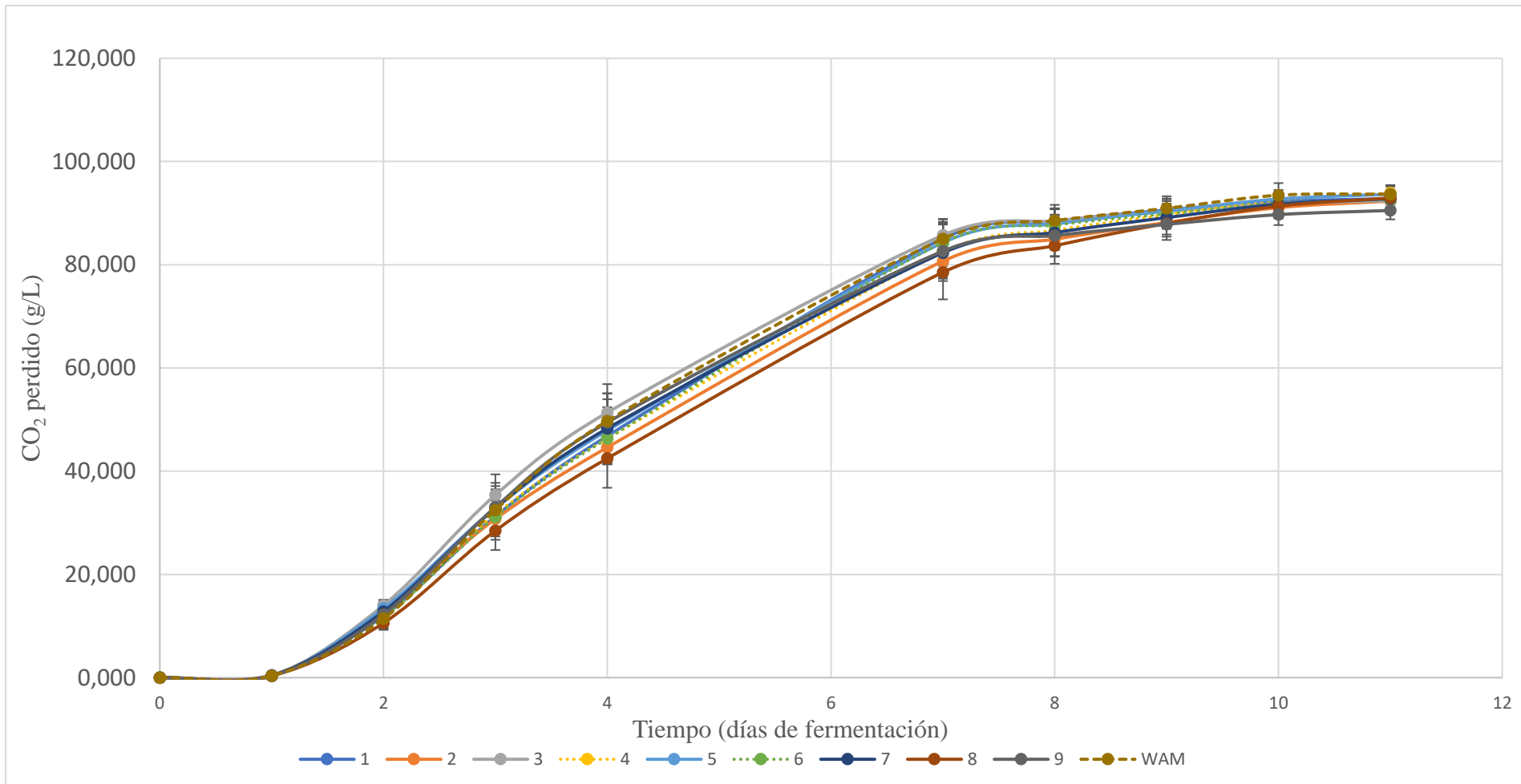


Figura 5. Desprendimiento de CO₂ (g/L) durante el proceso de fermentación de los mostos coinoculados simultáneamente con *A. pullulans* y *S. cerevisiae* (WAM) y el control con *S. cerevisiae* (WAM). Los datos fueron tomados por triplicado.

En el experimento de coinoculación secuencial se quiso comprobar la implantación y permanencia de *A. pullulans* en el mosto antes de la inoculación de *S. cerevisiae*. Gracias a la siembra en placas con medio β -glucosidasa, se pudo detectar la presencia de los aislados 4 y 6 de *A. pullulans* a las 48 horas de su inoculación en mosto concentrado en todas las repeticiones (figura 6). No se encontró presencia de *A. pullulans* en los demás aislados.

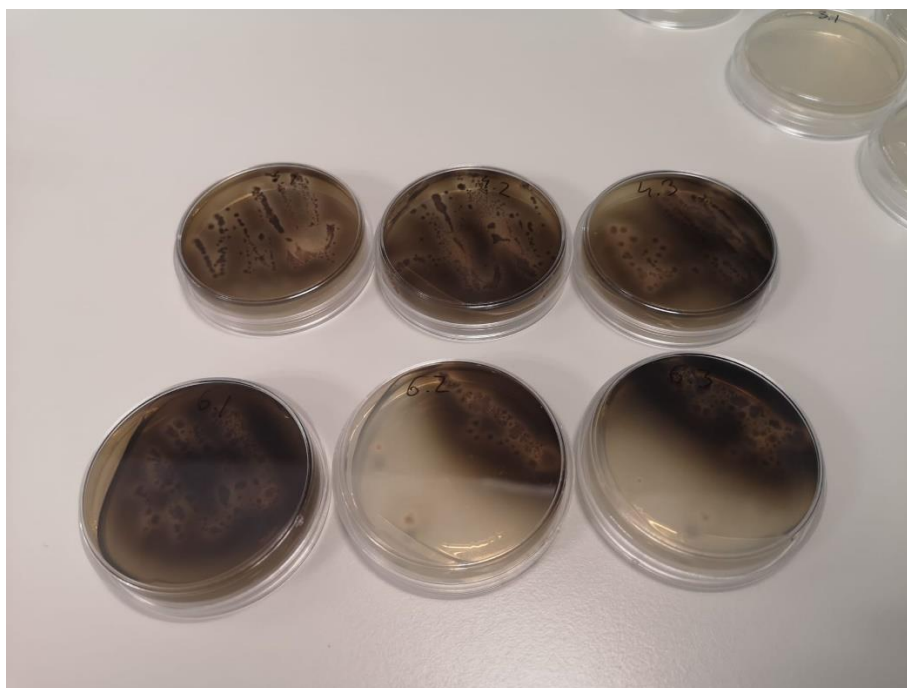


Figura 6. Actividad β -glucosidasa en placas de la coinoculación secuencial.

En esta ocasión sí que observamos diferencias en la cinética fermentativa entre los matraces que contenían los aislados 4 y 6, y los inoculados únicamente con WAM (figura 7). El desarrollo de la fermentación alcohólica fue ligeramente más lento en los matraces que contenían los aislados 4 y 6, lo que se puede explicar por la competencia entre los microorganismos (Merín et al. 2018). Los datos obtenidos sugieren que la presencia de *A. pullulans* afecta al desarrollo de *S. cerevisiae*, ya que la producción de CO_2 que indica que se está llevando a cabo el proceso fermentativo es menor en presencia de estos dos aislados.

En el estudio llevado a cabo por Onetto et al. (2020), donde también se inoculó *A. pullulans* 48 horas antes que *S. cerevisiae*, hubo diferencias en la cinética de fermentación atribuidas a un retraso en la fermentación, similar a lo observado en este experimento.

Evaluación del potencial biotecnológico de *Aureobasidium pullulans* en la elaboración de vino

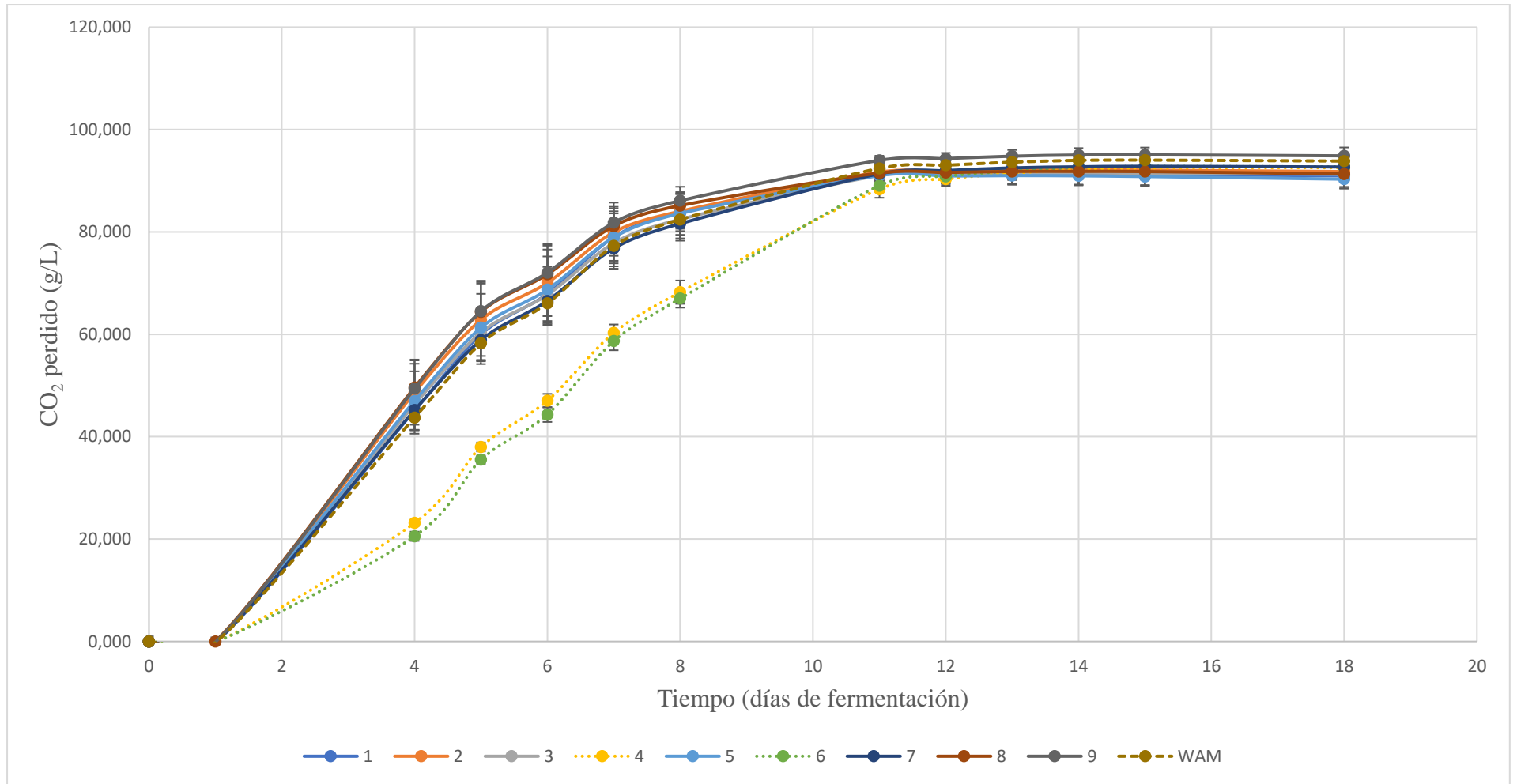


Figura 7. Desprendimiento de CO₂ (g/L) durante el proceso de fermentación de los mostos coinoculados secuencialmente con *A.pullulans* y *S.cerevisiae* (WAM) y el control con *S.cerevisiae*. Los datos fueron tomados por triplicado.

Sometiendo los datos diarios de gramos de CO₂ perdido por litro a un análisis de varianza (ANOVA), vemos que efectivamente hay diferencias estadísticamente significativas en la cinética fermentativa de los aislados 4 y 6 frente a todos los demás entre los días 4 y 8 de fermentación (tabla 8). A partir de ese momento deja de haber dichas diferencias, incluido el resultado final.

Tabla 8. Días de fermentación de coinoculación secuencial con diferencias estadísticamente significativas. g/L de CO₂ perdido.

Nº de muestra	Tiempo (Días de fermentación)				
	4	5	6	7	8
1	45,127 ± 3,772 ^b	60,013 ± 5,012 ^b	67,887 ± 5,282 ^b	78,993 ± 4,625 ^b	83,773 ± 3,608 ^b
2	48,620 ± 6,289 ^b	62,840 ± 7,072 ^b	70,060 ± 6,505 ^b	79,947 ± 4,605 ^b	84,040 ± 3,414 ^b
3	46,313 ± 5,375 ^b	60,353 ± 6,252 ^b	67,727 ± 6,070 ^b	77,820 ± 4,703 ^b	82,460 ± 3,693 ^b
4	23,160 ± 0,605 ^a	38,000 ± 0,870 ^a	47,033 ± 1,331 ^a	60,300 ± 1,622 ^a	68,240 ± 2,277 ^a
5	47,000 ± 0,023 ^b	61,320 ± 6,585 ^b	68,733 ± 6,481 ^b	78,953 ± 5,084 ^b	83,607 ± 4,177 ^b
6	20,540 ± 0,050 ^a	35,500 ± 0,783 ^a	44,333 ± 1,452 ^a	58,680 ± 1,789 ^a	66,980 ± 1,772 ^a
7	45,187 ± 0,110 ^b	58,887 ± 4,036 ^b	66,533 ± 4,546 ^b	76,780 ± 3,503 ^b	81,620 ± 2,879 ^b
8	49,607 ± 0,151 ^b	64,400 ± 6,076 ^b	71,727 ± 5,593 ^b	81,160 ± 3,746 ^b	85,153 ± 2,380 ^b
9	49,387 ± 0,035 ^b	64,520 ± 5,690 ^b	72,053 ± 5,551 ^b	81,840 ± 3,902 ^b	86,107 ± 2,726 ^b
WAM	43,740 ± 0,050 ^b	58,247 ± 4,059 ^b	66,047 ± 4,337 ^b	77,260 ± 4,451 ^b	82,427 ± 4,128 ^b

Al someter los valores obtenidos del análisis de glucosa en el vino final de cada experimento a análisis de varianza, no se obtienen diferencias estadísticamente significativas entre los valores dentro de cada grupo.

Tabla 9. g/L de glucosa en el vino final.

Aislado	Simultánea	Secuencial
1	0,0135 ± 0,0006 ^a	0,0131 ± 0,0001 ^b
2	0,0137 ± 0,0004 ^a	0,0127 ± 0,0004 ^b
3	0,0136 ± 0,0002 ^a	0,0134 ± 0,0001 ^b
4	0,0143 ± 0,0005 ^a	0,0129 ± 0,0003 ^b
5	0,0135 ± 0,0004 ^a	0,0133 ± 0,0006 ^b
6	0,0129 ± 0,001 ^a	0,0128 ± 0,0007 ^b
7	0,0137 ± 0,0006 ^a	0,0131 ± 0,0001 ^b
8	0,0141 ± 0,0006 ^a	0,0132 ± 0,0004 ^b
9	0,0137 ± 0,0004 ^a	0,0131 ± 0,0002 ^b
WAM	0,0129 ± 0,0006 ^a	0,0130 ± 0,0002 ^b

Sin embargo, si se realiza el mismo análisis comparando los resultados de la coinoculación simultánea frente a los de la secuencial, aparecen diferencias estadísticamente significativas, como podemos ver en la tabla 9.

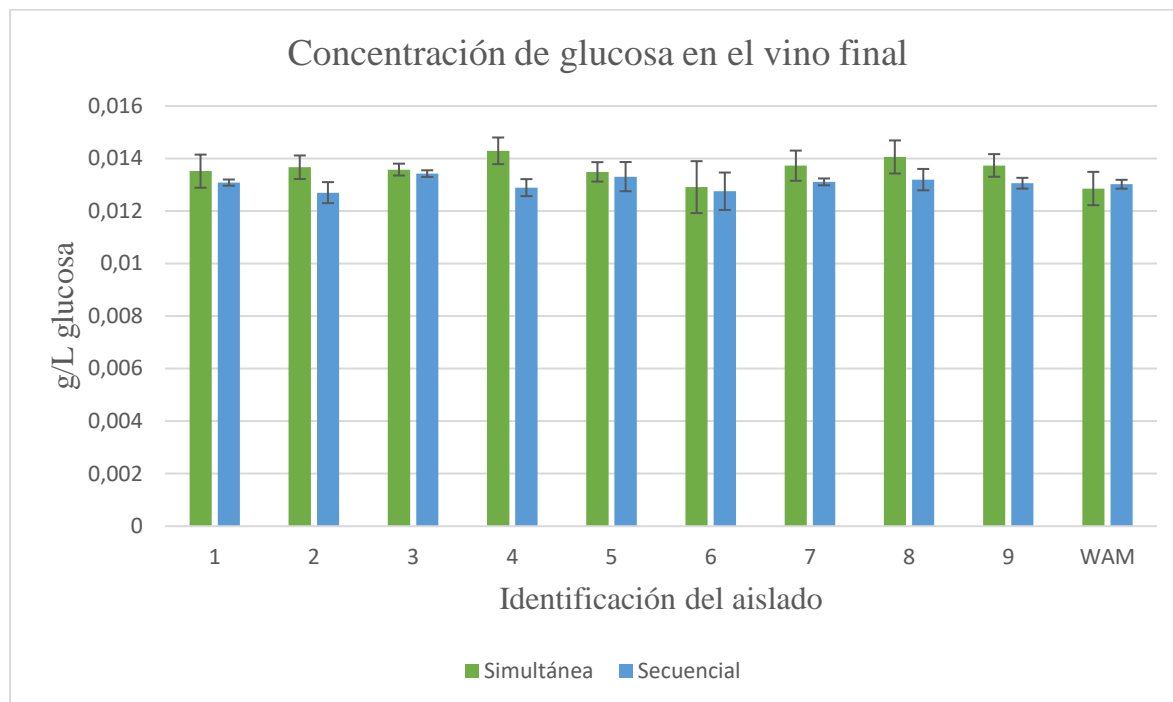


Figura 10. Comparativa de la glucosa expresada en g/L en el vino final.

En la figura 10 observamos que esta diferencia reside en una menor concentración de glucosa en el vino final de la coinoculación secuencial respecto de la simultánea. Nada nos indica que este mayor consumo de glucosa sea debido a la coinoculación o a la presencia de *A. pullulans*, pues como hemos visto anteriormente, solo se ha podido confirmar su presencia en dos de los aislados, los denominados 4 y 6 en las primeras fases de la coinoculación simultánea.

Es más probable que esta diferencia sea debida a que los matraces del segundo experimento permanecieron más tiempo en la estufa: 18 días de la secuencial respecto a los 11 de la simultánea.

5.2. Microvinificación en Verdejo

Una vez comprobado que la inoculación de *A. pullulans* no impedía ni dificultaba el correcto desarrollo de la fermentación alcohólica, se procedió a realizar la fermentación en mosto Verdejo. En esta ocasión se utilizó un mosto de la variedad Verdejo para comprobar si la fermentación en presencia de *A. pullulans* modifica sus características fisicoquímicas y su perfil aromático.

Como los aislados 4 y 6 fueron los que consiguieron permanecer en el mosto tras 48 horas de incubación, se decidió utilizar ambos en coinoculación secuencial. Según los resultados del estudio realizado en medio WL por De la Higuera, S. (2022), parecen ser cepas distintas, ya que su apariencia es diferente.

Tabla 11. Presencia de actividad β -glucosidasa (- ausencia de actividad, + presencia de actividad).

Días desde la inoculación de <i>S. cerevisiae</i>	Aislado 4	Aislado 6
0	+	+
2	-	+
5	-	-
8	-	-
12	-	-
15	-	-
19	-	-

Como podemos observar en la tabla 11, en el momento de la siembra de la levadura, 48 horas después de la siembra de *A. pullulans*, ambos aislados permanecían en el mosto. Después de otras 48 horas, con el mosto ya en fermentación, sólo se detecta la actividad enzimática en el aislado 6. A partir de ese momento no se detectó presencia de *A. pullulans* en ninguno de los matraces, por lo que podemos deducir que *S. cerevisiae* se impuso sobre el otro microorganismo e impidió su desarrollo.

5.2.1. Cinética fermentativa

A diferencia de los dos primeros experimentos, en éste no era posible utilizar válvulas Müller para realizar el seguimiento de la cinética fermentativa, ya que como había que abrir los matraces periódicamente para el seguimiento en placas de medio β -glucosidasa, el CO₂ escaparía y el método sería inefectivo. En esta ocasión el seguimiento se llevó a cabo analizando el contenido en glucosa y fructosa con el kit enzimático de las muestras guardadas dos veces por semana. Estudios previos indican que *A. pullulans* posee carácter fructofílico, que puede resultar interesante frente al carácter glucofílico de *S. cerevisiae* (Onetto et al., 2020).

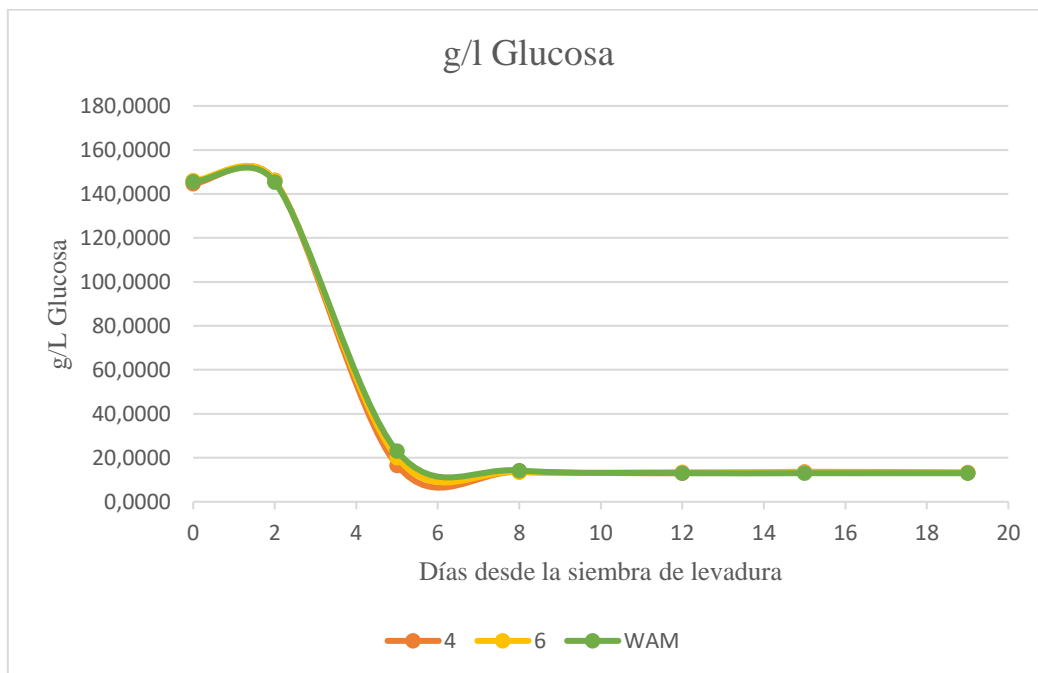


Figura 12. Consumo de glucosa en la fermentación de Verdejo.

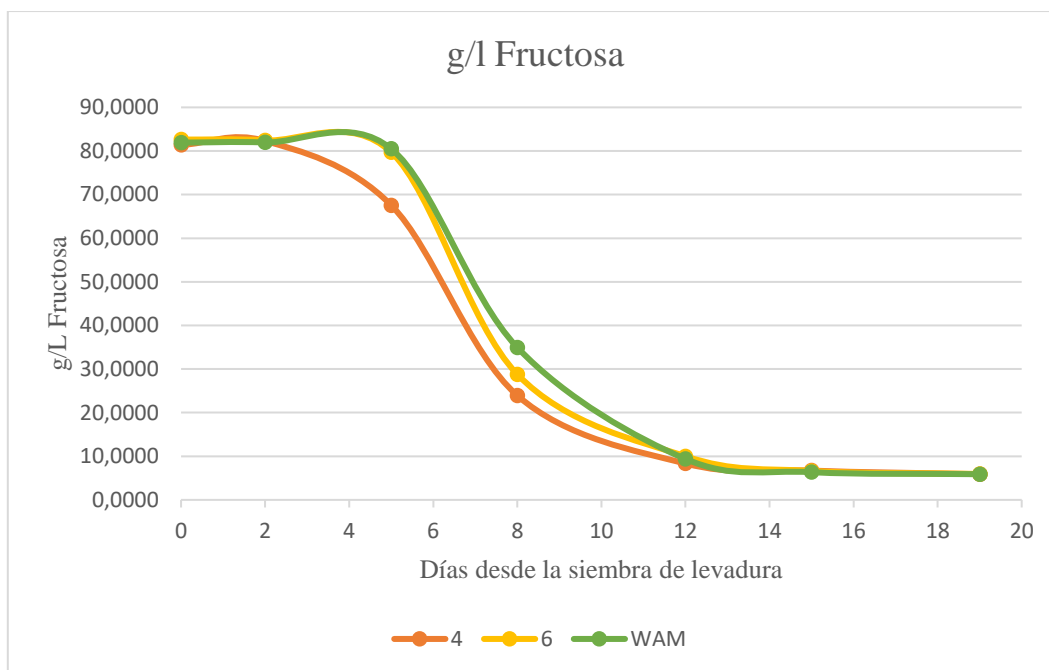


Figura 13. Consumo de fructosa en la fermentación de Verdejo.

Como se puede observar en la figura 12, la glucosa del mosto se consumió en todos los casos en los primeros 8 días. Entre los días 0 y 2 apenas hubo variación en la concentración de glucosa del mosto. Entre los días 2 y 5 se redujo drásticamente la concentración de glucosa, y entre los días 5 y 8 se redujo su consumo, deteniéndose completamente a partir del octavo día de fermentación.

Del mismo modo, en la figura 13 podemos observar el consumo de la fructosa durante la fermentación. En los primeros 5 días apenas hubo variación en la concentración de fructosa del mosto, pero a partir del día 5, momento en el que la glucosa estaba prácticamente agotada, la levadura *S. cerevisiae* (WAM) comenzó a consumir la fructosa.

Todos los datos de glucosa y fructosa fueron sometidos a análisis de varianza, pero en ningún momento se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Podemos concluir que la inoculación de *A. pullulans* no influye en el consumo de azúcares por parte de *S. cerevisiae*.

Por otro lado, en este experimento no se ha observado el retraso o ralentización de la fermentación alcohólica que sí observamos en el segundo experimento con los mismos aislados de *A. pullulans* que se han utilizado en este. Es probable que la presencia de este no haya sido suficiente en este caso para causar alteraciones en la cinética fermentativa.

5.2.2. Análisis fisicoquímicos

Tras el final de la fermentación alcohólica, se procedió al estudio de los parámetros de los vinos. Los resultados sirvieron para comparar los diferentes vinos y comprobar si la coinoculación de *S. cerevisiae* con *A. pullulans* modifica alguno de los parámetros finales del vino.

Tabla 14. Resultados de las analíticas realizadas a los vinos elaborados. A.R.: azúcares reductores (g/L), A.T.: acidez total expresada en ácido tartárico (g/L); A.V.: acidez volátil (g/L); % vol.: grado alcohólico (v/v).

	A.T.	pH	%vol.	A.R.	A.v.
WAM	5,62 ± 0,09	3,45 ± 0,02 ^a	12,7 ± 0,28	0,75 ± 0,21	0,68 ± 0,00
4	5,75 ± 0,25	3,48 ± 0,01 ^b	12,6 ± 0,14	0,55 ± 0,07	0,95 ± 0,13
6	5,72 ± 0,06	3,51 ± 0,02 ^c	12,6 ± 0,14	0,75 ± 0,07	0,99 ± 0,43

El pH del vino final reveló diferencias estadísticamente significativas, obteniendo valores más elevados cuando se ha inoculado *A. pullulans*. Se considera que hay diferencias estadísticamente significativas cuando el valor-P de la razón-F de las medias es <0,05. En el caso del pH, la razón-F tuvo un valor de 20,77 y el valor-P de 0,0004, muy inferior al 0,05 que señala el límite.

El análisis de varianza no mostró diferencias estadísticamente significativas en la concentración de acidez volátil del vino final. Sin embargo, se aprecia un aumento en la acidez volátil de los vinos inoculados con *A. pullulans* respecto a los elaborados sólo con *S. cerevisiae*. Es un aspecto negativo, ya que, si *A. pullulans* aumenta los ácidos volátiles del vino elaborado a cotas cercanas a 1 g/L, su interés biotecnológico para la mejora de la calidad de los vinos se vería perjudicado.

La acidez total expresada en g/L de ácido tartárico no mostró diferencias estadísticamente significativas. Se observa que sus valores son muy similares entre sí, aunque sea ligeramente superior en el caso de los vinos que contuvieron *A. pullulans*.

El grado alcohólico (%vol) fue ligeramente superior en el vino elaborado exclusivamente con *S. cerevisiae*, pero no es una diferencia estadísticamente significativa.

Los azúcares reductores medidos mediante el método Rebelein fueron en todos los casos inferiores a 1 g/L, considerándose esto como vinos secos. Las diferencias entre ellos no fueron suficientes para considerarse estadísticamente significativas.

5.2.3. Estudio de la composición aromática

Se aislaron e identificaron un total de 52 aromas en las muestras de vino por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GCMS). Los resultados obtenidos han sido sometidos a un análisis de componentes principales con el fin de comparar los vinos producidos utilizando *A. pullulans* en coinoculación secuencial y aquellos donde sólo se emplea *S. cerevisiae*, en función de los aromas identificados.

Las áreas relativas obtenidas son proporcionales a la concentración del analito en cuestión. Se han identificado ácidos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y terpenos.

Tabla 15. Nombre común de los compuestos encontrados, código otorgado en el trabajo y medias de las áreas relativas de cada compuesto.

Nombre (español)	CÓDIGO	WAM	4	6
Ácido acético	ACI-1	0,5713	0,7860	0,4429
Ácido isobutírico	ACI-2	0,0300	0,0315	0,0265
Ácido isovalérico	ACI-3	0,1188	0,1360	0,1134
Ácido hexanoico	ACI-4	0,2724	0,2704	0,2676
Ácido octanoico	ACI-5	1,2405	1,3170	1,3070
Ácido nonanoico	ACI-6	0,0334	0,0121	0,0100
Ácido decanoico	ACI-7	0,5294	0,4490	0,4334
Ácido caproleico	ACI-8	0,3116	0,3358	0,3497
Ácido benzoico	ACI-9	0,0249	0,0198	0,0076
Ácido dodecanoico	ACI-10	0,0564	0,0217	0,0306
Etanol	ALC-1	19,5544	25,2294	15,8332
1-propanol	ALC-2	0,0248	0,0193	0,0000
Isobutanol	ALC-3	0,1470	0,2614	0,2802
Alcohol isoamílico	ALC-4	6,3790	6,7376	5,8281
1-hexanol	ALC-5	0,3795	0,3706	0,3534
1-heptanol	ALC-6	0,0992	0,0901	0,0925
Octanol	ALC-7	0,0150	0,0106	0,0276
1-nonanol	ALC-8	0,0157	0,0000	0,0181
2-undecanol	ALC-9	0,0308	0,0167	0,0376
3-metiltiopropanol	ALC-10	0,0000	0,0399	0,0000
1-decanol	ALC-11	0,0266	0,0143	0,0207
Alcohol benzílico	ALC-12	0,0380	0,0413	0,0390
2-fenil etanol	ALC-13	5,6961	6,3247	5,5014
Fenol	ALC-14	0,0201	0,0000	0,0093
2,4-di-tert-butilfenol	ALC-15	0,1795	0,1459	0,1623
Acetaldehído	ALD-1	0,0804	0,0779	0,0718
Nonanal	ALD-2	0,0640	0,0000	0,0121
Benzaldehído	ALD-3	0,0556	0,0673	0,0584
2-fenil acetaldehído	ALD-4	0,0436	0,0158	0,0414
Nonanona	CET-1	0,0760	0,0710	0,0753
Undecanona	CET-2	0,0219	0,0294	0,0188
Acetato de etilo	EST-1	0,2197	0,2151	0,1650
Acetato de isoamilo	EST-2	0,4012	0,2894	0,2464
Hexanoato de etilo	EST-3	0,8986	0,7875	0,7127

Tabla 15. Continuación.

Nombre (español)	CÓDIGO	WAM	4	6
Acetato de hexilo	EST-4	0,0802	0,0522	0,0486
Heptanoato de etilo	EST-5	0,041	0,0285	0,0285
Octanoato de etilo	EST-6	8,1368	7,6541	6,6753
Nonanoato de etilo	EST-7	0,0682	0,0669	0,0639
Decanoato de etilo	EST-8	4,2472	3,9267	3,1225
2-metilbutil octanoato	EST-9	0,0311	0,0567	0,0175
Succinato de etilo	EST-10	0,1077	0,1002	0,09
Bezoato de etilo	EST-11	0	0	0,0086
Dec-9-enoato de etilo	EST-12	8,4813	8,9443	7,8501
Fenilacetato de etilo	EST-13	0	0,0107	0,0066
Acetato de 2-feniletilo	EST-14	1,3486	1,4606	1,3208
Dodecanoato de etilo	EST-15	0,6465	0,6443	0,5207
Decanoato de isoamilo	EST-16	0,0312	0,0188	0,0238
Miristato de etilo	EST-17	0,1143	0,1167	0,0923
Palmitato de etilo	EST-18	0,4962	0,6676	0,5858
Etil hexadecanoato	EST-19	0,0671	0,1263	0,0708
Octadecanoato de etilo	EST-20	0,0279	0,0284	0,0408
Citronelol	TERP-1	0,0341	0,0382	0,0337

Ácidos

La concentración de ácidos grasos en el vino final depende tanto del mosto de partida como del desarrollo de la fermentación (Baumes et al., 2009). En un estudio previo de Merín et al., (2018) se ha observado en algunos casos un aumento en la producción de ácidos grasos al elaborar vinos en presencia de *A. pullulans* debido a diversas actividades enzimáticas.

El ácido graso encontrado en mayor cantidad ha sido el ácido octanoico, seguido de los ácidos decanoico, caproico y hexanoico. Se aprecia un descenso en la formación de ácido nonanoico y ácido dodecanoico. La membrana celular de *A. pullulans* está formada por ácidos grasos de cadena larga con dobles enlaces en las posiciones 9 y 12, para lo cual necesita una mayor cantidad de enzimas desaturasas específicas para romper esos enlaces (Gostinčar et al., 2008). Este hecho podría explicar el menor contenido en ácidos grasos de 9 y 12 carbonos en los vinos elaborados utilizando *A. pullulans* (figura 16).

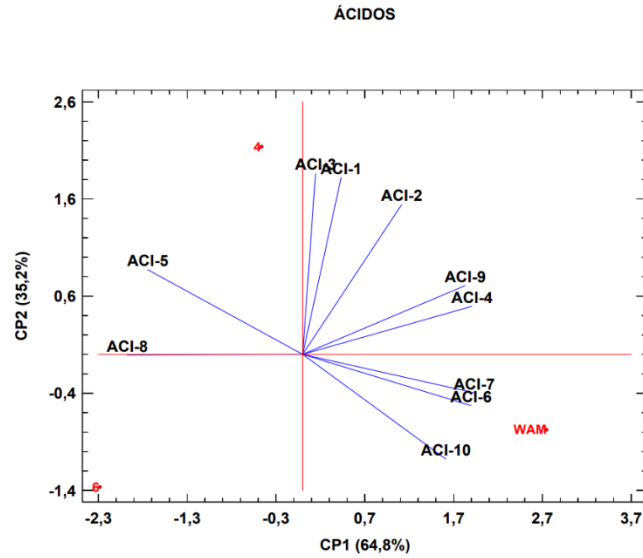


Figura 16. Análisis de componentes principales de los ácidos.

Alcoholes

Como muchos otros compuestos presentes en los vinos, los alcoholes superiores son formados durante la fermentación alcohólica. Suelen encontrarse por debajo del límite de detección por ser precursores de algunos ésteres, que tienen mayor impacto sensorial. Se pueden producir por la vía catabólica o vía de Ehrlich, mediante la descarboxilación y reducción de diferentes aminoácidos (Moreno-Arribas et al., 2009), o por la vía anabólica o del piruvato, durante la formación de aminoácidos ramificados (Borroto-Mato et al., 2017).

Los alcoholes superiores encontrados en mayor proporción han sido el alcohol isoamílico y el 2-fenil etanol, ambos importantes en la mejora organoléptica de los vinos (Moreno-Arribas et al., 2009). En la figura 17 se puede observar que ambos compuestos caracterizan en mayor medida la coinoculación con el aislado 4.

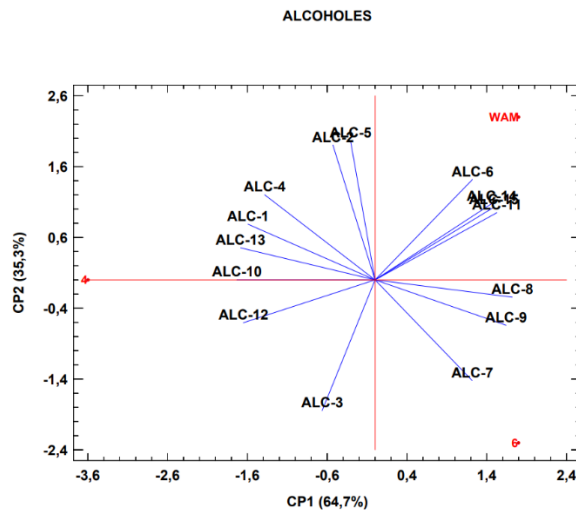


Figura 17. Análisis de componentes principales de los alcoholes.

Aldehídos y cetonas

Los aldehídos y cetonas forman parte de un grupo de compuestos carbonílicos formados por las levaduras durante el metabolismo de los azúcares. De ellos, el acetaldehído es el más importante cuantitativamente (Moreno-Arribas et al., 2009).

Los aldehídos encontrados han sido acetaldehído, benzaldehído, 2-fenil acetaldehído y nonanal, estando el primero en mayor concentración que los demás. En la figura 18 se puede observar que el benzaldehído caracteriza la coinoculación con el aislado 4 y a la WAM.

Las cetonas encontradas en el análisis han sido nonanona y undecanona. Podemos observar en la tabla 15 que el valor de nonanal en el vino control "WAM" es similar a los valores de los demás aldehídos y cetonas, mientras que el de los vinos con los aislados 6 y 4 de *A. pullulans* es mucho más bajo o inexistente respectivamente.

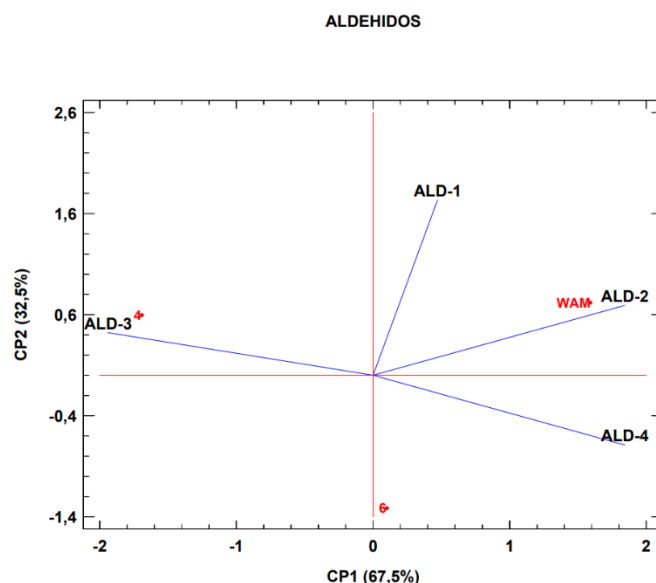


Figura 18. Análisis de componentes principales de los aldehídos.

Ésteres

Los ésteres son responsables muy importantes en el aroma afrutado de los vinos. Son formados por las levaduras durante la fermentación como resultado de la combinación de un ácido orgánico y un alcohol. Pueden ser agrupados en dos grandes grupos, los ésteres de acetatos, como el acetato de etilo, y los ésteres de ácidos grasos. Organolépticamente, los primeros son más importantes que los segundos y la mezcla de varios ésteres aporta mayor intensidad olfativa que los componentes por separado (Moreno-Arribas et al., 2009).

Los componentes que se han encontrado en mayor cantidad han sido octanoato de etilo, dec-9-enoato de etilo, decanoato de etilo y acetato de 2-feniletilo. En la figura 19 se puede observar que el bezoato de etilo y el octadecanoato de etilo caracterizan al aislado 6, mientras que los demás compuestos se reparten entre el aislado 4 y WAM.

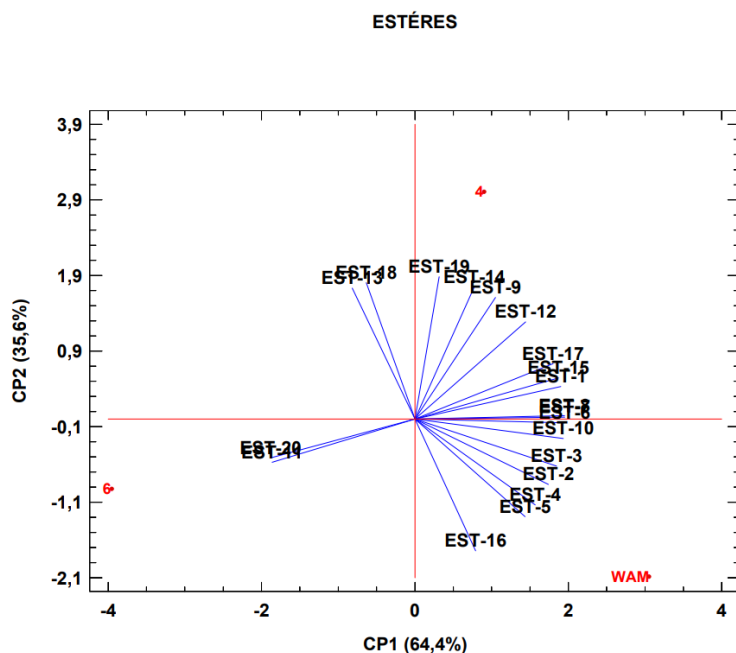


Figura 19. Análisis de componentes principales de los ésteres.

Terpenos

El perfil varietal de la uva Verdejo viene definido en gran medida por tioles y terpenos. Suelen aparecer conjugados con azúcares (xilosa, ramnosa, arabinosa, apiosa) y aminoácidos (cisteína y glutatión) (Ruiz et al., 2018). Estos compuestos aromáticos tienen un alto impacto en las propiedades organolépticas del vino debido a su bajo umbral de percepción, a pesar de su baja concentración en vinos (Baumes et al., 2009). Sin embargo, la elevada presencia de algunos alcoholes superiores y ésteres puede reducir el impacto sensorial de estos compuestos (Ruiz et al., 2018).

En el estudio de Baffi et al. (2013) se ha comprobado que el uso de β -glucosidasa procedente de *A. pullulans* incrementa la concentración de monoterpenos como α -terpineol, linalool, nerol, y geraniol. En dicho estudio se observa que dichos compuestos se liberan en mayor proporción al vino al utilizar la enzima en vinos terminados.

Por otro lado, en el estudio de Merín et al., 2018 no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de terpenos entre el vino de control y el inoculado con *A. pullulans*.

En el caso del presente estudio sólo se ha encontrado presencia de un compuesto terpénico: citronelol, en una proporción muy baja y sin diferencias estadísticamente significativas entre el control y los vinos inoculados con *A. pullulans*. La principal diferencia entre este estudio y el mencionado en primer lugar es que aquí se ha utilizado el microorganismo antes del comienzo de la fermentación, mientras que Baffi et al. (2013) no utilizó el microorganismo en sí, sino la enzima β -glucosidasa producida en vinos ya terminados. Es posible que éste sea uno de los motivos por los que no encontramos diferencias en la producción de terpenos.

6. Conclusiones

De los resultados obtenidos en el presente estudio podemos sacar las siguientes conclusiones:

- La cinética fermentativa no se ve afectada por *A. pullulans* en coinoculación simultánea.
- La coinoculación secuencial causa un ligero retraso en el inicio de la fermentación alcohólica.
- *A. pullulans* no se detecta 48 horas después de la inoculación de *S. cerevisiae* debido a la competencia entre ambas especies.
- Se aprecia un aumento del pH al coinocular secuencialmente *A. pullulans* con *S. cerevisiae* en mosto de la variedad Verdejo, encontrando también diferencias en función de la cepa empleada.
- La composición aromática de los vinos es distinta entre los diferentes aislados de *A. pullulans* y *S. cerevisiae*, encontrando la mayor diferencia en los aldehídos.
- Los vinos elaborados en presencia de *A. pullulans* se caracterizan por un menor contenido en ácidos grasos y aldehídos de nueve átomos de carbono que los elaborados exclusivamente con *S. cerevisiae*.

Sería interesante llevar a cabo más estudios coinoculando otras cepas de *A. pullulans* con *S. cerevisiae* en mosto de la variedad Verdejo, con la intención de buscar un incremento de la fracción terpénica. También puede realizarse con mostos de otras variedades blancas como Moscatel, Riesling o Albariño, que contienen una mayor fracción terpénica que puede verse fortalecida.

Sobre el procedimiento, podría inocularse diferentes concentraciones de la misma cepa para estudiar la diferencia en la producción de compuestos aromáticos; o en otros momentos de la fermentación, como al final de ésta, para estudiar su capacidad de consumir la fructosa residual y liberar compuestos aromáticos de los glucósidos residuales.

7. Bibliografía

- Baffi, M.A., Tobal, T., Lago, J.H.G., Boscolo, M., Gomes, E., DaSilva, R., (2013). Wine Aroma Improvement Using a β -Glucosidase Preparation from *Aureobasidium pullulans*. *Appl Biochem Biotechnol*, 169, 493–501.
<https://doi.org/10.1007/s12010-012-9991-2>
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V. (2012a). The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, 153, 243-259.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.025>
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V. (2012b). Changes in sour rotten grape berry microbiota during ripening and wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 154, 152-161.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.029>
- Borroto-Mato, D., Lorenzo-Izquierdo, M., García-Gutiérrez, R., Reyes-Linares, A., (2017). Aspectos generales sobre la determinación de alcoholes superiores en bebidas alcohólicas. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*. Vol. 51, núm. 3, 58-65.
- Bozoudi, D., Tsaltas, D., (2018). The Multiple and Versatile Roles of *Aureobasidium pullulans* in the Vitivinicultural Sector. *Fermentation* **2018**, 4(4), 85.
<https://doi.org/10.3390/fermentation4040085>
- Charnock, S.J., Daverede, C. Galant, P., McCleary, B.V., (2006). Megazyme “Advanced” Wine Test Kits General characteristics and validation. *Enologues*, 120, 1.
- Chi, Z., Wang, F., Chi, Z., Yue, L., Liu, G., Zhang, T., (2009). Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. *Appl Microbiol Biotechnol*, 82, 793–804.
<https://doi.org/10.1007/s00253-009-1882-2>
- Felice, D. V., Solfrizzo, M., De Curtis, F., Lima, G., Visconti, A., Castoria, R., (2008). Strains of *Aureobasidium pullulans* Can Lower Ochratoxin A Contamination in Wine Grapes. *Phytopathology*, 98, 1261-1270.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-12-1261>
- Don, S.M.Y., Schmidtke, L.M., Gambetta, J.M., Steel, C.C., (2020). *Aureobasidium pullulans* volatilome identified by a novel, quantitative approach employing SPME-GC-MS, suppressed *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata* in vitro. *Scientific Reports*. 10, 4498.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-61471-8>
- Fernández-Pacheco, P., García-Béjar, P., Briones-Pérez, A., Arévalo-Villena, M., (2021). β -glucosidasas libres e inmovilizadas en enología: caracterización biotecnológica y su efecto en la potenciación del aroma del vino. *Frontiers in Microbiology*, 12, 723815.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.723815>
- Gostinčar, C., Turk, M., Trbuha, T., Vaupotič, T., Plemenitaš, A., Gunde, N., (2008). Expression of fatty-acid-modifying enzymes in the halotolerant black yeast *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud under salt stress. *Studies in Mycology*, 61, 51–59.
<https://doi.org/10.3114/sim.2008.61.04>

De la Higuera, S., 2022. *Aislamiento y selección de levaduras no-Saccharomyces en Tempranillo*. Trabajo de fin de grado obtenido no publicado. Universidad de Valladolid, Palencia, España.

Jeng, W., Wang, N., Lin, M., Lin, C., Liaw, Y., Chang, W., Liu, C., Liang, P., Wang, A., (2011). Structural and functional analysis of three β -glucosidases from bacterium *Clostridium cellulovorans*, fungus *Trichoderma reesei* and termite *Neotermes koshunensis*. *Journal of Structural Biology*, 173, 46-56.
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.07.008>

Kang, W., Xu, Y., Qin, L., Wang, Y., (2010). Effects of Different β -D-Glycosidases on Bound Aroma Compounds in Muscat Grape Determined by HS-SPME and GC-MS. *Journal of the institute of Brewing*, 116, 70-77.
<https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2010.tb00400.x>

Liu, P., Lu, L., Duan, C., Yan, G., (2016). The contribution of indigenous non-Saccharomyces wine yeast to improved aromatic quality of Cabernet Sauvignon wines by spontaneous fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, 71, 356-363.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.031>

Lorenzini, L., Zapparoli, G., (2015). Occurrence and infection of Cladosporium, Fusarium, Epicoccum and Aureobasidium in withered rotten grapes during post-harvest dehydration. *Antonie van Leeuwenhoek*, 108, 1171–1180.
<https://doi.org/10.1007/s10482-015-0570-8>

Lorenzini, L., Zapparoli, G., (2019). Yeast-like fungi and yeasts in withered grape carposphere: Characterization of Aureobasidium pullulans population and species diversity. *International Journal of Food Microbiology*, 289, 223-230.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.023>

Merín, M., Morata de Ambrosini, V., (2015). Highly cold-active pectinases under wine-like conditions from non-Saccharomyces yeasts for enzymatic production during winemaking. *Lett Appl Microbiol*, 60, 467-474.
<https://doi.org/10.1111/lam.12390>

Merín, M.G., Morata de Ambrosini, V. (2018). Kinetic and metabolic behaviour of the pectinolytic strain Aureobasidium pullulans GM-R-22 during pre-fermentative cold maceration and its effect on red wine quality, *International Journal of Food Microbiology*, 285, 18-26.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.003>.

Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C., (2009). Wine Chemistry and Biochemistry. Madrid, España.
<https://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5>

Nisiotou A.A., Nychas G.J., (2007a). Yeast populations residing on healthy or botrytis-infected grapes from a vineyard in Attica, Greece. *Appl Environ Microbiol*, 73(8), 2765-8.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01864-06>.

Nisiotou A.A., Spiropoulos A.E., Nychas G.j., (2007b). Yeast Community Structures and Dynamics in Healthy and Botrytis-Affected Grape Must Fermentations. *Appl Environ Microbiol*, 73(21), 6705–6713.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01279-07>

Onetto, CA, Borneman, AR, Schmidt, SA, (2020). Investigating the effects of *Aureobasidium pullulans* on grape juice composition and fermentation, *Food Microbiology*, 90, 103451.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103451>

Onetto, C.A., Schmidt, Roach, M.J., S.A., Borneman, A.R., (2020). Comparative genome analysis proposes three new *Aureobasidium* species isolated from grape juice. *FEMS Yeast Research*, 20, foaa052.
<https://doi.org/10.1093/femsyr/foaa052>

Pantelides, I.S., Christou, O., Tsolakidou, M.D., Tsaltas, D., Ioannou, N., (2015). Isolation, identification and in vitro screening of grapevine yeasts for the control of black aspergilli on grapes, *Biological Control*, 88, 46-53.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.04.021>

Pinto, C., Custódio, V., Nunes, M., Songy, A., Rabenoelina, F., Courteaux, B., Clément, C., Gomes, A.C., Fontaine, F., Understand the Potential Role of *Aureobasidium pullulans*, a Resident Microorganism From Grapevine, to Prevent the Infection Caused by *Diplodia seriata*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 3047.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03047>

Prasongsuk, S., Lotrakul, P., Ali, I., Bankeeree, W., Punnapayak, H., (2018). The current status of *Aureobasidium pullulans* in biotechnology. *Folia Microbiol*, 63, 129-140
<https://doi.org/10.1007/s12223-017-0561-4>

Rathnayake, R.M.S.P., Savocchia, S., Schmidtke, L.M., Steel, C.C. (2018). Characterisation of *Aureobasidium pullulans* isolates from *Vitis vinifera* and potential biocontrol activity for the management of bitter rot of grapes. *Eur J Plant Pathol* 151, 593-611.
<https://doi.org/10.1007/s10658-017-1397-0>

Ruiz, J., Belda, I., Beisert, B., Navascués, E., Marquina, D., Calderón, F., Rauhut, D., Santos, A., Benito, S., (2018). Analytical impact of *Metschnikowia pulcherrima* in the volatile profile of Verdejo white wines. *Appl Microbiol Biotechnol* 102, 8501–8509.
<https://doi.org/10.1007/s00253-018-9255-3>

Schena, L., Ippolito, A., Zahavi, T., Cohen, L., Nigro, F., Droby, S., (1999). Genetic diversity and biocontrol activity of *Aureobasidium pullulans* isolates against postharvest rots. *Postharvest Biology and Technology*, 17, 189-199.
[https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(99\)00036-8](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(99)00036-8)

Villena, M.A., Iranzo, JFU., Pérez, AIB. (2007). B-Glucosidase activity in wine yeasts: Application in enology. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 420–425.
[DOI: 10.1016/j.enzmictec.2006.07.013](https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.07.013)

Villena, M.A. (2006). Estudio de la actividad β -glucosidásica en levaduras vínicas y su aplicación en enología. Ediciones de la UCLM. I.S.B.N 84-8427-436-5.

Zhu, F.M., Du B., Li J., (2014). Aroma enhancement and enzymolysis regulation of grape wine using β -glycosidase. *Food Sci Nutr*, 2(2):139-45.
<https://doi.org/10.1002/fsn3.84>

Nisiotou, A.A., Spiropoulos, A.E., Nychas, G.J., (2007). Yeast community structures and dynamics in healthy and *Botrytis*-affected grape must fermentations. *Appl Environ Microbiol*, 73(21), 6705-13.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01279-07>

8. Anexos

Tabla 20. Nombre IUPAC de los compuestos encontrados, nombre común, áreas relativas de cada compuesto y notas aromáticas

		ÁREA RELATIVA (ref. 2-octanol, CAS 5978-70-1)						
Nombre IUPAC	Nombre	WAM1	WAM2	4.1	4.2	6.1	6.2	Notas aromáticas
acetic acid	Ácido acético	0,4405	0,7021	0,9437	0,6283	0,2615	0,6243	Ácido, vinagre (15)
2-methylpropanoic acid	Ácido isobutírico	0,0295	0,0306	0,0377	0,0254	0,0245	0,0285	Rancio, mantequilla, queso (1)
3-methylbutanoic acid	Ácido isovalérico	0,1291	0,1085	0,1473	0,1247	0,0965	0,1303	Dulce, ácido, rancio (1)
hexanoic acid	Ácido hexanoico	0,2389	0,3059	0,2638	0,2771	0,2399	0,2953	
octanoic acid	Ácido octanoico	1,1677	1,3133	1,1441	1,4899	1,0855	1,5285	
nonanoic acid	Ácido nonanoico	0,0409	0,0259	0,0000	0,0241	0,0200	0,0000	Graso, coco (10) (12)
decanoic acid	Ácido decanoico	0,5522	0,5066	0,4062	0,4918	0,3700	0,4967	Graso, rancio (1)
dec-9-enoic acid	Ácido caproleico	0,3365	0,2868	0,2969	0,3748	0,2974	0,4021	Algo afrutado, lechoso (29)
benzoic acid	Ácido benzoico	0,0274	0,0225	0,0000	0,0396	0,0153	0,0000	
dodecanoic acid	Ácido dodecanoico	0,0631	0,0497	0,0434	0,0000	0,0272	0,0340	
Ethanol	Etanol	18,1070	21,0018	30,7515	19,7073	12,8383	18,8282	
propan-1-ol	1-propanol	0,0278	0,0217	0,0000	0,0386	0,0000	0,0000	Frutal, manzana, papaya
2-methylpropan-1-ol	Isobutanol	0,2940	0,0000	0,1692	0,3536	0,2688	0,2916	Aceitoso, amargo, verde (1)
3-methylbutan-1-ol	Alcohol isoamílico	6,2774	6,4805	6,9976	6,4776	5,3458	6,3104	Fusel (1)
hexan-1-ol	1-hexanol	0,3801	0,3789	0,3870	0,3541	0,3480	0,3588	Floral, verde, hierba (1)
heptan-1-ol	1-heptanol	0,1003	0,0982	0,1078	0,0724	0,0933	0,0917	Graso (12)
octan-1-ol	Octanol	0,0301	0,0000	0,0000	0,0211	0,0280	0,0272	Alcohólico, graso (6)
nonan-1-ol	1-nonanol	0,0314	0,0000	0,0000	0,0000	0,0169	0,0193	
undecan-2-ol	2-undecanol	0,0276	0,0340	0,0000	0,0334	0,0329	0,0422	
3-methylsulfanylpropan-1-ol	3-metiltiopropanol	0,0000	0,0000	0,0000	0,0798	0,0000	0,0000	Cocido, vegetal (1)
decan-1-ol	1-decanol	0,0252	0,0279	0,0000	0,0286	0,0183	0,0232	Floral, frutal, dulce (8)
phenylmethanol	Alcohol benzílico	0,0357	0,0403	0,0379	0,0447	0,0319	0,0462	Almendra (4)
2-phenylethanol	2-fenil etanol	5,5682	5,8241	5,7116	6,9379	4,5180	6,4847	Floral, rosas (1)
phenol	Fenol	0,0190	0,0212	0,0000	0,0000	0,0185	0,0000	
2,4-ditert-butylphenol	2,4-di-tert-butilfenol	0,1767	0,1824	0,1151	0,1767	0,1553	0,1693	
Acetaldehyde	Acetaldehído	0,0778	0,0831	0,0705	0,0852	0,0588	0,0848	Acre, afrutado (31)

Tabla 20. Continuación

		ÁREA RELATIVA (ref. 2-octanol, CAS 5978-70-1)						
Nombre IUPAC	Nombre	WAM1	WAM2	4.1	4.2	6.1	6.2	Notas aromáticas
nonanal	Nonanal	0,0796	0,0485	0	0	0,0243	0	Graso, ceroso (5)
benzaldehyde	Benzaldehído	0,0528	0,0584	0,0718	0,0628	0,0443	0,0725	Almendras amargas (4)
2-phenylacetaldehyde	2-fenil acetaldehído	0,0514	0,0358	0	0,0315	0,0376	0,0451	Miel, flores (2)
nonan-2-one	Nonanona	0,0832	0,0688	0,0896	0,0524	0,0646	0,086	Floral, afrutado (5)
undecan-2-one	Undecanona	0,0217	0,0221	0,031	0,0278	0,0169	0,0206	
Ethyl acetate	Acetato de etilo	0,182	0,2574	0,2436	0,1865	0,1384	0,1915	Fruta, disolvente (1)
3-methylbutyl acetate	Acetato de isoamilo	0,3037	0,4986	0,3482	0,2306	0,2135	0,2793	Plátano (1)
ethyl hexanoate	Hexanoato de etilo	0,8102	0,9869	0,886	0,689	0,7316	0,6938	Manzana verde (1)
hexyl acetate	Acetato de hexilo	0,0595	0,101	0,0672	0,0373	0,0402	0,057	Manzana madura, frutal (6)
ethyl heptanoate	Heptanoato de etilo	0,0478	0,0343	0,0343	0,0227	0,0329	0,0241	Afrutado, a cognac (5)
ethyl octanoate	Octanoato de etilo	7,8674	8,4063	7,5435	7,7647	6,1641	7,1865	Dulce, afrutado (1)
ethyl nonanoate	Nonanoato de etilo	0,0641	0,0723	0,0702	0,0637	0,0773	0,0506	
ethyl decanoate	Decanoato de etilo	4,04	4,4544	3,7999	4,0535	2,8875	3,3576	Dulce, afrutado (1)
2-methylbutyl octanoate	2-metilbutil octanoato	0,0622	0	0,0585	0,0549	0,035	0	
diethyl butanedioate	Succinato de etilo	0,1082	0,1072	0,0958	0,1046	0,0753	0,1048	Afrutado, uva verde (23)
ethyl benzoate	Bezoato de etilo	0	0	0	0	0,0172	0	Afrutado (24)
ethyl dec-9-enoate	Dec-9-enoato de etilo	8,278	8,6846	8,4511	9,4375	7,3175	8,3826	Jabón (4)
ethyl 2-phenylacetate	Fenilacetato de etilo	0	0	0	0,0214	0,0131	0	Rosas (4)
2-phenylethyl acetate	Acetato de 2-feniletilo	1,3296	1,3675	1,2649	1,6563	1,1131	1,5285	Floral (1)
ethyl dodecanoate	Dodecanoato de etilo	0,5922	0,7007	0,5583	0,7302	0,499	0,5423	Floral, afrutado (5)
3-methylbutyl decanoate	Decanoato de isoamilo	0,0291	0,0333	0	0,0376	0,0229	0,0247	
ethyl tetradecanoate	Miristato de etilo	0,0926	0,136	0,0803	0,1532	0,0763	0,1084	Jabonoso, cera, violetas (5)
ethyl hexadecanoate	Palmitato de etilo	0,425	0,5674	0,4737	0,8614	0,502	0,6695	Cera (5)
ethyl (E)-hexadec-9-enoate	Etil hexadecanoato	0,0425	0,0917	0,0605	0,1921	0,0751	0,0666	
ethyl octadecanoate	Octadecanoato de etilo	0,0259	0,0299	0	0,0567	0,0376	0,0441	Cera (30)
(3R)-3,7-dimethyloct-6-en-1-ol	Citronelol	0,035	0,0332	0,032	0,0444	0,0288	0,0387	Cítrico, limón verde (4)