



UNIVERSIDAD DE CÁDIZ

Departamento de Ingeniería Química y Tecnología
de los Alimentos

“APLICACIÓN DE POLEN DE ABEJA COMO ACTIVADOR EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA”

TESIS DOCTORAL

Autor: Antonio Amores-Arrocha

Dirigida por:

Dr. D. Ildefonso Caro Pina

Dr. D. Víctor Palacios Macías

Puerto Real, 2018



TESIS DOCTORAL

APLICACIÓN DE POLEN DE ABEJA COMO ACTIVADOR EN EL PROCESO DE
FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

BEE POLLEN APPLICATION AS ACTIVATOR IN THE ALCOHOLIC
FERMENTATION PROCESS

Antonio Amores Arrocha

Puerto Real, julio 2018



Universidad de Cádiz

Departamento de Ingeniería Química y
Tecnología de los Alimentos

DR. ILDEFONSO CARO PINA, COMO CATEDRÁTICO, Y DR. VÍCTOR PALACIOS MACÍAS, COMO PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

CERTIFICAN: que la memoria titulada “Aplicación de polen de abeja como activador en el proceso de fermentación alcohólica”/“Bee pollen application as activator in the alcoholic fermentation process”, ha sido desarrollada por Antonio Amores Arrocha, bajo nuestra co-dirección en el grupo de investigación AGR-203 de Ingeniería y Tecnología de Alimentos para optar al grado de Doctor en Agroalimentación por la Universidad de Cádiz con mención europea, cumpliendo con los requisitos exigidos por la legislación vigente.

Fdo.: D. Antonio Amores Arrocha

Puerto Real, a de de 2018.

Fdo.: Dr. D. Ildelfonso Caro Pina

Fdo.: Dr. D. Víctor Palacios Macías

Fdo.: Dr. D. Ildelfonso Caro Pina

Director del Departamento de Ingeniería Química y Tecnología de Alimentos

Universidad de Cádiz

La presente Tesis doctoral ha sido realizada
con la ayuda del programa de contratos
Predoctorales para Personal Investigador en
Formación del Plan Propio de la Universidad
de Cádiz 2013-023/PU/EPIF-FPI-CT/CP

“IN THE END...We only regret the chances we didn't take, the relationships we were afraid to have, and the decisions we waited too long to make”

Lewis Carrol

“Intelligence is the ability to adapt to change”

Stephen Hawking

A mi familia

ÍNDICE

RESUMEN	7
ABSTRACT	19
1. INTRODUCCIÓN	31
1.1 BIBLIOGRAFÍA	47
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	57
3. MATERIALES Y METODOS.....	61
3.1 MATERIAS PRIMAS	61
3.1.1 Variedades de uva blanca	61
3.1.2 Variedades de uva tinta.....	62
3.1.3 Levaduras fermentativas y bacterias lácticas.....	63
3.1.4 Polen de abeja multifloral	64
3.1.5 Nutrientes comerciales	64
3.2 EQUIPAMIENTO A ESCALA LABORATORIO-PILOTO.....	65
3.3 METODOS.....	66
3.3.1 Estudio y evaluación a escala laboratorio-piloto de los efectos de la adición de polen en la vinificación en blanco.	66
3.3.2 Estudio y evaluación a escala laboratorio-piloto de los efectos de la adición de polen en la vinificación en tinto.	70
3.3.3 Validación a escala laboratorio-piloto de los efectos de la adición de polen en la vinificación en blanco y en tinto, en comparación con otros activadores comerciales.....	72
3.4 Determinaciones analíticas de los mostos	74
3.4.1 Acidez total.....	74
3.4.2 Grado Baumé (°Bè).....	74
3.4.3 pH	75
3.4.4 Turbidez.....	75
3.5 Metodología de análisis durante la fermentación alcohólica	75
3.5.1 Densidad.....	75
3.5.2 Biomasa	75
3.5.3 Nitrógeno fácilmente asimilable (NFA)	76
3.5.4 Velocidad exponencial (V_{exp})	76
3.6 Caracterización analítica de los vinos.....	76
3.6.1 Grado alcohólico	76
3.6.2 Azúcares residuales	76
3.6.3 Acidez volátil	77
3.6.4 Anhídrido sulfuroso	77

3.6.5	Incidencia del pardeamiento en el color.....	77
3.6.6	Intensidad colorante (IC).....	77
3.6.7	Tonalidad (N).....	77
3.6.8	CIELAB parámetros.....	78
3.6.9	Índice de polifenoles totales (IPT).....	78
3.6.10	Compuestos volátiles mayoritarios.....	78
3.6.11	Compuestos volátiles minoritarios.....	79
3.6.12	Determinación del ácido málico.....	79
3.7	BIBLIOGRAFÍA.....	80
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	83
4.1	Estudio y evaluación a escala laboratorio-piloto de los efectos de la adición de polen en la vinificación en blanco.	87
4.1.1	Influencia de la dosis de polen sobre las propiedades físico-químicas del mosto.	87
4.1.2	Análisis de los efectos sobre la cinética fermentativa, el desarrollo de las poblaciones de levaduras y el nitrógeno fácilmente asimilable durante la fermentación alcohólica.....	90
4.1.3	Influencia de la dosis de polen sobre las propiedades físico-químicas y los parámetros de color de los vinos finales.	99
4.1.4	Evaluación de los efectos de la adición de polen sobre los compuestos volátiles del vino y sus correspondientes VAO.....	103
4.1.5	Análisis de Componentes Principales de compuestos volátiles (ACP).....	117
4.1.6	Descripción del Valor de la Actividad Odorante (VAO).....	119
4.1.7	Evaluación sensorial de los vinos resultantes.	123
4.2	Estudio y evaluación a escala laboratorio-piloto de los efectos de la adición de polen en la vinificación en tinto.	129
4.2.1	Influencia de la dosis de polen sobre las propiedades físico-químicas del mosto	129
4.2.2	Análisis de los efectos sobre la cinética fermentativa, el desarrollo de las poblaciones de levaduras y el nitrógeno fácilmente asimilable durante la fermentación alcohólica.....	131
4.2.3	Influencia de la dosis de polen sobre el contenido en ácido málico durante la FML	138
4.2.4	Evaluación de la dosis de polen sobre las propiedades físico-químicas y los parámetros de color de los vinos finales.	139
4.2.5	Evaluación de los efectos de la adición de polen sobre los compuestos volátiles del vino y sus correspondientes VAO.....	144
4.2.6	Análisis de Componentes Principales de compuestos volátiles (ACP).....	155
4.2.7	Descripción del Valor de la Actividad Odorante (VAO).....	157

4.2.8	Evaluación sensorial de los vinos resultantes.	159
4.3	Validación a escala laboratorio-piloto de los efectos de la adición de polen en la vinificación en blanco y en tinto, en comparación con activadores comerciales.....	165
4.3.1	Evaluación de los efectos sobre el NFA y la turbidez del mosto.....	165
4.3.2	Influencia sobre la cinética de fermentación alcohólica.....	168
4.3.3	Influencia sobre la cinética de crecimiento de las levaduras durante la fermentación alcohólica.....	171
4.3.4	Influencia sobre la evolución del NFA durante la fermentación alcohólica.....	174
4.3.5	Influencia sobre el contenido en ácido málico durante la FML	177
4.3.6	Evaluación de los efectos sobre las propiedades físico-químicas y los parámetros de color de los vinos finales.	178
4.3.7	Evaluación de los efectos sobre los compuestos volátiles del vino y sus correspondientes VAO.	183
4.3.8	Análisis sensorial descriptivo.....	194
4.3.9	Test de ordenación y prueba triangular.....	202
4.4	Consideraciones económicas en el coste del polen frente a productos comerciales	211
4.4.1	Evolución del precio del polen	211
4.4.2	Estudio económico comparativo con nutrientes comerciales	212
4.5	BIBLIOGRAFÍA.....	216
5	CONCLUSIONES	223
5.1.	CONCLUSIONES	225
5.2.	CONCLUSIONS	227
	ANEXOS	231
	ÍNDICE DE FIGURAS	245
	ÍNDICE DE TABLAS	251
	CONTRIBUCIÓN CIENTÍFICA ASOCIADA A LA TESIS DOCTORAL	255
	Artículos en revistas indexadas en el Journal Citations Reports (JCR).....	257

RESUMEN

RESUMEN

Los activadores de fermentación son productos enológicos que se están empleando para la mejora de las condiciones de crecimiento y disminución del estrés de las levaduras durante la fermentación alcohólica. Los elevados grados alcohólicos potenciales, el déficit en nitrógeno fácilmente asimilable de los mostos, la necesidad de implantar con rapidez los pies de cuba, la presencia de sustancias tóxicas inhibidoras del crecimiento de las levaduras y los riesgos de aparición del fenómeno de reducción son algunos de los argumentos que justifican el uso de activadores fermentativos. La mayoría de ellos responden, hasta el momento, a formulaciones químicas con una base importante de nitrógeno amoniacal (fosfato amónico), ácidos grasos insaturados y vitaminas (tiamina). Algunos contienen polvo de celulosa y/o autolisados de levaduras que adsorben sustancias tóxicas inhibidoras del medio. Sin embargo, en esta amplia lista no existe ningún producto natural que pueda contener una formulación óptima capaz de dar respuesta integral a todas las necesidades previstas durante la fermentación alcohólica, entre las que cabría destacar la activación al inicio de la fermentación, el aumento de la supervivencia de las levaduras al final del proceso y la mejora de la producción de compuestos aromáticos, minimizando la aparición de defectos olfativos.

Las nuevas tendencias de mercado orientadas a la utilización de productos de origen natural, muy poco procesados y que respeten el medioambiente, da sentido al presente proyecto de tesis, en el cual, se propone el uso del polen de abeja como activador-nutriente natural en la fermentación alcohólica.

Esta Tesis Doctoral, se ha financiado dentro del Plan Propio de Investigación de la Universidad de Cádiz (2013-023/PU/EPIF-FPI-CT/CP), con el título “Aplicación de polen de abeja como activador en el proceso de fermentación alcohólica”.

La investigación tiene como objetivo principal estudiar tanto la viabilidad, como los efectos positivos y negativos producidos por el uso del polen de abeja en la vinificación en blanco y en tinto. La metodología de trabajo se ha desarrollado a escala laboratorio-piloto. En una primera fase se analizaron los efectos de diferentes dosis de

polen, tanto en la vinificación en blanco como en tinto. Posteriormente, en una segunda fase, se validó el uso del polen frente a otros activadores comerciales.

Para cumplir con los objetivos marcados, se han llevado a cabo la vinificación en blanco de las variedades Palomino fino y Riesling, y la vinificación en tinto de la variedad Tintilla de Rota. La aplicación del polen fue realizada directamente sobre los mostos blancos desfangados o sobre la vendimia tinta despalillada y molturada antes de la fermentación alcohólica. Para todas las variedades se emplearon diferentes dosis de polen (0,1, 0,25, 1, 5, 10 y 20 g/L) de acuerdo con estudios preliminares del equipo investigador.

En primer lugar, se estudió si el polen en sus diferentes dosis tenía algún tipo de efecto sobre la composición fisicoquímica de los mostos blancos y tintos. Los resultados mostraron que la adición de polen conlleva a un aumento significativo de los niveles de nitrógeno fácilmente asimilable (NFA) en los mostos blancos y tintos, estableciéndose una correlación lineal con la dosis de polen. Asimismo, los resultados no mostraron cambios significativos en la densidad, salvo para las dosis más altas (10 y 20 g/L), donde posiblemente hay una cierta aportación de azúcar, tal como se había observado en estudios preliminares con hidromiel. El resto de parámetros no se vieron alterados, salvo un ligero incremento en la acidez total, en el caso de los mostos de Tintilla de Rota con la dosis más alta de polen, aunque en todos los casos, el pH se mantuvo constante.

En segundo lugar, se llevó a cabo la fermentación alcohólica de los mostos blancos y el encubado de los tintos. Para el inicio de la fermentación se emplearon inóculos de levaduras secas activas (LSA) y una temperatura controlada de 19°C. Durante la fermentación alcohólica, se realizó un seguimiento de la densidad, del NFA, y la biomasa viable (levaduras). Los resultados de las medidas de densidad y de biomasa mostraron en todos los casos, que con la presencia de polen se mejoraba la cinética fermentativa y la capacidad de reproducción de las levaduras durante la fase exponencial de crecimiento. La evolución del NFA mostró que el polen es capaz de mantener e incluso aumentar los niveles de NFA durante la fermentación, sobre todo a dosis altas, ya que actúa como fuente de reserva que se va liberando posiblemente gracias a la acción solubilizante del alcohol. Como consecuencia de ello, los vinos finales elaborados con las dosis altas de polen presentaron contenidos residuales de NFA muy

altos, pudiendo ser de interés para el desarrollo de otros procesos biológicos como la crianza biológica o la fermentación maloláctica, o bien una causa de riesgo ante posibles desarrollos microbianos no deseados.

En tercer lugar, una vez finalizada la fermentación alcohólica, los vinos blancos se clarificaron y estabilizaron por frío antes de ser filtrados, para luego ser embotellados con presencia de atmósfera inerte (N_2) antes de su caracterización físico-química y sensorial. Los resultados de la caracterización físico-química indicaron que el polen no afecta de manera significativa al contenido en etanol, acidez volátil y pH, incluso a las dosis más altas. Sin embargo, en relación a los parámetros de color, se observó un desplazamiento hacia los tonos anaranjados y un incremento de la intensidad colorante, sobre todo a partir de la dosis de 1 g/L, posiblemente provocados por el aporte de compuestos polifenólicos y pigmentos del polen.

En el caso de los vinos tintos, terminada la fermentación alcohólica, se descubaron por decantación y se trasvasaron a recipientes limpios e inertes, para el desarrollo de la fermentación maloláctica. Para esta segunda fermentación, se utilizó un inóculo de bacterias ácido lácticas *Oenococcus oeni* (Laffort, Burdeos, Francia). La fermentación maloláctica se controló mediante la cuantificación del ácido málico. Los resultados mostraron un aumento de la velocidad de consumo de este sustrato con la dosis de polen, observándose así una influencia positiva del polen sobre las bacterias lácticas. Una vez finalizado el proceso, los vinos fueron decantados en frío y los vinos limpios se embotellaron con atmósfera inerte (N_2) para evitar alteraciones hasta su caracterización fisicoquímica. Los resultados mostraron que el polen, en las dosis empleadas, no afectaba a ninguno de los parámetros fisicoquímicos analizados, incluyendo los parámetros cromáticos y los pigmentos.

En cuarto lugar, mediante cromatografía de gases se analizaron y se caracterizaron los compuestos volátiles minoritarios (CG-GM) y mayoritarios (CG) de los vinos finales. Los resultados mostraron de forma general que la adición de polen produce un aumento en los compuestos volátiles totales, tanto en los vinos blancos como en los tintos, aunque los comportamientos de las familias de compuestos fueron algo diferentes en ambos tipos de vinos. En Palomino fino, los mayores incrementos se produjeron a las dosis altas de polen (10 y 20 g/L), mientras que en Riesling y Tintilla

este efecto se produjo a dosis bajas (0,1, 0,25 g/L) fundamentalmente. En los vinos tintos, la producción de compuestos volátiles totales con el polen no fue tan importante posiblemente porque fueron atenuados por la presencia de los hollejos durante la fermentación alcohólica. Los cálculos de los valores de la actividad odorante (VAO), mostraron que las dosis bajas, en todos los casos, obtuvieron los mayores valores en las series odorantes positivas (frutas y flores), mientras que con las dosis altas se obtuvieron los valores más elevados en las series odorantes negativas (grasa, herbáceo, frutos secos).

En quinto lugar, se realizó un análisis sensorial descriptivo de todos los vinos por parte de un panel de cata. Por un lado, se analizaron los atributos organolépticos generales (carácter frutal, floral, especiado, en nariz; dulzor, acidez, amargor, astringencia, salinidad, cuerpo y persistencia, en boca) y por otro, los atributos olfativos específicos para vinos blancos y los específicos para vinos tintos. Los resultados corroboraron lo observado en los VAO. Los vinos blancos y tintos elaborados con dosis bajas de polen mostraron los valores más altos en las notas a frutas y flores, siendo estos atributos los más influyentes en las notas de cata. Mientras que, con las dosis altas, en los vinos blancos se intensificaron los olores más vegetales, a cereal y a polen, y en los vinos tintos, las frutas se tornaron más maduras y/o pasificadas. Como resultado final se estableció que la dosis de polen que había producido una mejora en la calidad sensorial de los vinos blancos y tintos fue 0,25 g/L. Con esta dosis de polen, se consiguieron buenos resultados sobre la cinética fermentativa y sobre el perfil aromático de los vinos, sin producir ninguna alteración en los parámetros físico-químicos y de color de los vinos finales.

En sexto lugar, y con objeto de validar el polen frente a otros activadores comerciales, se volvieron a realizar las vinificaciones con las mismas variedades de uva (Palomino fino, Riesling y Tintilla de Rota), comparando el uso de la dosis seleccionada de polen de abeja frente a la misma dosis de un activador comercial (Laffort, Burdeos, Francia). Inicialmente se estudió el efecto sobre el NFA, y en ese sentido los resultados mostraron que tanto el polen como el activador comercial aumentaban en la misma proporción los niveles de NFA iniciales del mosto. En relación a la cinética fermentativa, en la mayoría de los casos, los vinos con polen experimentaron mejoras en comparación

con el activador comercial y con los vinos testigo. De la misma forma, los vinos con polen fueron los que presentaron los mayores incrementos en las poblaciones de levaduras. En todos los casos, la evolución del contenido en NFA mostró de nuevo que el polen puede liberar NFA, a diferencia del activador, durante la fermentación alcohólica.

Con los vinos finales se trabajó de igual forma al estudio con diferentes dosis. Los vinos tintos descubados fueron inoculados usando un pie de cuba de bacterias lácticas comerciales y una vez se inició la fermentación maloláctica, su evolución fue controlada haciendo el seguimiento del contenido en ácido málico. En todos los casos, los resultados mostraron de nuevo que el polen ejerce una influencia positiva sobre la fermentación maloláctica, siendo estos vinos los que presentaron una velocidad de consumo de ácido málico ligeramente mayor, en comparación con el activador comercial y el testigo. Una vez acabado el proceso, los vinos se clarificaron y se embotellaron con atmósfera inerte (N₂).

Los resultados de la caracterización de los vinos finales, blancos y tintos, no indicaron en ningún caso alteraciones en los parámetros físico-químicos, salvo ligeras modificaciones no significativas en los parámetros del color. Sin embargo, el análisis de los compuestos volátiles nuevamente indicó que el polen ejercía un efecto positivo sobre los vinos, incluso mejorando su composición en comparación con el activador comercial.

En los vinos blancos de Palomino fino y Riesling con polen, se advirtió un comportamiento muy similar al de los experimentos con diferentes dosis de polen. De forma general, los mayores incrementos fueron observados en las familias de los alcoholes superiores, terpenos, ésteres y aldehídos, en los vinos con polen en comparación con los testigos. Mientras que, en los vinos tintos, las familias de compuestos con mayores incrementos fueron los alcoholes superiores, fenoles, terpenos, ésteres, tioles, norisoprenoides y lactonas. El estudio de los VAO mostró incrementos en las series odorantes con el uso del polen, frente al activador comercial, que presentó descensos en la mayoría de las series, sobre todo en las mayoritarias (afrutado, floral, grasa, herbáceo y frutos secos). Al comparar la acción conjunta de las series odorantes positivas (afrutado + floral) frente a las negativas (grasa + herbácea + frutos secos), la fracción correspondiente a las series odorantes positivas de los vinos

con polen superaban el 92% con respecto al total, muy por encima del activador comercial y más aún de los vinos testigo.

En séptimo lugar, los vinos obtenidos en los experimentos comparativos fueron analizados mediante el análisis sensorial descriptivo, además de aplicar la prueba triangular (ISO 4120:2007 AENOR, 2008) y el test de ordenación (ISO 8587:2006 AENOR, 2010). En este caso, no solo se obtuvo la información descriptiva de los vinos, sino que, mediante la aplicación de la prueba triangular, se pudo conocer si existían diferencias significativas entre los vinos elaborados con polen y con activador comercial. La información obtenida tras aplicar el test de ordenación, permitió conocer el grado de aceptación de los vinos, en comparación con los elaborados con activador comercial y los testigos.

La evaluación de los atributos olfativos generales, mostró que tanto los vinos blancos como los tintos elaborados con polen, presentaron mayor intensidad en el carácter frutal y floral, en comparación con el activador comercial y el testigo. Al analizar los resultados de los atributos específicos, se observó que, en los vinos blancos, los incrementos en fruta eran debido a mayor proporción de aromas a frutas blancas, tropicales y cítricos, junto con un aumento en aromas a flores blancas. En los vinos tintos, los incrementos eran debido a mayor intensidad en frutas rojas, negras, tropicales y algo de frutas blancas, y en flores rojas y azules. Sin embargo, en todos los vinos con activador comercial, se percibió mayor intensidad aromática en frutas con hueso, fruta madura y en las notas balsámicas, por lo que estos vinos fueron peor evaluados que los elaborados con polen.

Los resultados de las pruebas triangulares mostraron diferencias significativas entre todos los vinos de Riesling y los de Tintilla de Rota (control, polen y activador comercial), sin embargo, entre los vinos control y con polen de Palomino fino, no se encontraron diferencias. Por otro lado, el test de ordenación indicó que, de forma significativa en todos los casos, los vinos con polen fueron los preferidos por los catadores (“consumidores”). En el caso de Palomino fino, los vinos con mayor preferencia fueron, en igualdad de puntuaciones, los vinos con polen y los vinos con activador comercial. Dada la finalidad de este objetivo, este resultado debe considerarse

igualmente positivo ya que estaría validando el efecto del polen en comparación a un activador comercial.

En octavo lugar, durante el desarrollo de esta tesis doctoral, se ha realizado una estancia de investigación en el centro extranjero Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV) de Burdeos (Francia), en la región de Aquitania, considerado como centro de referencia internacional en investigación en el campo de la enología. En el período de estancia, se efectuaron experimentos comparativos con polen de abeja y un activador comercial, utilizando las variedades tintas Cabernet sauvignon y Merlot. Debido a diferencias en la metodología utilizada en ambos centros de investigación, en el capítulo referente al estudio comparativo solo se han incluido los resultados de aquellos análisis realizados con metodología similar a los realizados en España. En este contexto, con las variedades tintas Francesas Cabernet sauvignon y Merlot, se estudió el impacto del uso de polen sobre los mostos, sobre la evolución de la densidad, sobre los parámetros físico-químicos y de color de los vinos finales, así como el análisis sensorial descriptivo de los atributos generales (carácter frutal, floral en nariz; dulzor, acidez, amargor, y astringencia, en boca), además de las pruebas triangulares y el test de ordenación.

EL análisis de los mostos de ambas variedades no mostró alteraciones en los parámetros físico-químicos, salvo en el contenido inicial en NFA en los mostos con polen y activador comercial, al igual que se observó en los mostos de Tintilla de Rota. Durante el desarrollo de la fermentación alcohólica, el comportamiento de la cinética fermentativa fue muy parecido en Cabernet sauvignon y Merlot, salvo antes de alcanzar la recta final, donde se observaron diferencias significativas entre el polen y el testigo en Cabernet, y entre el polen y el activador comercial junto con el testigo en Merlot. Una vez finalizada la fermentación alcohólica, se siguió la misma metodología que en Tintilla de Rota, se inoculó un pie de cuba de bacterias ácido lácticas comerciales y se controló la evolución de la fermentación maloláctica mediante el seguimiento de los niveles de ácido málico. En ambos casos se observó un comportamiento similar, tanto el testigo como el polen de abeja, presentaron los descensos de ácido málico más acusados que el activador, causado posiblemente por algún problema de adaptación del inóculo al medio. Sin embargo, en la fermentación maloláctica, el perfil de consumo fue muy parecido en todos los vinos. Cuando terminó el proceso, los vinos limpios fueron

embotellados con atmósfera inerte (N₂) y conservados en refrigeración hasta su caracterización físico-química y su análisis sensorial. Es necesario indicar que, debido al ritmo marcado por el tiempo de la estancia, los vinos de Cabernet sauvignon y Merlot no tuvieron un tiempo de fermentación alcohólica más largo y por ello, el contenido en azúcares residuales es mucho mayor que en Tintilla de Rota, aunque en ambos casos se alcanzaron niveles inferiores a 2 g/L.

Al igual que en los vinos de Tintilla de Rota, los resultados de los físico-químicos de los vinos, no mostraron diferencias elevadas entre ellos, salvo algunas en la acidez volátil y el contenido en azúcares residuales. Respecto a los parámetros de color, los vinos mostraron ligeros cambios en la componente b* con respecto a los vinos elaborados con polen. Mientras que en Cabernet sauvignon se incrementó levemente la componente amarilla, en Merlot los vinos presentaron más componente azul, cambios prácticamente imperceptibles desde una perspectiva visual. Por esta razón, las modificaciones no implicaron cambios perceptibles en los vinos desde el punto de vista enológico.

Los resultados del análisis sensorial descriptivo de los vinos mostraron, al igual que en los vinos de Tintilla de Rota, que los atributos mejor puntuados en todos los casos fueron el carácter frutal y floral de los vinos con polen, en comparación con el activador comercial y testigo. El comportamiento en boca fue un poco diferente en ambas variedades. Los vinos de Cabernet con polen y control presentaron mayor amargor, que los vinos con activador comercial. En Merlot, los vinos con mayor intensidad de amargor fueron los vinos testigo y los elaborados con el activador comercial. La sensación de astringencia no presentó un comportamiento directamente asociado a la presencia de polen, ya que, en la variedad Merlot, los vinos con mayor astringencia fueron los elaborados con el activador comercial.

Los resultados obtenidos de las pruebas triangulares mostraron que los vinos elaborados con polen y con el activador comercial presentaron perfiles sensoriales diferentes en comparación con el testigo. Sin embargo, al enfrentar los vinos con polen y con activador comercial, no se obtuvieron diferencias significativas entre los vinos. Esto puede indicar, que, a pesar de las diferencias sensoriales encontradas, existen pequeños matices en las notas de cata que pueden ser los responsables de marcar la

diferencia entre los vinos. Los resultados del test de ordenación, indicaron que los vinos de Cabernet elaborados con polen fueron preferidos de forma significativa, frente al activador y a los vinos testigo. Mientras que, en los vinos de Merlot a pesar de ser los vinos con polen de abeja los más puntuados por los catadores, no se observaron diferencias significativas. Sin embargo, estas preferencias corroboran las mejoras en la calidad del aroma de los vinos, observadas en el análisis sensorial descriptivo.

Como conclusión, se puede indicar que el uso de polen incrementa los niveles de NFA en los mostos de uva, tanto blanca como tinta. Del mismo modo, su uso favorece la cinética fermentativa y consigue aumentar la biomasa viable durante el desarrollo de la fermentación alcohólica. Cuando se utilizan dosis elevadas, los vinos blancos finales pueden alterar sensiblemente los parámetros del color, sin embargo, cuando se utiliza a dosis bajas no se producen modificaciones importantes en los vinos. Por otro lado, el uso de polen a dosis bajas, favorece e incrementa el contenido en compuestos volátiles que mejoran la calidad del perfil aromático de los vinos resultantes, tanto en blanco como en tinto, favoreciéndose la producción de compuestos implicados en las series odorantes de frutas y flores. Mientras que las dosis altas desequilibran, en cierto modo, el perfil de compuestos volátiles potenciando el carácter graso y herbáceo.

En comparación con el uso de un activador comercial, el polen de abeja presenta mejores y más completas funcionalidades para su uso en la fermentación alcohólica. Por un lado, incrementa el contenido en NFA de los mostos, mejorando tanto la cinética fermentativa como la producción de biomasa viable, y por otro, favorece la producción de una mayor cantidad de compuestos volátiles que participan en las series odorantes responsables de los aromas afrutados y florales de los vinos. Los resultados del análisis sensorial descriptivo junto con la aplicación de la prueba triangular y el test de ordenación, muestran que, en la mayor parte de los casos, los vinos con mejores características sensoriales y con mayor preferencia, han sido los elaborados con polen de abeja en comparación con el uso de activadores comerciales.

ABSTRACT

ABSTRACT

Fermentation activators are oenological products used to improve the growth conditions and decrease the stress of wine yeasts during alcoholic fermentation. High potential alcoholic degrees, easily assimilable nitrogen musts deficiency, the need for rapid implantation of culture starter, the presence of yeast growth inhibitors and the risks of reduction are some of the arguments that justify the use of fermentative activators. Most of these oenological products are prepared with chemical formulations based on ammonia nitrogen (ammonium phosphate), unsaturated fatty acids and vitamins (thiamine). Some of them contain cellulose powder and/or autolysates of yeasts that adsorb toxic substances inhibiting cell growth.

However, in this broad list there is no natural product with an optimal formulation capable of providing an integral response to all the needs during alcoholic fermentation: activation at the beginning of fermentation, increase in yeast survival at the end of the process and improvement of the production of aromatic compounds, minimizing the appearance of olfactory defects.

The new market trends focused on products of natural origin, minimally processed and respectful with the environment, gives meaning to the current thesis project, which proposes the use of bee pollen as a natural activator-nutrient in alcoholic fermentation.

The present Doctoral Thesis, with the title "Application of bee pollen as activator in the alcoholic fermentation process", has been developed within the Program of predoctoral contracts of the Own Research Plan of the University of Cádiz (2013-023/PU/EPIF-FPI-CT/CP).

The main objective of this Doctoral Thesis is to study the feasibility, as well as the positive and negative effects produced by the use of bee pollen in both white and red winemaking. The work methodology has been developed at laboratory-pilot scale. In a first stage, the effects of different doses of pollen were analyzed, both in white and red winemaking. Later, in a second stage, the use of pollen was validated against other commercial activators.

In order to comply with the objectives, set, the white vinification of the Palomino fino and Riesling varieties and the red vinification of the Tintilla de Rota variety have been carried out. Bee pollen application was carried out directly on the white musts that had been decayed or on the vintage of destemmed and milled before the alcoholic fermentation. For all varieties, different doses of pollen were used (0.1, 0.25, 1, 5, 10 and 20 g/L) according to preliminary studies by the research team.

In the first place, it was studied whether bee pollen, in its different doses, had an effect on the physico-chemical composition of white and red grape musts. Results showed that bee pollen addition leads to a significant increase in yeast assimilable nitrogen levels (YAN) in white and red grape musts, establishing a linear correlation with the pollen dose. Likewise, results did not show significant changes in density, except for the highest doses (10 and 20 g / L), where possibly there is a certain contribution of sugar, as had been observed in preliminary studies with mead. The other parameters were not altered, except for a slight increase in total acidity, in the case of Tintilla de Rota musts with the highest dose of pollen, although in all cases, the pH remained constant.

In second place, the alcoholic fermentation of the white musts and the red wine were carried out. To start the fermentation, active dry yeast inocula (ADY) and a controlled temperature of 19°C were used. During alcoholic fermentation, density, YAN, and viable biomass (yeast) were monitored. According to density and biomass results, in all cases, with bee pollen presence, the fermentative kinetics and reproductive capacity of wine yeasts during exponential phase were improved. YAN evolution showed that bee pollen is able to maintain and even increase YAN levels during alcoholic fermentation, specially at high doses, since it acts as a reserve source possibly thanks to alcohol solubilizing action. As a consequence, final wines with high bee pollen doses showed very high residual YAN contents, which may be of interest for the development of other biological processes such as biological aging or malolactic fermentation, or a cause of risk possible unwanted microbial developments.

Third, once the alcoholic fermentation was finished, the white wines were clarified and stabilized by cold before being filtered, and then bottled with the presence of an inert atmosphere (N₂) before their physical-chemical and sensory characterization.

The results of the physical-chemical characterization indicated that pollen does not significantly affect the ethanol content, volatile acidity and pH, even at the highest doses. However, in relation to the color parameters, a shift towards orange tones and an increase in the coloring intensity was observed, especially from the dose of 1 g/L, possibly caused by the contribution of polyphenolic compounds and pigments of pollen.

After the alcoholic fermentation, red wines were discovered by decanting and transferred to clean and inert containers, for the development of malolactic fermentation. For this second fermentation, an inoculum of lactic acid bacteria *Oenococcus oeni* (Laffort, Bordeaux, France) was used. The malolactic fermentation was controlled by the malic acid quantification. The results showed an increase in the speed of consumption of this substrate with the pollen dose, thus observing a positive influence of pollen on lactic acid bacteria. Once the process was finished, the wines were decanted cold and the clean wines were bottled with an inert atmosphere (N₂) to avoid alterations until their physicochemical characterization. The results showed that the pollen, in the doses used, did not affect any of the physicochemical parameters analyzed, including chromatic parameters and pigments.

Fourth, gas chromatography analyzed and characterized the volatile minority (CG-GM) and majority (CG) compounds of the final wines. The results showed in a general way that the addition of pollen produces an increase in the total volatile compounds, both in white and red wines, although the behavior of the families of compounds were somewhat different in both types of wines. In Palomino fino, the highest increases occurred at high doses of pollen (10 and 20 g/L), whereas in Riesling and Tintilla this effect occurred at low doses (0,1, 0,25 g/L), mainly. In red wines, the production of total volatile compounds with pollen was not as important, possibly because they were attenuated by the presence of the skins during the alcoholic fermentation. The calculations of the values of the odorant activity (OAV), showed that the low doses, in all the cases, obtained the highest values in the positive odorant series (fruits and flowers), while with the high doses the highest values were obtained. elevated in the negative odorant series (fatty, grassy, nuts).

Fifth, a descriptive sensory analysis of all the wines was carried out by a tasting panel. On the one hand, the general organoleptic attributes (fruity, floral, spicy, in nose;

sweetness, acidity, bitterness, astringency, salinity, body and persistence, in mouth) and on the other, the specific olfactory attributes for white wines were analysed, those specific to red wines. Results corroborated what was observed in the OAV. White and red wines made with low doses of bee pollen showed the highest values in fruits and flowers notes, these attributes being the most influential in the tasting notes. While, with high doses, white wines intensified the more vegetable, cereal and bee pollen odors, and in red wines, the fruits became more mature and/or passified. As a final result it was established 0.25 g/L of bee pollen as the better doses due to its improvement in the sensory quality of white and red wines. This bee pollen dose, good results were obtained on the fermentative kinetics and on the aromatic profile of wines, without producing any alteration in the physico-chemical and color parameters of the final wines.

Sixth, and in order to validate bee pollen against other commercial activators, the vinifications were made again with the same grape varieties (Palomino fino, Riesling and Tintilla de Rota), comparing the use of the selected bee pollen dose, against the same dose of a commercial activator (Laffort, Bordeaux, France). Initially the effect on the YAN was studied, and in that sense the results showed that both the pollen and the commercial activator increased in the same proportion the initial YAN levels of the grape musts. In relation to the fermentative kinetics, in most cases, the bee pollen wines experienced improvements compared with the commercial activator and the control wines. In the same way, wines with bee pollen showed the greatest increases in yeast populations. In all cases, the evolution of YAN content showed again that pollen can release YAN, during alcoholic fermentation, unlike the activator.

With the final wines the study was worked in the same way with different doses. The red wines discovered were inoculated using a commercial lactic acid cell starter and once the malolactic fermentation was started, its evolution was controlled by monitoring the malic acid content. In all cases, the results again showed that bee pollen exerts a positive influence on malolactic fermentation, these wines having a slightly higher malic acid consumption rate, compared to the commercial activator and the control. Once the process was finished, the wines were clarified and bottled with an inert atmosphere (N₂).

Final wines characterization results, white and red, did not indicate any alterations in the physical-chemical parameters, except for slight non-significant changes in the colour parameters. However, volatile compounds analysis indicated again that the pollen exerted a positive effect on the wines, even improving its composition in comparison with the commercial activator.

In the white wines of Palomino fino and Riesling white bee pollen wines, a behavior very similar to that of the experiments with different doses of pollen was observed. In general, the highest increases were observed in the families of the higher alcohols, terpenes, esters and aldehydes, in the wines with pollen compared to the controls. While, in red wines, the families of compounds with greater increases were higher alcohols, phenols, terpenes, esters, thiols, norisoprenoids and lactones. The study of OAV showed increases in the odorant series with the use of pollen, compared to the commercial activator, which showed declines in most series, especially in the majority (fruity, floral, fatty, grassy and nuts). When comparing the joint action of the positive odorant series (fruity + floral) against the negative ones (fatty + herbaceous + nuts), the fraction corresponding to the positive odorant series of the wines with pollen exceeded 92% with respect to the total, well above the commercial activator and even more so from the control wines.

Seventh, the wines obtained in the comparative experiments were analyzed by descriptive sensory analysis, in addition to applying the triangular test (ISO 4120: 2007 AENOR, 2008) and the ordination test (ISO 8587: 2006 AENOR, 2010). In this case, not only the descriptive information of the wines was obtained, but, through the application of the triangular test, it was possible to know if there were significant differences between the wines made with pollen and with commercial activator. The information obtained after applying the ordination test, allowed to know the degree of acceptance of the wines, in comparison with those elaborated with commercial activator and the control.

The evaluation of the general olfactory attributes, showed that both white and red wines made with pollen showed greater intensity in the fruit and floral characters, compared to the commercial activator and the control. When analyzing the results of the specific attributes, it was observed that, in white wines, increases in fruit were due

to a greater proportion of aromas of white, tropical and citrus fruits, together with an increase in white flowers aromas. In red wines, the increases were due to greater intensity in red, black, tropical fruits and some white fruits, and red and blue flowers. However, in all wines with commercial activator, greater aromatic intensity was perceived in fruit with stone, ripe fruit and in the balsamic notes, so these wines were worse evaluated than those made with bee pollen.

Triangular tests results showed significant differences between all the wines of Riesling and those of Tintilla de Rota (control, bee pollen and commercial activator), however, between the control and bee pollen wines of Palomino fino, no differences were found. On the other hand, the ordination test indicated that, in a significant way in all cases, wines with pollen were preferred by tasters ("consumers"). In the case of Palomino fino, the wines with greater preference were, in equal scores, the wines with pollen and the wines with commercial activator. Given the purpose of this objective, this result should be considered equally positive since it would be validating the effect of pollen compared to a commercial activator.

In eighth place, during the development of this doctoral thesis, a research stay has been carried out at the Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV) in Bordeaux (France), in the Aquitaine region, considered as a center of international reference in research in the field of oenology. During the research stay, comparative experiments were carried out with bee pollen and a commercial activator, using the red grapes varieties Cabernet Sauvignon and Merlot. Due to differences in the methodology used in both research centers, in the chapter referring to the comparative study only the results of those analyzes carried out with similar methodology to those made in Spain have been included. In this context, with the French red varieties Cabernet Sauvignon and Merlot, the impact of the use of pollen on musts, on the density evolution, on the physico-chemical and colour parameters of final wines, as well as the descriptive sensory analysis of the general attributes (fruity and floral characters, in nose, sweetness, acidity, bitterness, and astringency, in the mouth), in addition to the triangular and the ordination tests.

The analysis of the grape musts of both varieties showed no alterations in the physico-chemical parameters, except for the initial YAN content in the musts with pollen

and commercial activator, as was observed in the Tintilla de Rota musts. During the alcoholic fermentation development, the behavior of the fermentative kinetics was very similar in Cabernet Sauvignon and Merlot, except before reaching the final stretch, where significant differences were observed between the pollen and the control in Cabernet, and between the pollen and the activator commercial with the witness in Merlot. Once the alcoholic fermentation was finished, the same methodology as in Tintilla de Rota was followed, a culture starter of commercial lactic acid bacteria was inoculated and the evolution of the malolactic fermentation was monitored by monitoring malic acid levels. In both cases a similar behavior was observed, both control and bee pollen wines showed more pronounced malic acid decreases than the commercial activator, possibly caused by some problem of adaptation of the inoculum to the medium. However, in the malolactic fermentation, the consumption profile was very similar in all the wines. When the process was finished, clean wines were bottled with an inert atmosphere (N_2) and kept refrigerated until their physico-chemical characterization and sensory analysis. It is necessary to indicate that, due to the rhythm marked by the time of the research stay, Cabernet Sauvignon and Merlot wines did not have a longer alcoholic fermentation time and therefore, residual sugars content is much higher than in Tintilla de Rota, although in both cases levels below 2 g/L were reached.

As in Tintilla de Rota wines, physico-chemical results of the wines did not show high differences among them, except for some cases as in the volatile acidity and residual sugars content. Regarding the colour parameters, the wines showed slight changes in the b^* component with respect to the wines made with pollen. While in Cabernet Sauvignon the yellow component increased slightly, Merlot wines presented more blue component, changes practically imperceptible from a visual perspective. For this reason, the modifications did not imply perceptible changes in wines from the oenological point of view.

Descriptive sensory analysis results of final wines showed, as in Tintilla de Rota wines, the best scored attributes in all cases were the fruity and floral character of bee pollen wines, compared to the commercial activator and the control. Mouthfeel behavior was a bit different in both varieties. Cabernet sauvignon wines with bee pollen

and control presented greater bitterness, than commercial activator wines. In Merlot wines, the ones that presented the greatest bitterness were the control wines and the fermented wines with commercial activator. Astringency perception did not present a behavior directly associated with the presence of bee pollen, since, in the Merlot variety, the wines with greater astringency were those made with the commercial activator.

Triangular test results showed that bee pollen and commercial activator wines presented different sensory profiles in comparison with the control. However, when facing wines with bee pollen versus those fermented with the commercial activator, no significant differences were found between the wines. This may indicate that, despite the sensory differences found, there are small nuances in the tasting notes that may be responsible for marking the difference between the wines. Ordering test results indicated that Cabernet sauvignon bee pollen wines were significantly preferred over the commercial activator and the control wines. While, in Merlot wines, despite being bee pollen wines the most scored by tasters, no significant differences were observed. However, these preferences corroborate the improvements in the aroma quality of the wines, observed in the descriptive sensory analysis.

In conclusion, it can be indicated that the use of bee pollen increases YAN levels in grape must, both white and red. In the same way, its use favours the fermentative kinetics and manages to increase the viable biomass during the development of the alcoholic fermentation. When high doses are used, the final white wines can significantly alter the colour parameters, however, when used at low doses, no significant changes occur in the wines. On the other hand, the use of bee pollen at low doses favours and increases the volatile compounds content that improve the quality of the aromatic profile of the resulting wines, both in white and red, favouring the production of compounds involved in the odorant series of fruits and flowers. While the high bee pollen doses unbalance, in a certain way, the profile of volatile compounds enhancing the fatty and herbaceous character.

In comparison with the use of a commercial activator, bee pollen presents better and more complete functionalities for its use in alcoholic fermentation. On the one hand, it increases the YAN content of the grape musts, improving both the fermentative kinetics and the production of viable biomass, and on the other hand, it favours the

production of a greater quantity of volatile compounds that participate in the odorant series responsible for the fruity aromas and floral wines. The results of the descriptive sensory analysis together with the application of the triangular test and the ordination test show that, in most cases, wines with better sensory characteristics and with greater preference have been those made with bee pollen, compared to the use of commercial activators.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1. INTRODUCCIÓN

De manera general el mosto de uva presenta todos los nutrientes necesarios para el desarrollo de la fermentación alcohólica por parte de las levaduras (Conde et al., 2007; Togores, 2011; Walteros et al., 2013). El mosto de uva es un medio idóneo para la producción de vinos debido a que presenta:

- ✓ Una alta concentración de azúcares y otros nutrientes (nitrógeno, ácidos grasos, aminoácidos y vitaminas) que proporcionan todo lo necesario para el crecimiento y desarrollo de las levaduras.

- ✓ Una baja acidez natural y un pH, lo suficientemente alto como para favorecer el desarrollo de las levaduras durante la fermentación e inhibir el desarrollo de microorganismos contaminantes durante y al final de la fermentación.

- ✓ Un número importante de aromas y precursores aromáticos que le otorga un perfil sensorial característico de enorme complejidad.

Las principales fuentes de carbono en el mosto, se encuentran en forma de glucosa y fructosa, mientras que las fuentes de nitrógeno pueden ser muy variables, tanto en composición como en su concentración, y pueden jugar un papel importante como limitantes en el desarrollo de la fermentación (Pretorius, 2000). En los mostos de uva, existen diferentes formas nitrogenadas, tales como proteínas, polipéptidos, péptidos, aminoácidos y amonio (Zoecklein et al., 1990), además de otras sustancias que se encuentran en menor concentración, como las vitaminas, nucleótidos y nitratos (Jiranek et al., 1995). Entre todas las fuentes nitrogenadas, caben destacar el amonio y los aminoácidos que representan entre un 60-70% del nitrógeno total, siendo las fuentes de nitrógeno más rápidamente asimiladas por las levaduras (Butzke, 1998). Estos compuestos son esenciales para el crecimiento y desarrollo de las levaduras durante la fermentación alcohólica, ya que el nitrógeno, es después del carbono, el segundo elemento más utilizado durante el desarrollo y el crecimiento celular (T Garde-Cerdán et al., 2011; Vilanova et al., 2012). Los cambios en la concentración de estos compuestos

nitrogenados en los mostos, pueden repercutir de forma positiva o negativa en la calidad de los vinos resultantes (Bell and Henschke, 2005). La riqueza en compuestos nitrogenados de los mostos va a depender de factores intrínsecos, como la variedad y el clon de uva, y el tipo de suelo; y de factores externos o culturales, como el sistema de cultivo (ecológico o tradicional), la integridad del viñedo, el estado sanitario, la cepa de levadura utilizada y la temperatura de fermentación, etc. (; Henschke and Jiranek, 1993; Yáñez et al., 1998; Mateus et al., 2002; Gómez, 2004; Bell and Henschke, 2005; Barbosa et al., 2009; Garde-Cerdán et al., 2011; Sánchez-Palomo et al., 2017).

Durante la maduración de las uvas se produce una disminución en la concentración de amonio (Dubois et al., 1996), mientras que el contenido en aminoácidos aumenta (Bordeu, 1998). Un exceso de insolación en los racimos, durante la fase de sobremaduración, puede producir un efecto negativo y disminuir las concentraciones de nitrógeno total y de algunos aminoácidos. Los mostos de uvas con exceso de maduración tienen mayores problemas para el desarrollo de la fermentación debido a la falta de nitrógeno fácilmente asimilable (Pszczólkowski et al., 1985; Bordeu, 1998; Zambra, 1997). De la misma forma, cuando se aumenta sustancialmente el aporte de agua, sobre todo antes de la vendimia, o debido al uso de variedades con una alta productividad, se puede observar un efecto de “dilución” de los nutrientes (azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos, etc.) (Keller, 2005; Keller et al., 2006), dando lugar a mostos pobre en nutrientes. Muchas veces ese exceso de productividad viene determinado por el tipo del clon plantado. Es el caso de la Palomino fino, cuyos clones antiguos, fueron sustituidos mayoritariamente por otro mucho más productivos. Según indica el *Catálogo de Clones de Variedades de Vid en Andalucía* (González et al., 2004), los clones autorizados y utilizados actualmente para la producción de vinos de la variedad de Palomino fino, presentan una producción entre 5,11 - 7,03 Kg/cepa, con un grado Beaumè entre 11,00 - 11,80, una acidez total relativamente baja, entre 3,02 – 4,30 g/L de ácido tartárico y un un pH relativamente alto, entre 3,60 – 3,93. Generalmente los mostos producidos con estas variedades más productoras, precisan tanto de correcciones prefermentativas como la adición de nutrientes para el correcto desarrollo de la fermentación alcohólica. Los vinos producidos presentan generalmente bajas concentraciones en aromas varietales, y la calidad aromática de sus vinos va a estar

principalmente relacionada con los compuestos volátiles que se produzcan durante la fermentación alcohólica (Pretorius, 2000). Los alcoholes superiores, los ácidos grasos y ésteres son compuestos importantes en el aroma de los vinos, especialmente en los mostos de variedades más neutras. Estudios realizados con la variedad Monastrell, demostraron que la producción de ésteres y ácidos era mayor, cuanto mayor era el consumo de aminoácidos durante la fermentación alcohólica, y que la producción de alcoholes totales era mayor cuanto más baja era la concentración de amonio en los mostos iniciales (Garde-Cerdán et al., 2011).

Otros aspectos estudiados por diversos autores, están relacionados con la influencia del cambio climático sobre la fenología de la vid y la maduración de las uvas, llegando a la conclusión de que efectivamente existe una influencia directa sobre el desarrollo de las plantas (Briche et al., 2014; Sacchelli et al., 2016; Orduña, 2017). De forma general se ha observado que las fechas de vendimia se han ido adelantado en los últimos 10 – 30 años (Mira de Orduña et al., 2010), a pesar de que la información de archivo indica que estos cambios se han venido sucediendo desde tiempo atrás.

Diferentes estudios sobre datos de maduración de algunas regiones vitivinícolas comprendidos entre los últimos 30 – 50 años, indican que, a consecuencia de las modificaciones climatológicas, el período de maduración se ha ido adelantado entre 18-24 días con respecto a las fechas de vendimia en las que se realizaban tradicionalmente (Loira, 2014; Mira de Orduña Heidinger, 2010; Nemani et al., 2001). Otros trabajos basados en modelos climáticos utilizando la “huella ecológica” de zonas con aptitudes vitícolas como índice, predicen cambios geográficos globales entre 2041-2060 en las zonas donde actualmente se desarrolla la viticultura y zonas futuras que podrán albergar dicha práctica (Hannah et al., 2013). Esto sugiere que muchas regiones vitivinícolas tradicionales, como Burdeos y Ródano (Francia) y Toscana (Italia) entre otras, se verán disminuidas en cuanto a la extensión de su cultivo, afectando por los tanto a las variedades cultivadas. Por el contrario, en regiones más septentrionales de América del Norte y Europa aumentarán; mientras que las zonas situadas a mayor altitud y costeras se podrían mantener (Figura 1). No se han realizado trabajos de investigación tan específicas en la zona, pero según se recogen en las memorias de vendimia del Consejo Regulador del Marco de Jerez, en comparación con los históricos registrados, en los

últimos años la fecha de vendimia se ha adelantado unos 20 - 25 días, coincidiendo el periodo de maduración con los meses de más calor.

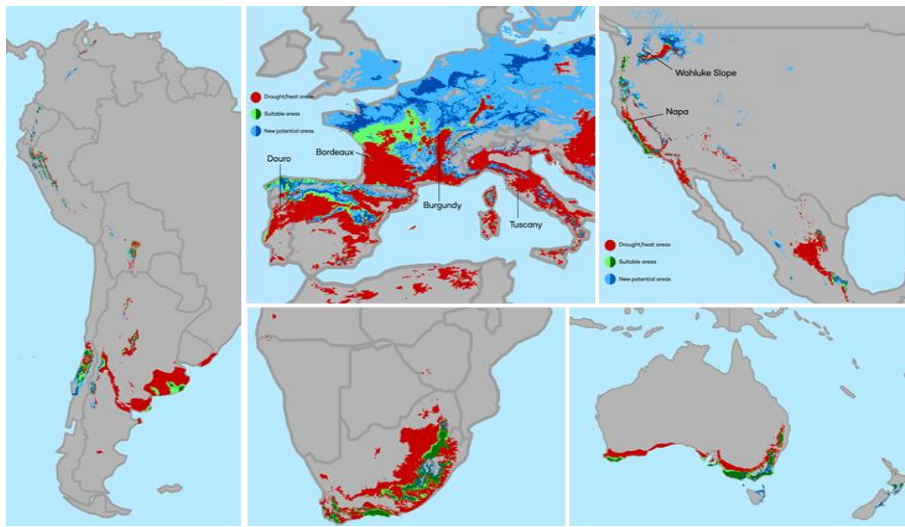


Figura 1. Proyección de cambios geográficos en la idoneidad de la viticultura a nivel global entre los períodos de tiempo actuales y 2050 (2041-2060). (Fuente: Hannah et al., 2013)

Un crecimiento acelerado de la vid y un exceso de maduración en las uvas, conllevan a la producción de mostos con grados alcohólicos potenciales más elevados (Hennessy et al., 2003; Duchêne and Schneider, 2005; Jones, 2005; Webb et al., 2005; Jones and Goodrich, 2008), con menos acidez (principalmente, ácido tartárico y ácido málico) y pH más elevados (Godden and Gishen, 2004; Jones and Goodrich, 2008), y con carencias nutricionales. Cuando además del aumento de la temperatura, existen deficiencias hídricas durante la maduración, se pueden reducir los niveles de aminoácidos (arginina), así como los pigmentos coloreados durante el envero en uvas tintas por efectos de degradación o inhibición (Conde et al., 2007).

En consecuencia, estos mostos con deficiencias nutricionales suelen tener dificultades para el arranque y el desarrollo completo de la fermentación alcohólica (Fleet, 1993; Suárez-Lepe, 1997; Webb et al., 2007), lo que conlleva generalmente a la aparición de defectos en el perfil aromático y a una pérdida de la expresión aromática y sensorial de los vinos (Hernández-Orte et al., 2005). Las correcciones de los mostos por adición de suplementos nutricionales (Bely et al., 1990a; Monteiro and Bisson, 1992), el empleo de levadura secas activas (LSA) y el control de temperatura, ayudan a minimizar estos problemas durante la fermentación alcohólica, obteniéndose productos de calidad

independientemente de la composición inicial de los mostos. El uso de LSA es una práctica habitual en la industria enológica. Suelen suministrarse en formato deshidratado y requieren de una rehidratación óptima antes de su inoculación en el mosto de uva.

Generalmente, el uso de LSA lleva implícito el uso de activadores tanto para la fase de crecimiento activo como durante la fase estacionaria (Suárez-Lepe, 1997; Bisson, 1999). En este sentido, la multiplicación celular puede verse afectada por determinadas carencias nutricionales de los mostos, especialmente en nitrógeno fácilmente asimilable (Bely et al., 1990a) y vitaminas (Bataillon et al., 1996; Ough et al., 1989). No obstante, aún no se han resuelto del todo, los problemas en los finales de fermentación derivados de las fermentaciones largas y las paradas fermentativas (Flanzy, 2000) que implican la presencia de azúcar residual en los vinos finales, y en muchos casos, a la aparición de contaminaciones bacterianas (Suárez-Lepe, 1997).

Algunos autores defienden que el perfil aromático de los vinos es uno de los factores más importantes que definen su calidad sensorial (Rapp, 1998; Vilanova et al., 2007; Niimi et al., 2017). Este perfil aromático viene determinado por los compuestos volátiles característicos de la variedad (Maarse et al., 1992) y también por los producidos por las levaduras durante la fermentación alcohólica (Styger et al., 2011).

La disponibilidad de nutrientes en el mosto no solo depende de los factores naturales (Garde-Cerdán and Ancín-Azpilicueta, 2008; Garde-Cerdán et al., 2011; Moreira et al., 2011), sino también de los factores puramente tecnológicos como el sistema de extracción del mosto, el desfangado, las maceraciones, la temperatura de fermentación, etc.) (Houtman and Du Plessis, 1985; Bataillon et al., 1996; Berthels et al., 2004; Ticozzelli and Bovo, 2005).

Garde-Cerdán et al. (2011), afirman que el consumo de los compuestos nitrogenados durante la fermentación es directamente proporcional a su concentración en el mosto, independientemente de la variedad, sistema de cultivo y estado de maduración de la uva. Por otra parte, las deficiencias en nitrógeno fácilmente asimilable de los mostos son una de las principales causas de las fermentaciones lentas o incompletas (Viegas et al., 1985; Bely et al., 1990b; Bisson, 1999) y de la formación de

compuestos azufrados tales como S-metil tioacetato, ácido 3-metiltiopropiónico, 2-mercaptoetanol, 3-mercaptopropanol, 3-etiltio-1-propanol, etc. que presentan olores desagradables (Bely et al., 1990a; Giudici and Kunkee, 1994; Jiranek et al., 1995; Moreira et al., 2011). De este modo, la cantidad de nitrógeno fácilmente asimilable inicial del mosto no sólo afecta al desarrollo de la fermentación sino también a la calidad sensorial del vino. Numerosos autores afirman que un medio rico en nitrógeno fácilmente asimilable favorece el metabolismo de las levaduras, dando lugar a más ésteres y a menos alcoholes superiores (Rapp and Versini, 1995; Hernández-Orte et al., 2005). Por el contrario, un exceso de nitrógeno podría ir en detrimento de la estabilidad microbiológica durante el envejecimiento, almacenamiento y embotellado (Beltran et al., 2004).

La baja disponibilidad de micronutrientes como vitaminas y minerales también se ha relacionado con el desarrollo de fermentaciones lentas y la aparición de defectos olfativos. La presencia de vitaminas (biotina, piridoxina, tiamina, ácido pantoténico y ácido nicotínico) son necesarias para el crecimiento de las levaduras y el desarrollo de la fermentación alcohólica (Suárez-Lepe, 1997). Autores como Gutiérrez (1993), afirman que una deficiencia en tiamina puede conllevar un menor crecimiento celular, y que una carencia de ácido pantoténico conduce a altas concentraciones de etanol junto con la aparición de aromas azufrados. Igualmente, Bataillon et al. (1996) afirman que un déficit en tiamina conduce a fermentaciones lentas y paradas fermentativas, más aún con falta de nitrógeno fácilmente asimilable. Bartra et al. (1995) ponen en evidencia que la deficiencia en piridoxina y ácido pantoténico afecta a la formación de compuestos azufrados independientemente del agente fermentativo, pH, temperatura, presencia de azufre elemental y sulfuroso añadido. Por otra parte, la presencia de ácido acético se ha relacionado con una menor capacidad de la levadura para el transporte y retención de la tiamina en fermentaciones lentas (Iwashima et al., 1973). Estudios de interacción entre nitrógeno asimilable y el empleo de biotina, han demostrado que la sinergia entre ambos factores favorece el desarrollo de las poblaciones de levaduras y mejoran la tasa de fermentación, sin embargo, las dosis necesarias de biotina para completar la fermentación pueden afectar el impacto organoléptico de los vinos (Bohlscheid et al., 2007), provocando una pérdida de la calidad sensorial.

En cuanto a los micronutrientes minerales, algunos autores observaron que, con limitaciones de calcio las levaduras aumentaban su sensibilidad al alcohol debido a que se disminuye la estabilidad de la membrana plasmática (Nabais et al., 1988). Por otro lado, se observó que la ausencia de zinc produce una disminución del 18,7% del crecimiento de las levaduras en (Gutiérrez, 1993), y una menor producción de alcoholes isoamílicos, debido a que este oligoelemento es esencial para la actividad de algunas enzimas como el alcohol deshidrogenasa, la aldolasa, la fosfatasa alcalina, etc.

Otra de las principales causas de las paradas fermentativas es la inhibición del crecimiento microbiano provocada por la alta presencia de etanol, acetaldehído, ácidos grasos de cadena corta además de otras sustancias con actividad antimicrobianas, todas ellas tóxicas para la levadura. En tales condiciones, se modifican las concentraciones relativas de diversas clases de fosfolípidos (Thomas and Rose, 1979; Beaven et al., 1982; Ghareib et al., 1988), tiene lugar un aumento de los ácidos grasos saturados (Šajbidor and Grego, 1992; You et al., 2003) y se produce una reducción del contenido global en esteroides (Walker-Caprioglio et al., 1990), como respuesta de la levadura ante una situación de estrés (Jones, 1989). Los ácidos grasos insaturados de cadena larga y los esteroides son componentes indispensables de las membranas celulares, que constituyen los soportes enzimáticos y los factores de permeabilidad celular (Suárez-Lepe, 1997; Mannazzu et al., 2008). En medios con alta concentración alcohólica, las levaduras pierden propiedades funcionales por el efecto del etanol sobre la permeabilidad y fluidez de sus membranas, lo que conlleva a una pérdida de cofactores y coenzimas necesarios para el metabolismo. El primer efecto inhibitorio (a partir de 12% v/v) es la imposibilidad de crecimiento y/o gemación, así como la reducción de la viabilidad. La capacidad de seguir fermentando a concentraciones altas de etanol depende de la cepa y de su capacidad para sintetizar ácidos grasos insaturados y esteroides, un fenómeno limitado por las condiciones anaerobias del medio. Por otra parte, durante la fermentación se generan ácidos grasos como el hexanoico, octanoico, decanoico y dodecanoico y sus ésteres, que actúan en sinergia con el etanol inhibiendo la multiplicación celular, lo que puede conducir a paradas fermentativas (Lafon-Lafourcade et al., 1984).

Otras sustancias son consideradas como posibles causantes de retrasos o incluso de paradas fermentativas, tal es el caso del acetaldehído cuando se encuentra en altos niveles (Stanley et al., 1993; Roustan and Sablayrolles, 2002), algunos metabolitos producidos por *Bacillus* y *Streptomyces* (que se encuentra en el viñedo y la bodega) (Kielhofner, 1954), las sustancias tóxicas procedentes de uvas botritizadas (Ribéreau-Gayon et al., 1979) y las propias fitoalexinas junto a los enzimas producidas por las plantas frente a infecciones (Smith and Banks, 1986; Linthorst and Van Loon, 1991).

Todas estas características hacen que el uso de activadores fermentativos sea necesario para evitar o corregir la multiplicación de la levadura durante la fermentación alcohólica y para producir una calidad sensorial óptima (Bell and Henschke, 2005; Trinh et al., 2010; Lee et al., 2013). De forma general, los enólogos suplementan de manera sistemática los mostos con fosfato amónico para prevenir los problemas de fermentación. El empleo de esta sal de amonio en pequeñas proporciones (20 – 30 g/hL) aumenta el nitrógeno fácilmente asimilable, activando la multiplicación celular y el desarrollo de las reacciones de fosforilación de la glicolisis, al inicio de la fermentación. Además, su adición favorece la producción de aromas cítricos y menos azufrados (Hernández-Orte et al., 2005). El empleo de una mezcla mineral (sulfato amónico, fosfato amónico y sulfato de magnesio) contribuye a una mejora de la fermentación aumentando el rendimiento alcohólico y reduciendo los niveles de alcoholes superiores (Kotarska et al., 2006). Sin embargo, la adición de amonio al mosto no siempre mejora el crecimiento de las levaduras ni favorece el consumo de azúcar (Kotarska et al., 2006; Strehaiano et al., 2007). Un uso inadecuado y excesivo de amonio, sin tener en cuenta las carencias nutricionales del mosto y los requerimientos de la cepa usada, pueden conducir a una disminución de la eficacia fermentativa dando lugar a una menor síntesis de alcoholes superiores, a la formación de carbamato de etilo y a una mayor inestabilidad microbiológica del vino (Kotarska et al., 2006; Strehaiano et al., 2007).

La adición de aminoácidos, combinados a veces con amonio, y su influencia sobre la fermentación alcohólica y las propiedades organolépticas de los vinos ha sido ampliamente estudiada (Hernández-Orte et al., 2005; Garde-Cerdán and Ancín-Azpilicueta, 2008; Arias-Gil et al., 2007). Los estudios muestran que la cinética fermentativa mejora con la adición de aminoácidos y que su consumo durante la

fermentación es mayor cuanto mayor es su contenido en el mosto. Por otra parte, los aminoácidos favorecen la formación de compuestos volátiles en el vino, como los ésteres y alcoholes, y disminuye los azufrados, produciéndose vinos mejor valorados sensorialmente. No obstante, aun siendo positivos muchos resultados obtenidos en laboratorio, este uso combinado de sales de amonio y aminoácidos, no siempre puede resultar suficiente en la práctica como solución a problemas en los finales de fermentaciones (Henschke, P. A. and Jiranek, 1993; Ribéreau-Gayon et al., 2003). Sin embargo, la adición en exceso de aminoácidos, puede conducir a la formación de aminas biógenas (histamina y tiramina) durante la fermentación maloláctica (Soufleros et al., 1998; Lonvaud-Funel, 2001).

El empleo de bajas dosis de vitaminas como la tiamina, biotina y ácido pantoténico pueden favorecer la multiplicación celular y acortar los tiempos de latencia. La más utilizada es la tiamina, que produce un incremento adicional (> 30%) de la población inicial de levaduras, mejorando el rendimiento alcohólico y la producción de ácidos cetónicos. Sin embargo, el empleo inapropiado de dichos cofactores puede conducir a problemas secundarios como el bajo rendimiento alcohólico o la producción excesiva de alcoholes superiores y aldehídos (Kotarska et al., 2006). El pantotenato cálcico, sin embargo, mejora la calidad de los vinos reduciendo los niveles de dichas impurezas, aunque no afecta significativamente a la cinética de crecimiento de las levaduras (Kotarska et al., 2006).

Otros compuestos como el ergosterol y el ácido oleanólico favorecen la fermentación en condiciones anaerobias porque en estas condiciones las levaduras no son capaces de sintetizarlos. Su presencia en mostos no favorece la multiplicación celular ni la cinética fermentativa, sin embargo, al ser más ricas en esteroides, mantienen por más tiempo su actividad fermentativa y se degrada mayor cantidad de azúcar al final de la fermentación (Ribéreau-Gayon et al., 2003). En muchos casos, la adición de esteroides se realiza en forma de cortezas de levaduras que además tienen la capacidad para fijar sustancias tóxicas (ácidos grasos de cadena corta) de las levaduras mejorando su supervivencia.

Actualmente, la mayoría de las empresas que comercializan levaduras vínicas deshidratadas, desarrollan activadores a base de nitrógeno, que en algunos casos

incluyen: aminoácidos, levaduras inactivadas o autolisados, ácidos grasos insaturados y algunas vitaminas como tiamina (B1); elementos cuyo déficit en el mosto puede dar lugar a fermentaciones lentas (Bataillon et al., 1996). En ocasiones se pueden encontrar acompañados de polvo de celulosa, que es susceptible de aumentar la turbidez, pero que puede actuar beneficiosamente como adsorbente de sustancias inhibitoras del medio (Flanzy, 2000). Estos productos se están empleando como activadores fermentativos o como factores de crecimiento/supervivencia de las levaduras (Ribéreau-Gayon et al., 2003).

Sin embargo, en esta amplia lista no existe ningún producto natural que pueda tener estas funcionalidades o aplicaciones. Por este motivo, el uso del polen como activador y nutriente en la fermentación alcohólica sería una buena alternativa a los activadores comerciales, al mismo tiempo que se revalorizaría como producto.

El sector apícola en España, actualmente supone el 0,44 % de la Producción Final Ganadera y el 0,17 % de la Producción de la Rama Agraria lo que se traduce a un valor anual estimado de 62 millones de euros en miel, cera y polen (MAPAMA, 2018). El papel del sector apícola es un pilar de gran importancia en la conservación del medio natural para el mantenimiento de la biodiversidad y la polinización de los cultivos. En España, más de la mitad del censo de productores de miel y polen se concentran en las cuatro comunidades autónomas, Extremadura, Andalucía, Castilla y León y la Comunidad Valenciana (MAPAMA, 2018).

De forma habitual, se suele confundir la designación polen y el polen apícola o de abeja. El polen es la unidad fecundante masculino que contiene los núcleos de fecundación de las flores y cuando se une con el gameto femenino da lugar a la formación de un fruto y a las semillas (Figura 2). Según se define en la guía “El polen. recogida, manejo y aplicaciones”, elaborada por el Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (MAPAMA), el polen es un polvillo fino, cuya coloración varía con la especie vegetal de la que procede, siendo generalmente amarillo o marrón claro, pasando por coloraciones blanquecinas, violáceas y negras y con gran diversidad de formas geométricas.

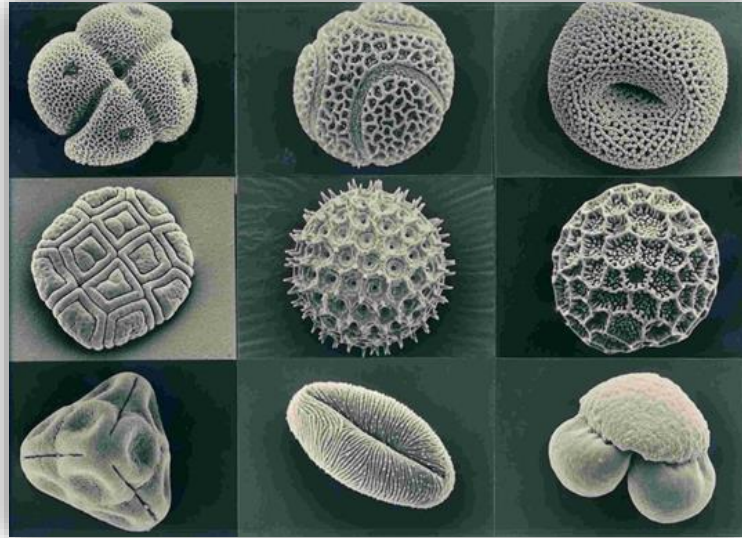


Figura 2. Granos de polen floral al microscopio (Fuente: Darts Forum)

Cuando las abejas lo recogen en las flores, lo transforman en granitos pegajosos utilizando sustancias salivares, y los adhieren a sus patas traseras y abdomen para transportarlo hacia la colmena (Figura 3).

El polen tiene un papel importante para la productividad de las colonias en la propia colmena, puesto que sirve de alimento a las larvas durante un cierto período de su desarrollo y también para las abejas jóvenes.



Figura 3. Abeja *Apis mellifera* con conglomerados de polen en las patas traseras (Fuente: Fundación amigos de las abejas).

Para la recolección de polen apícola, se coloca una trampa constituida por una rejilla con agujeros lo suficientemente anchos como para que una abeja obrera pueda atravesarlo y lo bastante estrechos como para que se desprendan parte de las bolitas de polen colocadas en la cara externa de las patas posteriores. Bajo la rejilla, se coloca

un tamiz horizontal con una malla de 3 mm de luz, que deja pasar el polen hasta un cajón donde queda recogido hasta que el apicultor realiza la recolecta (Figura 4).



Figura 4. Abejas entrando en la colmena con polen (a). Abejas pasando a través de la rejilla (b). Cajón con la recolección de polen diaria (c). Polen de abeja recolectado por el apicultor (d). (Fuente: Miel Sabinares del Arlanza)

Una vez recolectado, el polen necesita pasar por un procedimiento de desecación y limpieza para mantener su conservación durante el almacenamiento y eliminar todas las impurezas que pueda contener.

La desecación es la etapa de mayor importancia, ya que va a permitir eliminar parte del contenido en humedad del producto y evitar el desarrollo de actividad biológica durante su conservación y/o almacenaje. Esta etapa consiste en eliminar el agua que contienen los granos de polen de forma natural hasta dejarlo reducido al 8%. Este nivel de humedad no permite el crecimiento de bacterias ni hongos y además retrasa el desarrollo de ácaros.

La desecación natural es la forma más utilizada por los apicultores y consiste en una acción combinada del sol y del aire, que actúa sobre el polen extendido sobre unas bandejas con un fondo de malla fina. La desecación del polen se puede llevar a cabo también en cámaras con control de temperatura y aire, mediante la deposición del polen en bandejas apiladas (Figura 5. Derecha). El polen se va removiendo para que la desecación sea uniforme en todo el producto y la velocidad de desecación sea la idónea (Figura 5. Izquierda).

Una vez el polen ha sido desecado, antes de su conservación se realiza la limpieza de impurezas que pueden haber aparecido si el secado ha sido natural (al sol). En esta etapa, se eliminan las materias extrañas: polvo, insectos, fragmentos de insectos, secreciones, etc., que pueden acelerar el deterioro del producto al permitir un aumento de contenido en humedad además de favorecer la contaminación.



Figura 5. Izquierda: Desecación natural de polen de abeja. Derecha: Desecación en cámara con control de temperatura. (Fuente: Corona Apicultores).

La limpieza se lleva a cabo mediante el uso de mallas finas de forma manual o mediante el uso de cribas automatizadas, con bandejas vibrantes. Cuando el polen está seco y limpio, se procede a la clasificación mediante el uso de bandejas con diferentes tamaños de diámetros en función de los diferentes calibres de los gránulos. De esta manera se conserva hasta su envasado final (Figura 6).



Figura 6. Gránulos de polen apícola comercial para consumo humano.

Por lo tanto, el polen de abeja es un producto natural que se obtiene de las colmenas y constituye la fuente de proteínas, hidratos de carbono, lípidos, fibra, minerales y vitaminas, necesaria para la supervivencia de las colonias de abejas. Pero, según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), incrementar la necesidad de polen podría revertir positivamente en un aumento de las poblaciones de abejas melíferas y en este sentido, se impulsaría la producción agrícola de forma natural y sostenible gracias al trabajo de estos polinizadores.

Los compuestos mayoritarios en el polen son las proteínas y aminoácidos, los lípidos (grasas, aceites y otros derivados) y los azúcares y su composición es variable según la especie de flor de origen. Estudios comparativos de polen de varias especies florales (pisa, girasol y maíz) recolectado a mano y polen apícola (Tabla. 1), corroboran esa gran variabilidad que existe en su composición (Pawar et al., 2014).

Los resultados mostrados en la Tabla 1, indican que existen pequeñas variaciones en los contenidos en cenizas (minerales) y las grasas (lípidos). Sin embargo, existe una gran variabilidad en el contenido en proteínas, con valores entre 8,29 hasta 17,21 %, en función de la especie floral. La fracción grasa varía ampliamente en el polen, encontrándose valores entre 2,50 a 8,23 % para el polen de abeja y valores entre 2,2 y 5,62 % entre los diferentes orígenes botánicos. En el contenido en carbohidratos, donde mayor diferencia se encuentra es en el polen de abeja con valores entre 9,15 y 36,87 %, ya que las abejas añaden pequeñas porciones de miel para formar los conglomerados y poder transportarlos. En último lugar, indicar que el contenido en cenizas (minerales), es bajo en algunos casos y va a depender fundamentalmente del origen botánico del grano de polen.

Tabla 1. Comparativa entre la composición proximal de polen recogido a mano y polen de abeja.

Constituyentes	Polen recolectado a mano (%)			Polen de abeja (%)	
	Pisa	Girasol	Maíz	Promedio	Rango
Proteína	17,21	8,29	9,35	16,78	7,59 – 25,03
Grasas	5,62	3,87	2,2	5,14	2,50 – 8,23
Carbohidratos	5,23	2,4	2,7	26,2	9,15 – 36,87
Cenizas	1,72	2,4	2,7	2,12	1 – 3,92

Fuente: Pawar et al., 2014.

Los granos de polen (Figura 7), debido a su origen vegetal, tienen una pared celular constituida por una película externa llamada exina muy resistente y otra capa interna llamada intina construida de celulosa y con una estructura muy similar a las paredes celulares de las plantas (Blackmore et al., 2007).

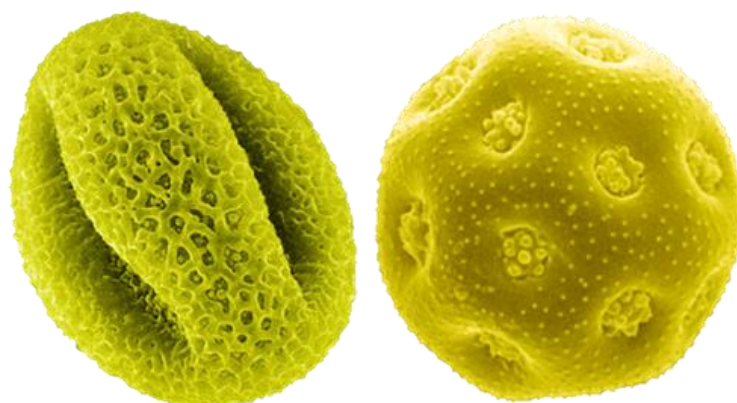


Figura 7. Captura fotografía al microscopio (SEM) de granos de polen (Willow, egg shape, a la izq. y Mouse ear, a la der.) (Fuente: Radboud University Nijmegen, Netherlands)

La composición del polen es rica en glúcidos (35%) y proteínas (25%), con un contenido en lípidos del 6% y un 3% entre minerales y vitaminas (Almeida-Muradian et al., 2005; Human and Nicolson, 2006). La fracción nitrogenada está representada mayoritariamente por aminoácidos esenciales como prolina, ácido aspártico, fenilalanina y ácido glutámico (Paramás et al., 2006). En la fracción lipídica destacan los ácidos grasos esenciales (ácido linoleico y linolénico), esteroides, fosfolípidos y carotenoides (Xu et al., 2009). En cuanto a los glúcidos, podemos mencionar la glucosa, la fructosa, la celulosa y el almidón (Almeida-Muradian et al., 2005).

La fracción mineral está representada fundamentalmente por potasio, calcio, sodio, fósforo, magnesio y azufre, y en menor proporción, algunos oligoelementos como el selenio, manganeso y zinc. Recientemente, se han puesto en evidencia sus beneficios terapéuticos potenciales y sus propiedades antioxidantes (Leja et al., 2007) y bioactivas como suplemento alimenticio funcional en nuestra dieta (Kroyer and Hegedus, 2001).

Estudios previos realizados en el campo de los hidromieles, comprobaron que la adición de polen (entre 10 - 50 g/L) reduce los tiempos de latencia frente a otros activadores y aumenta la multiplicación celular, al mismo tiempo que asegura la supervivencia de las levaduras al final de fermentación (Roldán et al., 2011). La presencia de polen, además de mejorar la calidad aromática y gustativa de los hidromieles, hace disminuir la acidez volátil causada por las desviaciones metabólicas de las levaduras (Roldán et al., 2011). En ensayos previos de laboratorio con mosto de uva, se ha podido comprobar que aplicando dosis muy bajas de polen (entre 0,1 y 1,0 g/ L), se obtienen mejoras en el proceso fermentativo y en la calidad aromática de los vinos producidos.

En este sentido, y de acuerdo a la composición físico-química que presenta, resulta de gran interés estudiar el uso o aplicación del polen de abeja multifloral deshidratado, como activador natural del crecimiento y como factor de supervivencia de las levaduras *Sacharomyces cerevisiae* en la vinificación en blanco y en tinto.

1.1 BIBLIOGRAFÍA

- Almeida-Muradian, L. B., Pamplona, L. C., Coimbra, S., & Barth, O. M. (2005). Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(1), 105–111.
- Arias-Gil, M., Garde-Cerdán, T., & Ancín-Azpilicueta, C. (2007). Influence of addition of ammonium and different amino acid concentrations on nitrogen metabolism in spontaneous must fermentation. *Food Chemistry*, 103(4), 1312–1318.
- Barbosa, C., Falco, V., Mendes-Faia, A., & Mendes-Ferreira, A. (2009). Nitrogen addition influences formation of aroma compounds, volatile acidity and ethanol in nitrogen deficient media fermented by *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 108(2), 99–104.
- Bartra, E. (1995). Aspectos microbiológicos de la elaboración del cava. In *MICROBIOLOGÍA SEM 11* (pp. 43–50).
- Bataillon, M., Rico, A., Sablayrolles, J. M., Salmon, J. M., & Barre, P. (1996). Early thiamin assimilation by yeasts under enological conditions: Impact on alcoholic fermentation kinetics. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82(2), 145–150.
- Beaven, M. J., Charpentier, C., & Rose, A. H. (1982). Production and Tolerance of Ethanol in Relation to Phospholipid Fatty-acyl Composition in *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 431. *Microbiology*, 128(7), 1447–1455.
- Bell, S.-J., & Henschke, P. (2005). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(3), 242–295.
- Bell, S. J., & Henschke, P. a. (2005). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(3), 242–295.
- Beltran, G., Novo, M., Rozès, N., Mas, A., & Guillamón, J. M. (2004). Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentations. *FEMS Yeast Research*, 4(6), 625–632.
- Bely, M., Sablayrolles, J.-M., & Barre, P. (1990a). Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in enological conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 70(4), 246–252.
- Bely, M., Sablayrolles, J. M., & Barre, P. (1990b). Description of alcoholic fermentation kinetics: its variability and significance. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41(4), 319–324.
- Berthels, N. J., Cordero Otero, R. R., Bauer, F. F., Thevelein, J. M., & Pretorius, I. S. (2004). Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *FEMS Yeast Research*, 4(7), 683–689.
- Bisson, L. F. (1999). Stuck and sluggish fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(1), 107–119.

-
- Blackmore, S., Wortley, A. H., Skvarla, J. J., & Rowley, J. R. (2007). Pollen wall development in flowering plants. *New Phytologist*, 174(3), 483–498.
- Bohlscheid, J. C., Fellman, J. K., Wang, X. D., Ansen, D., & Edwards, C. G. (2007). The influence of nitrogen and biotin interactions on the performance of *Saccharomyces* in alcoholic fermentations. *Journal of Applied Microbiology*, 102(2), 390–400.
- Bordeu, E. (1998). Niveles de amonio y nitrógeno fácilmente aprovechable para las levaduras. Algunas Experiencias en Chile. *Tópicos de Actualización En Vitivinicultura y Enología*. Colección de Extensión. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile.
- Briche, E., Beltrando, G., Somot, S., & Quénot, H. (2014). Critical analysis of simulated daily temperature data from the ARPEGE-climate model: application to climate change in the Champagne wine-producing region. *Climatic Change*, 123(2), 241–254.
- Butzke, C. E. (1998). Survey of yeast assimilable nitrogen status in musts from California, Oregon, and Washington. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49(2), 220–224.
- Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Dias, A. C. P., Tavares, R. M., Sousa, M. J., ... Gerós, H. (2007). Biochemical Changes throughout Grape Berry Development and Fruit and Wine Quality. *Food*, 1(1), 1–22.
- De Orduña, R. M. (2017). Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Research International*. Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Research International*, 43(August 2010), 1844–1855.
- Dubois, C., Manginot, C., Roustan, J. L., Sablayrolles, J. M., & Barre, P. (1996). Effect of variety, year, and grape maturity on the kinetics of alcoholic fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47(4), 363–368.
- Duchêne, E., & Schneider, C. (2005). Grapevine and climatic changes: a glance at the situation in Alsace. *Agronomy for Sustainable Development*, 25(1), 93–99.
- Flanzy, C. (2000). *Oenologie, fondamentos científicos et tecnológicos*. (TEC ET DOC). Paris: Mundi-Prensa.
- Fleet, G. H. (1993). *Wine microbiology and biotechnology*. CRC Press.
- Garde-Cerdán, T., & Ancín-Azpilicueta, C. (2008). Effect of the addition of different quantities of amino acids to nitrogen-deficient must on the formation of esters, alcohols, and acids during wine alcoholic fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, 41(3), 501–510.
- Garde-Cerdán, T., Lorenzo, C., Martínez-Gil, A. M., Lara, J. F., Pardo, F., & Salinas, M. R. (2011). Evolution of nitrogen compounds during grape ripening from organic and non-organic Monastrell–Nitrogen consumption and volatile formation in alcoholic fermentation. *Research in Organic Farming*, 123–138.
- Garde-Cerdán, T., Martínez-Gil, A. M., Lorenzo, C., Lara, J. F., Pardo, F., & Salinas, M. R. (2011). Implications of nitrogen compounds during alcoholic fermentation from some grape varieties at different maturation stages and cultivation systems. *Food Chemistry*, 124(1), 106–116.

- Ghareib, M., Youssef, K. A., & Khalil, A. A. (1988). Ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* and its relationship to lipid content and composition. *Folia Microbiologica*, 33(6), 447–452.
- Giudici, P., & Kunkee, R. E. (1994). The effect of nitrogen deficiency and sulfur-containing amino acids on the reduction of sulfate to hydrogen sulfide by wine yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45(1), 107–112.
- Godden, P., & Gishen, M. (2004). The trends in the composition of Australian wine from vintages 1984 to 2004. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal*, 20(5), 21.
- Gómez, F. A. (2004). La zonificación, terroir y la denominación de origen en el fortalecimiento de los campesinos viticultores del Valle del Sol en Boyacá. *Colombia Cultura Científica*, 1(2), 3–11.
- González, J. M., Bustillo, J. M., Lara, M., & García de Lujá, A. (2004). Catálogo de Clones de Variedades de Vid en Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesa. Junta de Andalucía. Sevilla.
- Gutierrez, L. E. (1993). Effect of some vitamins and micronutrient deficiencies on the production of higher alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientia Agricola*, 50(3), 484–489.
- Hannah, L., Roehrdanz, P. R., Ikegami, M., Shepard, A. V., Shaw, M. R., Tabor, G., ... Hijmans, R. J. (2013). Climate change, wine, and conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(17), 6907–6912.
- Hennessy, K. J., Whetton, P. H., Webb, L., & McInnes, K. L. (2003). Climate change projections for Australian viticultural regions. *Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker*, 469(40).
- Henschke, P. A. and Jiranek, V. (1993). Metabolism of nitrogen compounds. *Wine Microbiology and Biotechnology*, 77–164.
- Hernández-Orte, P., Ibarz, M. J., Cacho, J., & Ferreira, V. (2005). Effect of the addition of ammonium and amino acids to musts of Airen variety on aromatic composition and sensory properties of the obtained wine. *Food Chemistry*, 89(2), 163–174.
- Houtman, A. C., & Du Plessis, C. S. (1985). Influence du cépage et de la souche de levure sur la vitesse de fermentation et sur la concentration des composants volatils du vin. *Bull. OIV*, 58, 235–146.
- Human, H., & Nicolson, S. W. (2006). Nutritional content of fresh, bee-collected and stored pollen of *Aloe greatheadii* var. *davyana* (Asphodelaceae). *Phytochemistry*, 67(14), 1486–1492.
- Iwashima, A., Nishino, H., & Nose, Y. (1973). Carrier-mediated transport of thiamine in baker's yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 330(2), 222–234.
- Jiranek, V., Langridge, P., & Henschke, P. A. (1995). Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine-producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by assimilable nitrogen. These include: Regulation of Hydrogen Sulfide Liberation in Wine-Producing *Saccharomyces cerevisiae* Strains by Assimilable Nitrogen, 61(2), 461–467.
- Jones, G. V., & Goodrich, G. B. (2008). Influence of climate variability on wine regions in the western USA and on wine quality in the Napa Valley. *Climate Research*, 35(3), 241–254.

-
- Jones, R. P. (1989). Biological principles for the effects of ethanol. *Enzyme and Microbial Technology*, 11(3), 130–153.
- Jones, G. V. (2005). How hot is too hot. *Wine Business Monthly*, 12(2).
- Keller, M. (2005). Irrigation strategies for white and red grapes. In *Proceedings of the 33rd Annual New York Wine Industry Workshop* (pp. 102–105).
- Keller, M., Smith, J. P., & Bondada, B. R. (2006). Ripening grape berries remain hydraulically connected to the shoot. *Journal of Experimental Botany*, 57(11), 2577–2587.
- Kielhofner, E. N. (1954). The effect of antibiotic substances upon the fermentation of wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 5, 113–117.
- Kotarska, K., Czupryński, B., & Kłosowski, G. (2006). Effect of various activators on the course of alcoholic fermentation. *Journal of Food Engineering*, 77(4), 965–971.
- Kroyer, G., & Hegedus, N. (2001). Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2(3), 171–174.
- Lafon-Lafourcade, S., Geneix, C., & Riberéau-Gayon, P. (1984). Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeasts and their elimination by yeast ghosts. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(6), 1246–1249.
- Lee, P. R., Toh, M., Yu, B., Curran, P., & Liu, S. Q. (2013). Manipulation of volatile compound transformation in durian wine by nitrogen supplementation. *International Journal of Food Science and Technology*, 48(3), 650–662.
- Leja, M., Mareczek, A., Wyżgolik, G., Klepacz-Baniak, J., & Czekońska, K. (2007). Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *Food Chemistry*, 100(1), 237–240.
- Linthorst, H. J., & Van Loon, L. C. (1991). Pathogenesis-related proteins of plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 10(2), 123–150.
- Loira, I. (2014). Optimización de parámetros fermentativos de calidad en vinos tintos de zonas cálidas. Universidad Politécnica de Madrid.
- Lonvaud-Funel, A. (2001). Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 199(1), 9–13.
- Maarse, H., Visscher, C. A., Willemsens, L. C., Nijssen, L. M., & Boelens, M. H. (1992). *Volatile Compounds in Foods. Qualitative and Quantitative Data (Vol. 1)*. Zeist: TNO-CIVO Food Analysis Institute, The Netherlands.
- Mannazzu, I., Angelozzi, D., Belviso, S., Budroni, M., Farris, G. A., Goffrini, P., & Bardi, L. (2008). Behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during adaptation to unfavourable conditions of fermentation on synthetic medium: cell lipid composition, membrane integrity, viability and fermentative activity. *International Journal of Food Microbiology*, 121(1), 84–91.
- MAPAMA. (2018). Apícola. <http://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion>

- Mateus, N., Machado, J., & De Freitas, V. (2002). Development changes of anthocyanins in *Vitis vinifera* grapes grown in the Douro Valley and concentration in respective wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 1689–1695.
- Mira de Orduña Heidinger, R. (2010). Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Research International*, 7(43), 1844–1855.
- Monteiro, F. F., & Bisson, L. F. (1992). Nitrogen supplementation of grape juice. I. Effect on amino acid utilization during fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43(1), 1–10.
- Moreira, N., De Pinho, P. G., Santos, C., & Vasconcelos, I. (2011). Relationship between nitrogen content in grapes and volatiles, namely heavy sulphur compounds, in wines. *Food Chemistry*, 126(4), 1599–1607.
- Nabais, R. C., Sá-correia, I., Viegas, C. A., Novais, M., Correia, I. S. A., & Novais, J. M. (1988). Influence of Calcium Ion on Ethanol Tolerance of *Saccharomyces bayanus* and Alcoholic Fermentation by Yeasts Influence of Calcium Ion on Ethanol Tolerance of *Saccharomyces bayanus* and Alcoholic Fermentation by Yeasts, 54(10), 2439–2446.
- Nemani, R. R., White, M. A., Cayan, D. R., Jones, G. V., Running, S. W., & Coughlan, J. C., & Peterson, D. L. (2001). Asymmetric warming over coastal California and its impact on the premium wine industry. *Climate Research*, 19(1), 25–34.
- Niimi, J., Danner, L., Li, L., Bossan, H., & Bastian, S. E. P. (2017). Wine consumers' subjective responses to wine mouthfeel and understanding of wine body. *Food Research International*, 99(May), 115–122.
- Ough, C., Davenport, M., & Joseph, K. (1989). Effects of Certain Vitamins on Growth and Fermentation Rate of Several Commercial Active Dry Wine Yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 40(3), 208–213.
- Paramás, A. M. G., Bárez, J. A. G., Marcos, C. C., García-Villanova, R. J., & Sánchez, J. S. (2006). HPLC-fluorimetric method for analysis of amino acids in products of the hive (honey and bee-pollen). *Food Chemistry*, 95(1), 148–156.
- Pawar, R. S., Wagh, V. M., & Panaskar, D. B. (2014). Effect of Altered Environmental Conditions on Nutritional Quality of Bee Pollen: A Contemporary Overview. *Journal of Environmental Science, Computer Science and Engineering & Technology*, 3(4), 1814–1821.
- Pretorius, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: Novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16(8), 675–729.
- Pszczółkowski, P., Morales, A., & Cava, S. (1985). Composición química y calidad de mostos y vinos obtenidos de racimos diferentemente asoleados. *Ciencia e Investigación Agraria*, 12(3), 181–188.
- Rapp, A., & Versini, G. (1995). Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wines. *Developments in Food Science*, 37, 1659–1694.
- Rapp, A. (1998). Volatile flavour of wine: correlation between instrumental analysis and sensory perception. *Die Nahrung*, 42(6), 351–363.

-
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donéche, B., & Lonvaud, A. (2003). *Tratado de enología: Microbiología del vino. Vinificaciones*. Buenos Aires.
- Ribéreau-Gayon, P., Lafon-Lafourcade, S., Dubourdieu, D., Lucmaret, V., & Laure, F. (1979). Metabolism de *Saccharomyces cerevisiae* dans les mouts de raisin parasites par *Botrytis cinerea*. Inhibition de la fermentation; formation d'acide acetique et de glycerol. *C.R. Academie Des Sciences*, 289, 441–444.
- Roldán, A., Van Muiswinkel, G. C. J., Lasanta, C., Palacios, V., & Caro, I. (2011). Influence of pollen addition on mead elaboration: Physicochemical and sensory characteristics. *Food Chemistry*, 126(2), 574–582.
- Roustan, J. L., & Sablayrolles, J. M. (2002). Modification of the acetaldehyde concentration during alcoholic fermentation and effects on fermentation kinetics. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93(4), 367–375.
- Sacchelli, S., Fabbrizzi, S., & Menghini, S. (2016). Climate change effects and adaptation strategies in the wine sector: a quantitative literature review. *Wine Economics and Policy*, 5(2), 114–126.
- Šajbidor, J., & Grego, J. (1992). Fatty acid alterations in *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ethanol stress. *FEMS Microbiology Letters*, 93(1), 13–16.
- Sánchez-Palomo, E., Trujillo, M., García Ruíz, A., & González Viñas, M. A. (2017). Aroma profile of malbec red wines from La Mancha region: Chemical and sensory characterization. *Food Research International*, 100(March), 201–208.
- Smith, D. A., & Banks, S. W. (1986). Biosynthesis, elicitation and biological activity of isoflavonoid phytoalexins. *Phytochemistry*, 25(5), 979–995.
- Soufleros, E., Barrios, M. L., & Bertrand, A. (1998). Correlation between the content of biogenic amines and other wine compounds. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49(3), 266–278.
- Stanley, G. A., Douglas, N. G., Every, E. J., Tzanatos, T., & Pamment, N. B. (1993). Inhibition and stimulation of yeast growth by acetaldehyde. *Biotechnology Letters*, 15(15), 1199–1204.
- Strehaiano, P., Ramon Portugal, F., & Taillander, P. (2007). Effect of ammonium concentration on alcoholic fermentation kinetics by wine yeasts for high sugar content, 24, 95–100.
- Styger, G., Prior, B., & Bauer, F. F. (2011). Wine flavor and aroma. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(9), 1145–1159.
- Suárez-Lepe, J. A. (1997). *Levaduras vnicas. Funcionalidad y uso en bodega*. (Ediciones, pp. 110–111).
- Thomas, D. S., & Rose, A. H. (1979). Inhibitory effect of ethanol on growth and solute accumulation by *Saccharomyces cerevisiae* as affected by plasma-membrane lipid composition. *Archives of Microbiology*, 122(1), 49–55.
- Ticozzelli, P., & Bovo, E. (2005). La correcta gestión nutricional es la llave para una buena fermentación. *Revista Enología*, 72–74.

- Togores, J. H. (2011). Tratado de enología I. (Mundi-Pren).
- Trinh, T. T. T., Woon, W. Y., Yu, B., Curran, P., & Liu, S. Q. (2010). Effect of L-isoleucine and L-phenylalanine addition on aroma compound formation during longan juice fermentation by a co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Williopsis saturnus*. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 31(2), 116–124.
- Viegas, C. A., Sá-Correia, I., & Novais, J. M. (1985). Rapid production of high concentrations of ethanol by *Saccharomyces bayanus*: Mechanisms of action of soy flour supplementation. *Biotechnology Letters*, 7(7), 515–520.
- Vilanova, M., Siebert, T. E., Varela, C., Pretorius, I. S., & Henschke, P. A. (2012). Effect of ammonium nitrogen supplementation of grape juice on wine volatiles and non-volatiles composition of the aromatic grape variety Albariño. *Food Chemistry*, 133(1), 124–131.
- Vilanova, M., Zamuz, S., Vilariño, F., & Sieiro, C. (2007). Effect of terroir on the volatiles of *Vitis vinifera* cv. Albariño. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(7), 1252–1256.
- Walker-Caprioglio, H. M., Casey, W. M., & Parks, L. W. (1990). *Saccharomyces cerevisiae* membrane sterol modifications in response to growth in the presence of ethanol. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(9), 2853–2857.
- Walteros, I. Y., Molano, D. C., Almanza-Merchán, P. J., Camacho, M., & Balaguera-López, H. E. (2013). Efecto de la poda sobre la producción y calidad de frutos de *Vitis vinifera* L. var. Cabernet Sauvignon en Sutamarchán (Boyacá, Colombia). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 6(1), 19–30.
- Webb, L. B., Whetton, P. H., & Barlow, E. W. R. (2005). Impact on Australian viticulture from greenhouse induced temperature change. In MODSIM 2005 International Congress on Modelling and Simulation. Modelling and Simulation Society of Australia and New Zealand (pp. 170–176).
- Webb, L. B., Whetton, P. H., & Barlow, E. W. R. (2007). Modelled impact of future climate change on the phenology of winegrapes in Australia. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 13(3), 165–175.
- Yáñez, F., Duque, M. C., & Bravo de Mingo, J. (1998). Riego localizado en el viñedo. In Á. La Guardia (Ed.), Reunión Anual del Grupo de Trabajo en Experimentación en Viticultura y Enología. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (pp. 1–18).
- You, K. M., Rosenfield, C. L., & Knipple, D. C. (2003). Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3), 1499–1503.
- Zambra, L. (1997). Niveles de Amonio y aminoácidos presentes en el mosto. Comportamiento de distintas cepas de levaduras en un medio deficitario en estos elementos. Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago.
- Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C., Gump, B. H., & Nury, F. S. (1990). Nitrogenous compounds. In *Production Wine Analysis* (Springer).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las hipótesis que se plantean son las siguientes:

1. El polen de abeja puede actuar como activador fermentativo, aumentando y regulando los contenidos en nitrógeno fácilmente asimilable de los mostos, lo que puede conllevar a una reducción de los tiempos de latencia y a una mejora de la cinética de reproducción de las levaduras durante la fase exponencial de crecimiento y la fase estacionaria.
2. Es necesaria la optimización de la dosis de polen según el tipo de vinificación y la variedad de uva empleada.
3. La adición de polen de abeja en una dosis óptima puede mejorar, con respecto a un activador comercial, la cinética de desarrollo de las levaduras durante la fermentación alcohólica y el perfil sensorial de los vinos obtenidos.

Para comprobar y/o verificar las hipótesis planteadas se establece como objetivo principal el estudio del polen multifloral de abeja como activador fermentativo (o de crecimiento) y su influencia en la composición fisicoquímica y en el perfil sensorial de los vinos.

Dicho objetivo se puede desglosar a su vez en los siguientes hitos u objetivos específicos:

1. Estudio y evaluación a escala laboratorio-piloto de la influencia de la adición de polen en la vinificación en blanco.
2. Estudio y evaluación a escala laboratorio-piloto de la influencia de la adición de polen en la vinificación en tinto.
3. Validación a escala laboratorio-piloto de los efectos de la influencia de polen en la vinificación en blanco y en tinto, en comparación con un activador comercial.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y METODOS

A continuación, se detallan cada una de las materias primas y los materiales que se han utilizado durante el desarrollo de cada etapa de esta tesis doctoral.

3.1 MATERIAS PRIMAS

3.1.1 Variedades de uva blanca

En la vinificación en blanco se han empleado las variedades blancas Riesling y Palomino fino. La primera de ellas es una variedad de origen germano de ciclo corto, muy adaptada a climas fríos y presenta un potencial aromático muy intenso (Cabello et al., 2011), produciendo muy buenos resultados en esas latitudes. Sin embargo, esta variedad cultivada en una parcela de la comarca de Jerez con un clima predominantemente cálido, suele madurar anticipadamente y dar producciones elevadas. Generalmente los mostos presentan una deficiencia en nitrógeno fácilmente asimilable y los vinos suelen tener un perfil aromático poco intenso y de muy baja calidad. Por ello, puede resultar de interés en este caso, la aplicación del polen en la vinificación.

Por otra parte, la variedad Palomino fino empleada en este trabajo, pertenece a unos de los clones con vocación productiva que se han plantado en el Marco del Jerez en los últimos tiempos, el clon Palomino “California”. Este clon suele dar mostos con un alcohol potencial medio bajo (10,5 - 12 %), y suele dar vinos muy neutros desde el punto de vista aromático, con una tendencia importante a la aparición de olores de reducción (Cruz et al., 1996). En este caso, la presencia de polen, y su aporte equilibrado en aminoácidos y ácidos grasos, puede contribuir a mejorar los vinos desde el punto de vista sensorial. Para el desarrollo de las experiencias con vinos blancos, se contó con la participación de la bodega Cooperativa Andaluza, Unión de viticultores chiclaneros, de Chiclana de la Frontera, y con la participación de bodegas privadas de Arcos de la Frontera y Jerez de la Frontera.

3.1.2 Variedades de uva tinta

En la vinificación en tinto se ha empleado la variedad autóctona, Tintilla de Rota, una variedad casi olvidada que durante los siglos XVIII y XIX gozaba de prestigio y reconocimiento por los vinos que se elaboraban con ella. Históricamente ha sido la variedad tinta que se ha plantado en Andalucía, ya en 1807 fue citada por Simón de Roxas Clemente en “Ensayo sobre las variedades de la Vid común, que vegetan en Andalucía”, localizando su cultivo en las localidades de Sanlúcar de Barrameda, Chipiona, Jerez, Arcos, Trebujena, Espera y Chiclana, además de Conil, Tarifa y Málaga, donde se encontraban algunas cepas aisladas. No existe conocimiento de su cultivo en grandes extensiones, pero sí que fue una de las más importantes y conocidas tanto en la villa de Rota, así como en diversos municipios de los alrededores. La mayor parte de las producciones de esta variedad eran destinadas a los mercados más selectos. Actualmente, se ha vuelto a conseguir elaborar vinos de alta gama y muy afamados, dado el elevado nivel de calidad que puede llegar a alcanzar durante la maduración, generando como resultado unos magníficos vinos y de gran potencial.

Generalmente, esta variedad se está vinificando con elevados grados alcohólicos potenciales (14 – 15 % Alc. vol.), para poder alcanzar una buena maduración fenólica tanto en el hollejo como en las pepitas. Por esta circunstancia, en algunas campañas se han producido ralentizaciones de la fermentación e incluso paradas fermentativas que han sido difíciles de resolver. En estos casos, el uso de polen se puede testear como factor de supervivencia de levaduras en las fases finales de fermentación. Para el desarrollo de la vinificación con la variedad Tintilla de Rota, se contó con la ayuda de las bodegas Luis Perez, de Jerez de la Frontera, que facilitó las uvas necesarias para el desarrollo de las experiencias.

Durante el período de investigación en el centro extranjero Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV) de Burdeos (Francia), se emplearon las variedades tintas: Merlot y Cabernet sauvignon. Ambas variedades tienen su origen en el sudoeste de Francia, en la región de Burdeos, donde están consolidadas como cepas tradicionales de carácter autóctono. Tanto la Merlot como la Cabernet sauvignon son consideradas las

variedades tintas más expandidas a nivel mundial, y su cultivo puede encontrarse en muchas regiones vitivinícolas del planeta (Europa, Sudáfrica, Australia, Sudamérica, América central y Estados Unidos, entre otras). La variedad Merlot se caracteriza por tener una maduración temprana, y por ello, es una variedad que tiene muy buenos resultados para la elaboración de vinos jóvenes, redondos con cuerpo, ricos en contenido alcohólico y color. Sus vinos suelen ser relativamente poco ácidos y poco astringentes, por sus taninos suaves, dando lugar a vinos con aromas complejos y elegantes. Cabernet sauvignon es una variedad más tardía que Merlot, que suele dar lugar a vinos con estructuras tánicas muy interesantes y de color estable siempre que se alcancen buenas maduraciones. Normalmente, los vinos elaborados con Cabernet sauvignon suelen ser vinos aptos para el envejecimiento.

En ocasiones, estas variedades han presentado problemas de falta de maduración, dando como resultado graduaciones alcohólicas bajas (en torno a 9,5 -10 % Alc.) con un perfil aromático “muy verde” o inmaduro. Por el contrario, las sobremaduraciones producidas por períodos de calor excesivo, sobre todo en el caso de la Merlot (que coincide la maduración con el periodo de más calor) puede dar lugar a grados alcohólicos potenciales muy elevados y falta de acidez, que, junto con la disminución de nutrientes en los mostos, puede ser un factor crítico a la hora de realizar una correcta fermentación alcohólica, incluso llegando a presentar problemas para el desarrollo de la fermentación maloláctica. En este sentido, se estudió el efecto del polen como nutriente fermentativo en la vinificación en tinto de las variedades Cabernet sauvignon y Merlot. Para el desarrollo de las vinificaciones, se contó con la propia producción de uva perteneciente al instituto de investigación.

3.1.3 Levaduras fermentativas y bacterias lácticas.

Las levaduras empleadas tanto en las vinificaciones en blanco (Palomino fino y Riesling) como en tinto (Tintilla de Rota) fue la cepa comercial liofilizada *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin 71B® (Lallemmand, Barcelona, España), caracterizada por ser neutra desde el punto de vista aromático, con alto requerimiento en nitrógeno fácilmente asimilable y con resistencia a grados alcohólicos elevados. En todos los casos la levadura

fue inoculada a una dosis de 10 g/hL siguiendo el protocolo comercial. En Burdeos se utilizó la cepa ZYMAFLORE® FX10 (Laffort, Burdeos, Francia) de *Saccharomyces cerevisiae* (Laffort, Burdeos, Francia), para la elaboración de vinos tintos de Merlot y Cabernet sauvignon.

Tras la fermentación alcohólica de las variedades tintas, los vinos resultantes se sometieron a una fermentación maloláctica. Las bacterias lácticas empleadas en todos los casos fue *Oenococcus oeni* S11B P2 Instant (Laffort, Burdeos, Francia).

3.1.4 Polen de abeja multifloral

En todos los ensayos de vinificación se empleó polen de abeja deshidratado multifloral comercial (Valencia, España), previamente caracterizado por el equipo investigador (% proteína, % glúcidos, % lípidos, % humedad, aminoácidos, ácidos grasos, cenizas, K, Na y Ca), que contiene un 6% de humedad y un 99,8 % de pureza en peso seco. Antes de su uso, el polen se trituró en un molino (Thermomix TM31 de Vorwerk, Wuppertal, Alemania) y luego se almacenó en frascos de vidrio oscuro en un desecador a vacío (marca, país) hasta el momento de su utilización.

3.1.5 Nutrientes comerciales

Para el estudio comparativo contemplado en el 3^{er} hito, se empleó un activador comercial específico para cada vinificación. En las vinificaciones en blanco se utilizó SUPERSTART® BLANC (Laffort, Burdeos, Francia), cuya formulación es específica para las condiciones de vinificación de vinos blancos y rosados. Es un producto preparado a base de levaduras, rica en vitaminas, minerales, ácidos grasos de cadenas largas y esteroides, según las indicaciones del fabricante. Para las vinificaciones en tinto, se utilizó SUPERSTART® ROUGE (Laffort, Burdeos, Francia), un preparado a base de levaduras inactivadas y autolisados de levaduras seleccionados, rica en vitaminas, minerales, ácidos grasos y esteroides (ergosterol).

3.2 EQUIPAMIENTO A ESCALA LABORATORIO-PILOTO

Las vinificaciones se realizaron en la planta piloto que dispone el grupo de investigación, que consta de los siguientes equipos: despalilladora-molturadora, prensa hidráulica de agua, 10 depósitos de metacrilato para el desfangado estático, 12 fermentadores de vidrio (Álamo) de 5 litros de capacidad dotados de camisas para control de temperatura, un intercambiador de calor modelo LAUDA WKL 700 permitiendo realizar las vinificaciones en torno a los 19 °C, filtro de placas, así como todos los elementos y accesorios necesarios para las distintas operaciones y procesos.

Para los análisis que implicaron la técnica de cromatografía de gases (CG), se empleó el cromatógrafo con el que cuenta el grupo de investigación. Cromatógrafo de gases modelo HP 5890 Serie II (Hewlett Packard, Agilent Technologies España S.L., España). con un inyector automático (modelo HP7673A) y detector FID, equipado con una columna capilar Carbowax 20 (50 m x 0,25 mm ID; 0,25µm).

En la determinación de los compuestos volátiles minoritarios se utilizaron un cromatógrafo de gases con un detector de masas acoplado (GC-MS), usando un equipo GC-MS (Modelo AGC-MS Voyager® (Termost, Milán, Italia), que pertenece a la división de Espectrometría de masas del Servicio Central de Ciencia y Tecnología (SCCyT) de la Universidad de Cádiz.

3.3 METODOS

La metodología de investigación ha sido coordinada por los directores del presente plan de investigación D. Ildefonso Caro Pina y D. Víctor Manuel Palacios Macías, y se ha desarrollado en el laboratorio que pertenece al grupo de investigación Ingeniería y Tecnología de Alimentos (AGR-203) con sede en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Cádiz.

A continuación, se desglosa cada una de las actividades que se han desarrollado en cada uno de los hitos específicos que componen el objetivo principal de esta tesis doctoral.

3.3.1 Estudio y evaluación a escala laboratorio-piloto de los efectos de la adición de polen en la vinificación en blanco.

En este primer hito se ha estudiado, desde el punto de vista enológico el uso de polen a diferentes dosis como activador del crecimiento de levaduras y sus efectos globales y específicos en la vinificación en blanco, con objeto de encontrar la dosis óptima que establezca los mejores resultados tanto en la cinética fermentativa como en el perfil sensorial de los vinos elaborados.

Para el cumplimiento del primer hito se siguió la metodología que se describe a continuación:

3.3.1.1 Evaluación de los efectos sobre las propiedades físico-químicas del mosto.

En los distintos ensayos se emplearon mostos de uva Palomino fino procedente de la bodega Cooperativa Andaluza, Unión de Viticultores Chiclaneros (Chiclana de la Frontera, Cádiz), y mostos de uva Riesling de una bodega de Arcos de la Frontera, Cádiz. Los mostos de uva fueron transportados en garrafas de plástico de 25 L. El mosto se obtuvo sin agregar anhídrido sulfuroso y se almacenó a -20 °C hasta el comienzo de los experimentos. Una vez que el mosto de uva se descongeló y se atemperó a aproximadamente 10 °C, se añadió metabisulfito de potasio (Sigma-Aldrich Chemical S.A., Madrid, España) (hasta 80-90 mg/L), el pH se corrigió hasta un valor de 3,2-3,3 mediante la adición de ácido tartárico (Sigma-Aldrich Chemical S.A., Madrid, España).

El mosto de uva sulfitado se desfangó por gravedad en depósitos de metacrilato a una temperatura de 10 °C durante 24 h. Una vez desfangado, el mosto claro se homogenizó y se distribuyó en fermentadores de vidrio de un volumen de 5 L provistos de camisas de refrigeración para controlar la temperatura durante la fermentación alcohólica en los ensayos a escala de laboratorio-piloto.

Se emplearon seis dosis diferentes de polen: 0,10, 0,25, 1, 5, 10 y 20 g/L en los ensayos, todos ellos realizados por triplicado para garantizar la significancia estadística. Una vez homogeneizado y disuelto el polen en los fermentadores, se analizaron los efectos sobre las propiedades físico-químicas del mosto: pH, acidez total, turbidez, nitrógeno fácilmente asimilable y grado alcohólico potencial o °Be.

3.3.1.2 *Análisis de los efectos sobre la cinética de crecimiento de las levaduras durante la fermentación alcohólica.*

Para el desarrollo de las vinificaciones en blanco, se estableció una temperatura de fermentación entre 18 - 19 °C, controlada mediante un intercambiador de calor. Una vez añadido el pie de cuba, se inició el estudio de los efectos del polen sobre la cinética de crecimiento de las levaduras mediante medida de biomasa y de la cinética fermentativa mediante medida de densidad y el NFA. Se tomaron muestras representativas (de unos 5 mL) cada 12 horas en los primeros 4 días y, en los días siguientes, cada 24 horas para controlar y registrar el crecimiento de las levaduras en las distintas fases de desarrollo: latencia, exponencial, estacionaria y muerte. Para controlar el final de fermentación se realizó un análisis de los azúcares residuales hasta alcanzar valores < 2 g/L.

3.3.1.3 *Evaluación de los efectos sobre las propiedades físico-químicas del vino.*

Una vez finalizada la fermentación alcohólica, los vinos fueron refrigerados hasta unos 6°C y mantenidos a esta temperatura durante uno o dos días. A continuación, fueron tratados con gelatina (Agrovin, S.A., Córdoba, España) (4 g/hL) y posteriormente con bentonita (Agrovin, S.A., Córdoba, España) (40 g/hL). En último lugar, todos los vinos

fueron filtrados con filtro de 1 μm y 0,22 μm , para eliminar partículas en suspensión y restos de levaduras, respectivamente, para luego ser embotellados usando atmósfera de nitrógeno como inertizante.

Una vez obtenidos los vinos finales, se realizó la caracterización de los parámetros físico-químicos: pH, acidez total, turbidez, nitrógeno fácilmente asimilable, color (Absorbancia a 420 nm), coordenadas cromáticas CIELab, grado alcohólico, sulfuroso total y libre y acidez volátil.

3.3.1.4 Evaluación de los efectos sobre los compuestos volátiles del vino y sus correspondientes VAO.

3.3.1.4.1 Análisis de los compuestos volátiles mayoritarios

Los principales compuestos volátiles (acetaldehído, acetato de etilo, metanol, 2-propanol, n-propil alcohol, isobutanol y 3-metilbutanol) se analizaron usando un GC equipado con un detector FID (HP 5890 Serie II) en una columna Carbowax 20M (50 m, 0.25 mm DI, 0.25 μm). Las temperaturas del inyector y del detector fueron 175 °C y 225 °C, respectivamente, usando hidrógeno (1 mL/min) como gas portador. La temperatura del horno fue de 35 °C durante los primeros 5 min, con una rampa de 5 °C/min hasta que la temperatura alcanzó 100 °C. Se realizó una inyección directa de 5 μL de muestra destilada. Para la identificación y cuantificación de los principales compuestos volátiles, se añadió 4-metil-2-pentanol a 783 mg/L, ya que se usaron compuestos estándares internos y estándares puros (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España) para determinar la retención tiempos y curvas de calibración.

3.3.1.4.2 Análisis de los compuestos volátiles minoritarios

Los compuestos volátiles minoritarios libres se determinaron por análisis semicuantitativo de GC-MS (Modelo AGC-MS Voyager® (Termostequest, Milán, Italia), después de la extracción en fase sólida (SPE) siguiendo el método descrito por Di Stefano (1991). Se empleó una columna Supelcowax-10 (L 60 m, ID 0,32 mm, PD 0,5 μm) y las condiciones de operación del GC fueron las siguientes: temperatura del inyector y del

detector, 300 °C; temperatura del horno, 40 °C durante 5 min (seguido de una rampa de 2 °C/min, y 200 °C durante 5 min); volumen de muestra, 2 µL en modo splitless (40 s); y gas portador, He (1 mL/min). Las condiciones de MS fueron las siguientes: modo de impacto electrónico (EI +) a 70 eV; temperatura inicial, 220 °C; temperatura de la interfaz, 320 °C; índice de escaneo, 1 escaneo/s; y rango de adquisición de masa de 45-400 m/z. Se realizaron análisis semicuantitativos, asumiendo un factor de respuesta igual a uno.

3.3.1.4.3 Análisis de los valores de actividad del olor (VAO)

Los valores de actividad del olor (VAO) de los compuestos volátiles se calcularon como la relación entre la concentración de cada compuesto y su umbral de percepción (Anexo. Tabla 33). Los compuestos volátiles se agruparon según la serie aromática predominante o principal descrita en la literatura (Perestrelo et al., 2006; Duarte et al., 2010; Slegers et al., 2015; Lukić et al., 2016). En este trabajo, se establecieron nueve series aromáticas para describir el perfil aromático del vino: afrutado, dulce, graso, floral, herbáceo, especiado, terroso y hongos, químico y frutos secos. Según algunos autores (Peinado et al., 2004), este procedimiento permite relacionar la información cuantitativa obtenida del análisis químico con los resultados del análisis sensorial, obteniendo un perfil organoléptico de los vinos basados en criterios objetivos.

3.3.1.5 Evaluación desde el punto de vista sensorial de los vinos resultantes.

Por último, todos los vinos “ensayos” y “testigo” (filtrados por placas esterilizantes) fueron sometidos a un análisis sensorial mediante un panel de cata constituido por 10 personas como mínimo, entre 30 y 50 años de edad aproximada (50 % hombres y 50 % mujeres), con experiencia contrastada en cata y evaluación de vinos.

El análisis sensorial se realizó en cabinas individuales con iluminación controlada, ubicadas en la sala de cata del Instituto de Investigaciones Vitivinícolas y Agroalimentarias (IVAGRO, Puerto Real, Cádiz). Para cada catador se presentaron 50 mL de vinos en vasos de degustación estándar (ISO 3591, 1997) y se cubrieron con vidrio de

reloj para minimizar la evaporación de compuestos volátiles. La evaluación sensorial de todos los vinos se realizó entre tres o cinco días después del embotellado aproximadamente. Cada vino fue codificado con un código aleatorio de 3 dígitos y catado de acuerdo con el orden indicado, de izquierda a derecha en todos los casos. Los vinos se sirvieron a temperatura ambiente (20 ± 2 °C) y las degustaciones se llevaron a cabo entre las 11:00 a.m. y las 14:00 p.m.

Cada catador recibió una ficha de cata específicas para evaluar las características visuales (intensidad y calidad), olfativa (calidad e intensidad) y gustativa (calidad e intensidad), así como la aceptabilidad general del producto (Anexo. Tablas 38 y 39). Cada característica se calificó de 0 a 10 de acuerdo con el aumento de la intensidad, utilizando una escala de 10 puntos. También se consideraron algunos aspectos de interés tales como olor característico (floral, afrutado, vegetal, especiado, balsámico, frutos secos y polen), sabores (acidez, salinidad, dulzor, amargor) y sensación en la boca (suavidad, persistencia, retrogusto, calor). Todos los atributos sensoriales utilizados en las hojas de degustación se seleccionaron teniendo en cuenta los descriptores de cata de los vinos blancos de acuerdo con Jackson (2009).

3.3.1.6 Evaluación de los resultados mediante análisis estadísticos multivariantes. Establecimiento de las dosis óptimas recomendadas de polen en vinificación en blanco.

Una vez obtenidos todos los resultados analíticos, se realizó un análisis estadístico multivariante (análisis de correlación, ANOVA y Análisis de Componentes Principales (ACP)) con el fin de obtener conclusiones precisas y poder establecer un rango de dosis recomendadas de polen para su posterior uso en la vinificación en blanco.

3.3.2 Estudio y evaluación a escala laboratorio-piloto de los efectos de la adición de polen en la vinificación en tinto.

En este segundo hito se pretende, igualmente estudiar desde el punto de vista enológico el uso de polen a diferentes dosis como activador del crecimiento de levaduras y sus efectos globales y específicos en la vinificación en tinto, con objeto de

encontrar la dosis óptima que establezca los mejores resultados tanto en la cinética fermentativa como en el perfil sensorial de los vinos producidos

3.3.2.1 Evaluación de los efectos sobre las propiedades físico-químicas del mosto.

La vendimia recolectada, se atemperó a 20 °C aproximadamente y se sometió a un despalillado y molturado manual suave. La pasta resultante se sulfitó a razón de 25 mg/Kg de uva sin realizarse ninguna corrección de pH. A continuación, se llenaron los fermentadores con la misma proporción en peso de mosto y partes sólidas, y se añadió la dosis de polen correspondiente (0,10, 0,25, 1, 5, 10 y 20 g/L). Al igual que en la experimentación con los mostos blancos, se estudiaron por triplicado seis dosis diferentes de polen, hasta un máximo de 20 g/L, además de los testigos sin adición.

Antes de iniciar la fermentación y una vez añadido el polen, se estudiaron sus efectos sobre las características físico-químicas del mosto: pH, acidez total, nitrógeno fácilmente asimilable y concentración de azúcar (densidad).

3.3.2.2 Análisis de los efectos sobre la cinética de crecimiento de las levaduras durante la fermentación alcohólica.

A continuación, se añadió el pie de cuba con la Levadura Seca Activa (LSA) seleccionada a todos fermentadores en una dosis de 10 g/hL. A partir de aquí, se siguió el mismo protocolo descrito para blancos (apartado 3.3.1.2).

3.3.2.3 Evaluación de los efectos sobre las propiedades físico-químicas del vino fermentado.

Una vez terminada la fermentación alcohólica (azúcares residuales < 2 g/L), los vinos se descubaron y se sometieron a una fermentación maloláctica, empleando un inóculo de bacterias lácticas comerciales. Para considerar que la fermentación maloláctica alcanzó su final y por tanto se agotó mayoritariamente el contenido en ácido málico, se realizó un control del nivel de ácido málico durante el proceso. Finalizada la fermentación maloláctica, los vinos fueron sometidos a los siguientes análisis físico-

químicos: intensidad del color, tonalidad, pH, acidez total, turbidez, nitrógeno fácilmente asimilable, coordenadas cromáticas CIELab, grado alcohólico, índice de polifenoles totales (IPT), sulfuroso total y libre y acidez volátil.

3.3.2.4 Evaluación de los efectos sobre los compuestos volátiles del vino y sus correspondientes VAO.

Se siguió la misma metodología y plan de trabajo que descrito para los vinos blancos (apartado 3.3.1.4).

3.3.2.5 Evaluación desde el punto de vista sensorial de los vinos resultantes.

Se siguió el mismo protocolo expuesto para los vinos blancos (apartado 3.3.1.5).

3.3.2.6 Evaluación de los resultados mediante análisis estadísticos multivariantes. Establecimiento de las dosis óptimas recomendadas de polen para su uso en vinificación en tinto.

Se siguió la misma metodología detallada en el apartado para os vinos blancos (apartado 3.3.1.6).

3.3.3 Validación a escala laboratorio-piloto de los efectos de la adición de polen en la vinificación en blanco y en tinto, en comparación con otros activadores comerciales.

Finalizada la fase de laboratorio-piloto de caracterización de los efectos de la adición de polen en la vinificación en blanco y en tinto de las diferentes variedades, y establecidas las dosis óptimas de aplicación recomendadas, se desarrolló la fase de validación y comparación del polen (en su dosis óptima) con otros activadores comerciales a escala laboratorio- piloto.

En los ensayos comparativos se emplearon las mismas variedades de uva y se siguieron los mismos protocolos establecidos en los dos primeros hitos. Se emplearon las dosis óptimas de polen establecidas en cada vinificación y las fermentaciones se

realizaron con levaduras secas activas e inóculo de bacterias lácticas en caso del vino tinto.

Para la validación en comparación con otros activadores comerciales se siguieron los mismos pasos y tareas establecidas en la fase laboratorio-piloto que, de forma resumida, se describen a continuación:

3.3.3.1 Evaluación de los efectos sobre las propiedades físico-químicas del mosto.

Se siguió el mismo protocolo expuesto para mostos blancos (apartado 3.3.1.1) y para mostos tintos (apartado 3.3.2.1).

3.3.3.2 Análisis de los efectos sobre la cinética de crecimiento de las levaduras durante la fermentación alcohólica

Se siguió el mismo protocolo expuesto para la fermentación alcohólica de mostos blancos (apartado 3.3.1.2) y tintos (apartado 3.3.2.2) respectivamente.

3.3.3.3 Evaluación de los efectos sobre las propiedades físico-químicas del vino.

Se siguió el mismo protocolo expuesto para vinos blancos (apartado 3.3.1.3) y vinos tintos (apartado 3.3.2.3).

3.3.3.4 Evaluación de los efectos sobre los compuestos volátiles del vino y sus correspondientes VAO.

Se siguió el mismo protocolo expuesto para los vinos obtenidos de mostos blancos (apartado 3.3.1.4) y tintos (apartado 3.3.2.4) respectivamente.

3.3.3.5 Evaluación desde el punto de vista sensorial de los vinos resultantes.

Finalmente, al igual que se realizó con los vinos blancos, se cataron y valoraron los vinos tintos producidos, empleando el protocolo descrito para los vinos blancos y tintos. En este caso, además del análisis sensorial descriptivo, se realizaron pruebas

triangulares (ISO 4120:2007 AENOR, 2008) y test de ordenación (SO 8587:2006 AENOR, 2010), para conocer tanto si existían diferencias entre los vinos, así como el grado de aceptación de los mismos. En todos los casos, las evaluaciones sensoriales la realizaron un panel de catadores ($n > 20$) con extensa experiencia y familiarizados con perfiles sensoriales de los vinos elaborados.

3.3.3.6 Evaluación de los resultados mediante análisis estadísticos multivariantes.

Se seguirá el mismo protocolo expuesto para los vinos blancos (apartado 3.3.1.6) y tintos (apartado 3.3.2.6).

3.4 Determinaciones analíticas de los mostos

La caracterización físico-química, tanto de los mostos como de los vinos finales, se realizó analizando cada uno de los parámetros que se detallan a continuación.

3.4.1 Acidez total

La acidez total fue determinada por volumetría siguiendo el método propuesto por Barceló (1990), analizando 25 mL de muestra, y NaOH 0,1 N como valorante, empleando fenolftaleína como indicador (valoración potenciométrica).

3.4.2 Grado Baumé (°Bè)

La determinación del °Bè se realizó utilizando 250 mL de mosto, en una probeta termostaticada a 15 °C, mediante un aerómetro calibrado Dujardin-Salleron (Laboratoires Dujardin-Salleron, Francia).

3.4.3 pH

La determinación del pH se realizó por medida directa del mosto o vino en pH-metro digital (2001 CRISON, Crisol Instruments, S.A., Barcelona, España) provisto de electrodo selectivo (Cat. 52-02, CRISON) y compensador de temperatura automático.

3.4.4 Turbidez

La turbidez se evaluó por nefelometría, realizando una medida directa del mosto o vino en un nefelómetro modelo AN 2100 (HACH COMPANY, Loveland, USA), expresando los resultados en unidades nefelométricas (NTU).

3.5 Metodología de análisis durante la fermentación alcohólica

3.5.1 Densidad

La densidad de las muestras se determinará por medida directa con un densímetro DMA 48 (ANTOM-PAAR, Net IterLab SAL, Madrid, España). Antes de realizar la medida, las muestras fueron centrifugadas con una centrífuga Microfriger-BL (SELECTA, Barcelona, España) con control de temperatura, desgasificadas en ultrasonidos (SELECTA, Barcelona, España) y filtradas por filtros de 0,45 μm (Pall Acrodisc PSF, VWR International Eurolab S.L., Barcelona, España).

3.5.2 Biomasa

La biomasa se determinó por recuento en cámara Neubauer (BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Germany) con tinción de azul de metileno (Paiting y Kirsop, 1990), mediante utilización de microscopio óptico Leica CME (Leica Microsystems GmbH Wetzlar, Germany).

3.5.3 Nitrógeno fácilmente asimilable (NFA)

El contenido en nitrógeno fácilmente asimilable (NFA) de los mostos y vinos, se determinó según el índice de formaldehído con algunas modificaciones por puesto por Aerny (1997) y recogido por Marín Zamora (2003).

3.5.4 Velocidad exponencial (V_{exp})

El cálculo de la velocidad exponencial durante el desarrollo de la fermentación alcohólica se expresa en $g/mL \times día$ y se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$V_{exp} = (\text{Densidad}_{\text{fase exponencial}} - \text{Densidad}_{\text{inicial}}) / (\text{tiempo}_{\text{fase exponencial}})$$

3.6 Caracterización analítica de los vinos

Una vez finalizada la fermentación alcohólica, además de realizar la medida de acidez total, pH, turbidez y nitrógeno fácilmente asimilable (NFA), se determinarán los siguientes parámetros:

3.6.1 Grado alcohólico

El grado alcohólico se determina por destilación de la muestra y posterior medida de densidad del destilado según los métodos oficiales de análisis de vinos (OIV, 1990). Para la medida de densidad se empleó un densímetro DMA 48 (ANTOM-PAAR, Net IterLab SAL, Madrid, España).

3.6.2 Azúcares residuales

Los azúcares residuales (RS) (glucosa y fructosa) en los vinos finales se analizaron mediante cromatografía iónica (930 Compact IC Flex, Metrohm, Herisau, Switzerland) con un detector amperométrico de impulsos y un electrodo de oro como electrodo de trabajo. La elución se llevó a cabo de forma isocrática a un caudal de 0,5 mL/min con

hidróxido de sodio 300 mM (NaOH) y acetato de sodio 1 mM (NaOAc). La separación se logró en una columna Metrosep Carb 2-150/4.0 (Metrohm).

3.6.3 Acidez volátil

La acidez volátil se determinó por volumetría utilizando el método García-Tena siguiendo la metodología descrita por Pérez and Morales (1998).

3.6.4 Anhídrido sulfuroso

La determinación de sulfuroso libre y total se realizó siguiendo el procedimiento indicado por Pérez and Morales (1998).

3.6.5 Incidencia del pardeamiento en el color

Las medidas de absorbancia a 420 nm se estableció mediante espectrofotómetro UV-Visible HITACHI modelo U-2001 (PACISA Y GIRALT, S.L., Grupo Taper, Madrid, España). Las determinaciones se realizaron por medida directa de la muestra previamente filtrada a través de filtros de jeringa de nylon de 0,45 µm de tamaño de poro.

3.6.6 Intensidad colorante (IC)

La intensidad colorante se determinó por el método rápido recomendado por la Office International de la Vigne et du Vin, que es el mismo que el propuesto por Sudraud y se basa en la suma de las absorbancias a 420, 520 y 620 nm (OIV, 1990).

3.6.7 Tonalidad (N)

La tonalidad se determinó igualmente por el método rápido recomendado por la Office International de la Vigne et du Vin, definida como la razón entre las absorbancias a 420 nm y 520 nm expresada en términos de un ángulo (en grados) (OIV, 1990).

3.6.8 CIELAB parámetros

Para la evaluación del color se emplearon los parámetros CIELab (L^* , a^* , b^*), siguiendo las recomendaciones de la Comisión Internacional de L'Eclairage (CIE, 1986), que consideran que los parámetros CIELab definen mejor el color de los vinos y permiten una mejor diferenciación (Almela et al., 1996; Heredia et al., 1997; Perez-Magariño and González-San José, 2006). Los parámetros CIELab se hallaron determinando la totalidad del espectro (380-780 nm) y su parametrización a intervalos de 5 nm en un espectrofotómetro de barrido UV-Visible 2001 HITACHI (PACISA Y GIRALT, SL, Grupo TAPER, Madrid, España) en cubetas de 10 mm. Para los cálculos se tuvieron en cuenta, como condiciones estándar, un observador de CIE 1964 (10°) (ángulo de percepción de un observador humano) y un iluminante D65 (luz del día). Las muestras se filtraron previamente con membranas de nylon de $0,45 \mu\text{m}$.

3.6.9 Índice de polifenoles totales (IPT)

El índice de polifenoles totales (IPT) se determinó mediante medidas de absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro UV-Visible HITACHI modelo U-2001 (PACISA Y GIRALT, S.L., Grupo Taper, Madrid, España) en cubetas de 10 mm. A partir de estas medidas, se calcularon los valores de IPT como: $\text{IPT} = \text{Abs } 280 \times \text{dilución}$

3.6.10 Compuestos volátiles mayoritarios

Los compuestos volátiles mayoritarios (acetaldehído, diacetilo, acetato de etilo, metanol, n-propanol, isobutanol, 2-metilbutanol y 3-metilbutanol) se determinaron por cromatografía gaseosa, a través de inyección directa de las muestras destiladas usando 4-metil-2-pentanol como patrón interno. Se empleó un cromatógrafo de gases modelo HP 5890 Serie II (Hewlett Packard, Agilent Technologies España SL, España) con inyector automático (modelo HP7673A) y detector FID, equipado con una columna capilar Carbowax 20 (50 m x $0,25 \text{ mm ID}$; $0,25 \mu\text{m}$).

3.6.11 Compuestos volátiles minoritarios

La determinación de los compuestos volátiles minoritarios se realizó mediante GC-MS usando un equipo GC-MM modelo Voyager (Termoquest, Finnigan, Milán, Italia) perteneciente a la División de Espectrometría de masas del Servicio Central de Ciencia y Tecnología de la Universidad de Cádiz. Previamente se trataron las muestras siguiendo la metodología recogida en Roldán et al (2011).

3.6.12 Determinación del ácido málico

El contenido en ácido málico presente en las muestras se cuantificó mediante cromatografía iónica (930 Compact IC Flex, Metrohm, Herisau, Switzerland), equipado con un detector conductimétrico y una la columna Metrosep Organic Acids - 250/7.8. La separación de los distintos compuestos se llevó acabo usando como eluyente la mezcla: 0,4 mmol/L Ac. Sulfúrico + 12 % Acetona a un flujo isocrático de 0,4 mL/min.

3.7 BIBLIOGRAFÍA

- Aerny, J. (1997). Composés azotés des moûts et des vins. *Revue Suisse de Viticulture Arboriculture Horticulture*, 28, 161–168.
- Almela, L., Javaloy, S., Fernández-López, J. A., & López-Roca, J. M. (1996). Varietal classification of young red wines in terms of chemical and colour parameters. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70(2), 173–180.
- Barceló, J. G. (1990). *Técnicas analíticas para vinos*. Ediciones GAB.
- Cabello, F., Ortiz, J. M., Muñoz, G., Rodríguez, I., Benito, A., Rubio, C., García, S. & Sáiz, R. (2011). *Varietades de Vid en España*. Editorial Agrícola Española, S. A. Madrid.
- Cruz, S., García de Luján, A., & Bustillo, J. M. (1996). *Clones de la Variedad de Vid Palomino Fino*. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. Sevilla.
- Di Stefano, R. (1991). Proposition d'une méthode de préparation de l'échantillon pour la détermination des terpènes libres et glycosides des raisins et des vins. *Bulletin OIV*, 721-722:219-223.
- Duarte, W. F., Dias, D. R., Oliveira, J. M., Teixeira, J. A., de Almeida e Silva, J. B., & Schwan, R. F. (2010). Characterization of different fruit wines made from cacao, cupuassu, gabiropa, jaboticaba and umbu. *LWT - Food Science and Technology*, 43(10), 1564–1572.
- Heredia, F. J., Troncoso, A. M., & Guzmán-Chozas, M. (1997). Multivariate characterization of aging status in red wines based on chromatic parameters. *Food Chemistry*, 60(1), 103–108.
- ISO 3591:1977 AENOR. (1977). Sensory analysis. Apparatus. Wine. Tasting glass.
- ISO 4120:2007 AENOR. (2008). Sensory analysis. Methodology. Triangle test.
- ISO 8587:2006 AENOR. (2010). Sensory analysis. Methodology. Ranking.
- Jackson, R. S. (2009). *Wine Tasting: A Professional Handbook*. ACRIBIA, Ed.
- Juan, P., Manuel, P., & Ordóñez, M. (1998). *Manual básico de laboratorio de bodega*. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. Sevilla.
- Lukić, I., Radeka, S., Grozaj, N., Staver, M., & Peršurić, D. (2016). Changes in physico-chemical and volatile aroma compound composition of Gewürztraminer wine as a result of late and ice harvest. *Food Chemistry*, 196, 1048–1057.
- Marín, F. Z. (2003). *Elaboración y crianza del vino tinto: aspectos científicos y prácticos*. (Libros Mundi-Prensa).
- OIV. (1990). Office International de la Vigne, & du Vin. In *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts: édition officielle*.
- Peinado, R. A., Moreno, J., Bueno, J. E., Moreno, J. A., & Mauricio, J. C. (2004). Comparative study of aromatic compounds in two young white wines subjected to pre-fermentative cryomaceration. *Food Chemistry*, 84(4), 585–590.

- Perestrelo, R., Fernandes, A., Albuquerque, F. F., Marques, J. C., & Câmara, J. S. (2006). Analytical characterization of the aroma of Tinta Negra Mole red wine: Identification of the main odorants compounds. *Analytica Chimica Acta*, 563(1–2 SPEC. ISS.), 154–164.
- Pérez, P. M., & Morales, J. (1998). *Manual básico de laboratorio de bodega*. Conserjería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía.
- Pérez-Magariño, S., & González-San José, M. L. (2006). Polyphenols and colour variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. *Food Chemistry*, 96(2), 197–208.
- Roldán, A., Van Muiswinkel, G. C. J., Lasanta, C., Palacios, V., & Caro, I. (2011). Influence of pollen addition on mead elaboration: Physicochemical and sensory characteristics. *Food Chemistry*, 126(2), 574–582.
- Slegers, A., Angers, P., Ouellet, É., Truchon, T., & Pedneault, K. (2015). Volatile compounds from grape skin, juice and wine from five interspecific hybrid grape cultivars grown in Québec (Canada) for wine production. *Molecules*, 20(6), 10980–11016.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio y evaluación a escala laboratorio-piloto
de los efectos de la adición de polen en la
vinificación en blanco

4.1 Estudio y evaluación a escala laboratorio-piloto de los efectos de la adición de polen en la vinificación en blanco.

4.1.1 Influencia de la dosis de polen sobre las propiedades físico-químicas del mosto.

En las Tablas 2 y 3 se muestran los resultados de los parámetros físico-químicos analizados a los mostos de uva Palomino fino y Riesling respectivamente después de la adición del polen a las diferentes dosis de polen de abeja multifloral establecidas, junto con el control. Como se puede observar, la adición de polen no afecta de forma significativa a la densidad del mosto y por lo tanto a su concentración de azúcar, salvo para las dosis de 10 y 20 g/L, donde hay un ligero aumento de 3 y 10 g/L en el mosto de Palomino fino, y de 6 y 9 g/L en el mosto de Riesling con respecto a sus controles. Estos resultados son muy similares a los obtenidos en los estudios del hidromiel (Roldán et al., 2011), donde se estimó una contribución de azúcar de 0,4 g por cada gramo de polen agregado. Estos resultados son consecuentes, ya que según algunos estudios sobre la composición del polen de abeja (Szcześna, 2007), una dosis de 20 g/L podría contribuir a aumentar la glucosa y la fructosa, en el mosto entre 5 y 10 g/L. Los resultados de la acidez total fluctúan entre las diferentes dosis de polen, con respecto a los valores de control (7,9 y 4,8 g/L para Palomino y Riesling, respectivamente). Sin embargo, en hidromiel (Roldán et al., 2011) se observó un aumento en la acidez total de 0,02 g/L en ácido tartárico por gramo de polen añadido al mosto de miel. Este efecto no se observa en el mosto de uva, posiblemente debido a que su acidez total es del orden de un 80 % más alta que en el mosto de miel. En cuanto al pH, los valores son similares al control para todas las dosis de polen (Tablas 2 y 3), tal y como se esperaba, dada la alta capacidad de amortiguación del mosto de uva (Torija et al., 2003). Del mismo modo, el polen de abeja no tiene efecto sobre la concentración de sulfuroso libre (SO₂ libre). Los niveles de SO₂ libres son similares al control en todos los casos, lo que indica que las dosis del polen estudiadas no producen sustancias susceptibles de combinarse con SO₂. Desde un punto de vista enológico, esto es importante ya que en los vinos existe la necesidad de aumentar la dosis total de SO₂ para evitar tanto las oxidaciones enzimáticas de los polifenoles (Oliveira et al., 2011), como el desarrollo de bacterias y levaduras sensibles a este antiséptico (Lasanta et al., 2010).

Por otra parte, en cuanto al contenido en Nitrógeno Fácilmente Asimilable (NFA), el uso de polen produce un efecto muy notable en los mostos de las variedades de uva blanca estudiadas. En ambos casos, el contenido en NFA aumenta de forma progresiva y lineal con la dosis de polen, $r^2 = 0,94$ y $r^2 = 0,80$, para Palomino fino y Riesling respectivamente. El incremento observado NFA con la dosis de polen es ligeramente mayor en el caso de Palomino fino (entre 3 y 44 %) con un contenido de 140 mg/L de NFA en el testigo; en comparación con el caso de Riesling (entre 2 y 30 %), con un contenido de NFA menor en el testigo (128 mg/L). El NFA representa nitrógeno que puede ser asimilado fácilmente por las levaduras para su crecimiento celular (Alexandre et al., 1998; Bisson and Butzke, 2000; Bell and Henschke, 2005; Gutiérrez et al., 2012) y como factor de supervivencia en la fermentación alcohólica (Bisson, 1999; Bisson y Butzke, 2000). Por lo tanto, el polen se puede considerar como una buena fuente de NFA y se puede utilizar como un aditivo natural para enriquecer los mostos deficientes, mejorando así su potencial fermentativo. Este efecto también se verificó en el caso del hidromiel (Roldán et al., 2011), aunque en ese caso las dosis de polen utilizadas fueron mucho más altas (hasta 50 g/L) debido a las deficiencias de NFA de los mostos de aguamiel. Varios autores indican que el NFA del polen de abeja es bastante rico en aminoácidos, representando una relación 1/10 del nitrógeno total (Rabie et al., 1983; Campos et al., 2008). Algunos trabajos de investigación sobre la composición del polen muestran que la concentración de aminoácidos libres se encuentra entre un 14 % y un 16 % (p/p), destacando especialmente la prolina, ácido glutámico, ácido aspártico, lisina y leucina (Human and Nicolson, 2006; Roldán et al., 2011). Estos aminoácidos pueden ser de interés como sustancias activadoras del crecimiento para levaduras en la fermentación alcohólica.

Tabla 2. Composición físico-química del mosto de Palomino fino con adición de polen (control, 0,1, 0,25, 1, 5, 10 y 20 g/L)

Parámetros	Dosis de polen en mosto de Palomino fino						
	Control	0,1 g/L	0,25 g/L	1 g/L	5 g/L	10 g/L	20 g/L
°Bè	10,03 ± 0,10 ^{a,b}	9,70 ± 0,02 ^a	9,95 ± 0,04 ^a	10,00 ± 0,03 ^a	10,05 ± 0,05 ^{a,b}	10,10 ± 0,05 ^{a,b}	10,55 ± 0,03 ^b
Densidad (g/cm ³) at 20°C	1,070 ± 0,000 ^a	1,070 ± 0,000 ^a	1,070 ± 0,000 ^a	1,070 ± 0,000 ^a	1,071 ± 0,000 ^a	1,071 ± 0,000 ^a	1,073 ± 0,000 ^a
Azúcar (g/L)	165,17 ± 0,64 ^a	159,30 ± 0,37 ^a	163,70 ± 0,34 ^a	164,80 ± 0,25 ^a	164,80 ± 0,21 ^a	168,10 ± 0,18 ^{a,b}	175,67 ± 0,58 ^b
Acidez Total (g/L TH ₂)	7,09 ± 0,07 ^{a,b,c}	6,87 ± 0,12 ^a	6,97 ± 0,03 ^{a,b}	7,22 ± 0,07 ^{a,b,c}	7,24 ± 0,05 ^{a,b,c}	7,26 ± 0,05 ^{b,c}	7,46 ± 0,10 ^c
pH	3,11 ± 0,01 ^a	3,10 ± 0,01 ^a	3,10 ± 0,01 ^a	3,11 ± 0,01 ^a	3,11 ± 0,01 ^a	3,11 ± 0,01 ^a	3,18 ± 0,01 ^a
SO ₂ libre	24 ± 1 ^a	23 ± 1 ^a	24 ± 1 ^a	24 ± 1 ^a	24 ± 1 ^a	24 ± 2 ^a	27 ± 1 ^b
SO ₂ Total	70 ± 2 ^a	68 ± 1 ^a	70 ± 2 ^a	70 ± 2 ^a	70 ± 1 ^a	70 ± 3 ^a	74 ± 1 ^b
NFA (mg/L)	140 ± 1 ^a	144 ± 3 ^{a,b,c}	151 ± 0 ^{b,c}	154 ± 2 ^c	165 ± 4 ^d	184 ± 8 ^e	202 ± 8 ^f

Diferentes letras en superíndice indican que existen diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$), obtenido mediante ANOVA bidireccional, aplicando la prueba de análisis múltiple de Bonferroni (BSD).

Tabla 3. Composición físico-química del mosto de Riesling con adición de polen (control, 0,1, 0,25, 1, 5, 10 y 20 g/L)

Parámetros 3	Dosis de polen en mosto de Riesling						
	Control	0.1 g/L	0.25 g/L	1 g/L	5 g/L	10 g/L	20 g/L
°Bè	11,07 ± 0,06 ^a	10,87 ± 0,06 ^a	11,02 ± 0,06 ^a	11,27 ± 0,06 ^a	11,27 ± 0,01 ^a	11,37 ± 0,06 ^a	11,62 ± 0,06 ^a
Densidad (g/cm ³) at 20°C	1,081 ± 0,000 ^a	1,081 ± 0,000 ^a	1,080 ± 0,000 ^a	1,082 ± 0,000 ^a	1,082 ± 0,000 ^a	1,083 ± 0,000 ^a	1,084 ± 0,000 ^a
Azúcar (g/L)	189,00 ± 0,00 ^a	189,70 ± 0,00 ^a	187,40 ± 0,00 ^a	191,80 ± 0,00 ^{a,b}	191,80 ± 0,00 ^{a,b}	195,13 ± 0,06 ^{a,b}	204,83 ± 0,06 ^b
Acidez Total (g/L TH ₂)	4,83 ± 0,24 ^a	4,80 ± 0,26 ^a	4,91 ± 0,21 ^a	4,89 ± 0,24 ^a	4,99 ± 0,23 ^a	4,81 ± 0,22 ^a	4,76 ± 0,21 ^a
pH	3,34 ± 0,01 ^a	3,34 ± 0,01 ^a	3,34 ± 0,01 ^a	3,34 ± 0,00 ^a	3,35 ± 0,00 ^a	3,33 ± 0,01 ^a	3,33 ± 0,01 ^a
SO ₂ libre	17 ± 0 ^a	17 ± 1 ^a	17 ± 1 ^a	18 ± 1 ^a	17 ± 1 ^a	17 ± 1 ^a	17 ± 1 ^a
SO ₂ Total	60 ± 2 ^a	62 ± 1 ^a	61 ± 1 ^a	60 ± 1 ^a	61 ± 1 ^a	60 ± 2 ^a	61 ± 1 ^a
NFA (mg/L)	128 ± 0 ^a	132 ± 1 ^{a,b}	140 ± 1 ^{b,c}	146 ± 4 ^{c,d}	154 ± 2 ^{d,e}	160 ± 3 ^{e,f}	168 ± 3 ^f

Diferentes letras en superíndice indican que existen diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$), obtenido mediante ANOVA bidireccional, aplicando la prueba de análisis múltiple de Bonferroni (BSD).

4.1.2 Análisis de los efectos sobre la cinética fermentativa, el desarrollo de las poblaciones de levaduras y el nitrógeno fácilmente asimilable durante la fermentación alcohólica.

4.1.2.1 Influencia de la dosis de polen de abeja en la cinética de fermentación alcohólica

Las Figuras 8a y 8b representan la evolución de la densidad relativa durante la fermentación alcohólica de mostos de uva Palomino fino y Riesling respectivamente, con diferentes dosis de polen y el control, respectivamente. De forma general salvo para la excepción de la dosis de 20 g/L, las pendientes de densidad caen y son más pronunciadas y similares entre sí en Riesling (Figura 8b) que en Palomino (Figura 8a). La Figura 9 muestra que la velocidad durante la fase exponencial de crecimiento (V_{exp}) en los mostos de Riesling es un 28 % más alta que en los mostos de Palomino fino, aunque a partir de la dosis de 1 g/L, estas diferencias comienzan a ser menos pronunciadas. Este comportamiento no puede atribuirse al contenido en NFA, ya que los mostos de Palomino son superiores en NFA para todos los casos en comparación con los mostos de Riesling (Tablas 2 y 3). De hecho, los mostos de Riesling no presentaron problemas de fermentación, incluso en aquellos con valores de NFA inferiores a de 140 mg/L (control y dosis bajas). Algunos autores indican que un NFA de 140 mg/L es el mínimo necesario para poder completar la fermentación alcohólica sin que aparezcan problemas de crecimiento en las poblaciones de levaduras (Barre et al., 1998; Ribéreau-Gayon et al., 2003). La diferencia de velocidad observada entre las variedades se debe fundamentalmente a la concentración inicial de azúcar de los mostos, directamente relacionada con el grado de maduración de la uva en el momento de su vendimia (Ribéreau-Gayon et al., 2003). Mientras que los mostos de Riesling tienen una concentración de azúcar de 189 g/L, los mostos de Palomino tienen una concentración de 165 g/L. Esta diferencia de concentración de azúcar puede ser la responsable de que en mostos Riesling haya un mayor aumento de las poblaciones de levaduras durante la fase de crecimiento exponencial, que podría derivar en un aumento del consumo de azúcares en el tiempo y, por lo tanto, la velocidad fermentativa.

La Figura 9 muestra que las V_{exp} de Palomino con bajas dosis de polen (de 0,1 a 0,25 g/L) y Riesling con dosis bajas e intermedias (1 g/L) se comportan de forma muy

similar a sus controles. Sin embargo, a partir de la dosis de 1 g/L en el caso de Palomino y 5 g/L para Riesling, la V_{exp} aumenta significativamente (ANOVA $p < 0,05$) y de manera proporcional con la dosis de polen, así como cuando ambas variedades alcanzan niveles de NFA superiores a 150 mg/L (Tablas 2 y 3). Una importante contribución de NFA con polen en la fermentación alcohólica, puede compensar en parte la falta de sustrato de azúcar desde el punto de vista cinético. La V_{exp} en el mosto de Palomino a la dosis de 20 g/L y con un NFA de 201 mg/L, excede los valores del control y de las dosis bajas e intermedias correspondientes al mosto de Riesling (Figura 9). Varios autores han corroborado que el aumento de NFA en mostos produce un aumento en la velocidad de fermentación (Ter Schure et al., 2000; Torija et al., 2003). De manera similar, la adición de altas dosis de polen en mostos de miel (Roldán et al., 2011) produjo un aumento de NFA, y por lo tanto un aumento significativo y similar en la velocidad de fermentación.

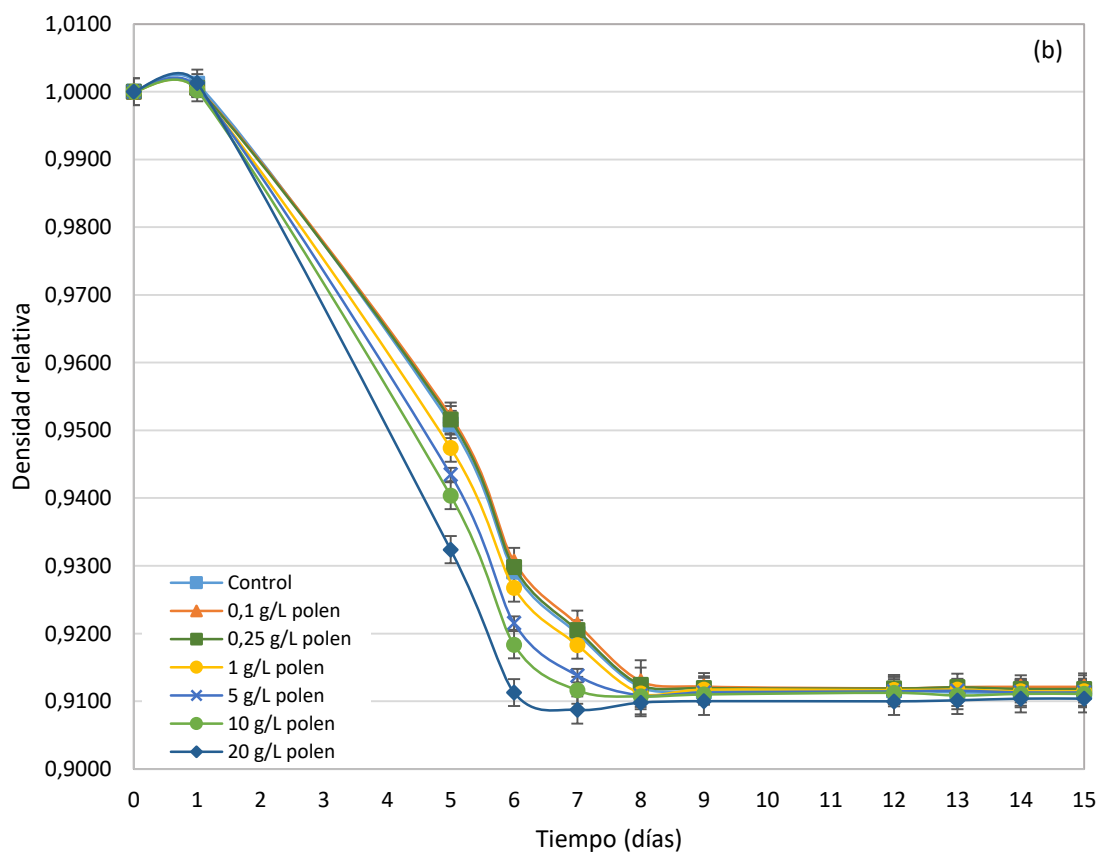
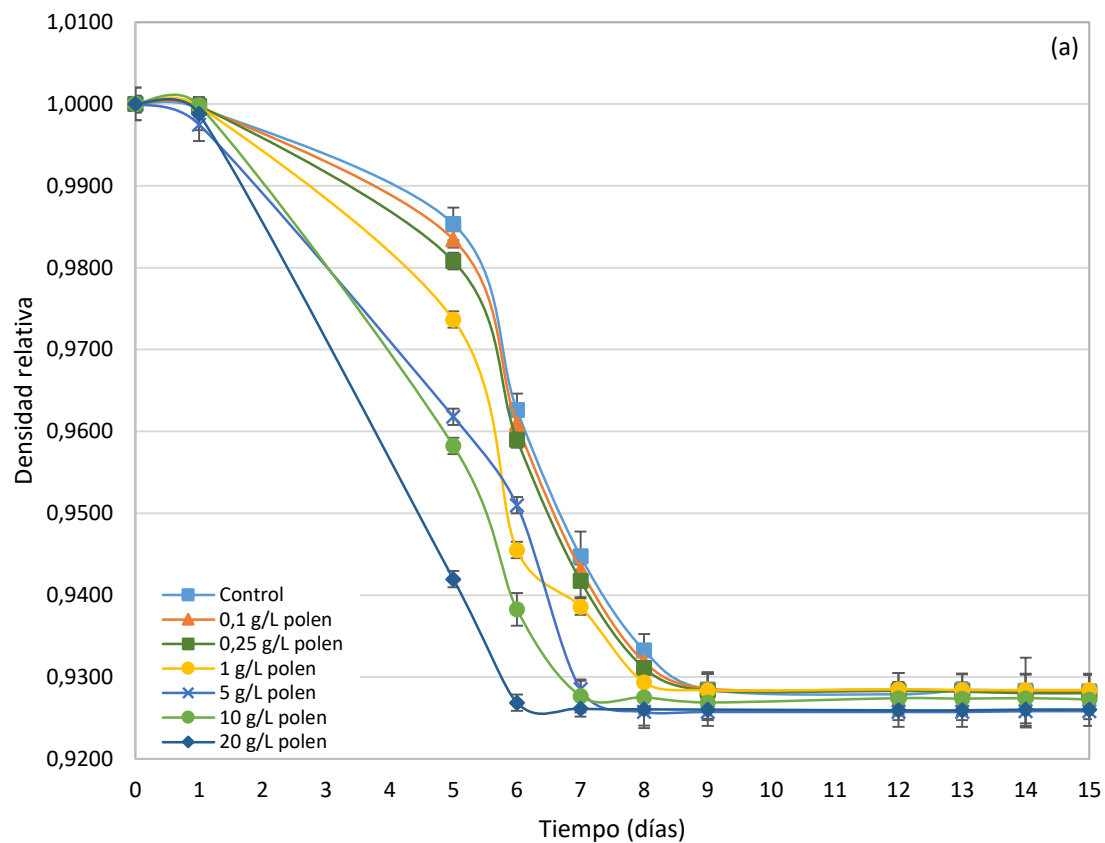


Figura 8. Evolución densidad relativa durante la FA de mostos de Palomino fino (a) y Riesling (b) con distintas dosis de polen.

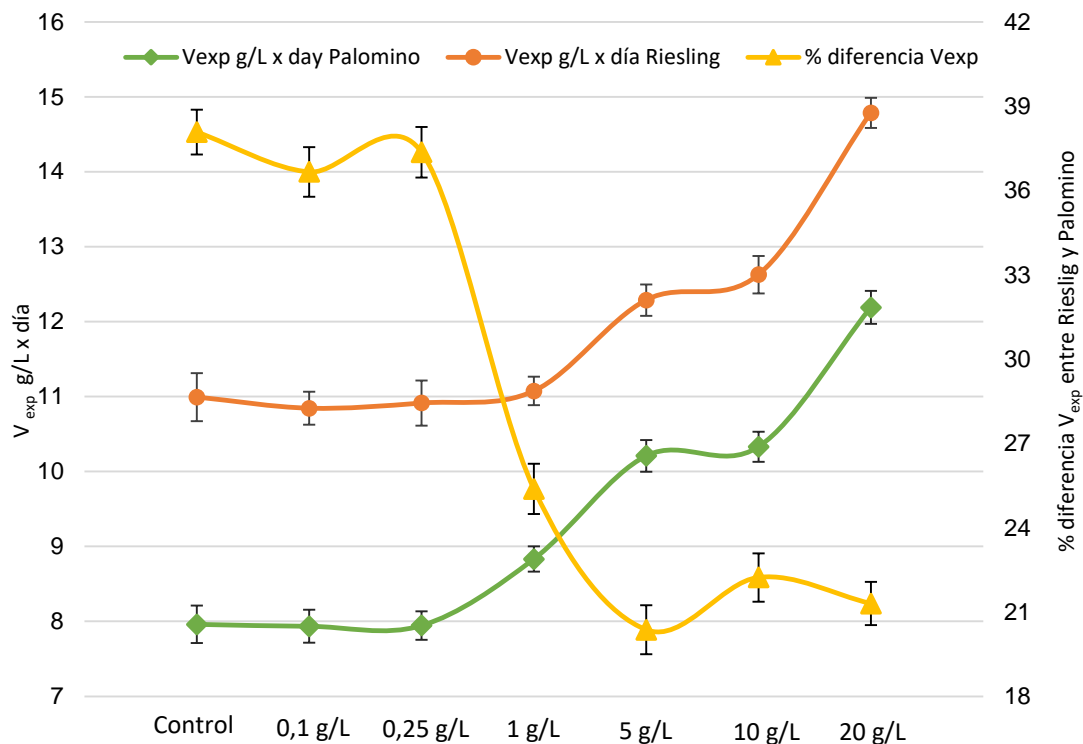


Figura 9. Velocidad de fermentación durante en la fase exponencial de crecimiento (V_{exp}) de mostos fermentados con distintas dosis de polen

4.1.2.2 Influencia de la dosis de polen sobre la cinética de crecimiento de las levaduras durante la fermentación alcohólica

La Figura 10 muestra la evolución de las poblaciones de levaduras viables *Saccharomyces cerevisiae* durante el desarrollo de la fermentación alcohólica (FA). Como se puede observar, ambas variedades muestran comportamientos muy diferentes. En el caso de Palomino fino, la fase de retardo dura aproximadamente 2 días, mientras que en Riesling fué de 5 días (Figuras 10a y 10b) para todas las dosis de polen y el testigo. La elongación de la fase de retraso en Riesling puede deberse principalmente a su mayor concentración de azúcar, lo que conduce a un tiempo de adaptación más largo para el inóculo de levadura (Arroyo-López et al., 2009). El aumento de NFA, incluso a las dosis más altas, no produce una reducción en el tiempo de latencia ni una mejora en la adaptación de las levaduras en el caso del Riesling. Sin embargo, en Palomino fino, que tiene un contenido de azúcar inicial más bajo, la adición de polen hace que las poblaciones sean ligeramente más grandes durante la fase de retraso en comparación con el control. Por lo tanto, en este caso, el aumento del contenido de NFA

contribuido por altas dosis de polen puede, a su vez, aumentar la supervivencia del inóculo de levadura durante la fase de latencia. Sin embargo, durante la fase de crecimiento exponencial, la tasa de multiplicación y las poblaciones máximas de levaduras viables son significativamente más altas en los mostos Riesling ($1,1 \times 10^9$ – $1,67 \times 10^9$ UFC/mL) que en los mostos Palomino ($2,4 \times 10^8$ – $4,5 \times 10^8$ UFC/mL) (Figuras 10a y 10b), debido a su mayor contenido de azúcar. Respecto a la cinética fermentativa (Figura 11), nuevamente se observa que el rango de variación o intervalo de poblaciones de levaduras con las dosis de polen es más notable en los mostos de Palomino, posiblemente porque tiene valores de NFA más altos (Tabla 2). El polen de abeja, excepto para la dosis de 0,1 g/L en Palomino fino, permite anticipar el tiempo en alcanzar las poblaciones de levaduras viables máximas (Figura 10). Las diferencias de tiempo son menos pronunciadas, alcanzándose entre los días 6 y 9 durante la FA con la adición de polen en comparación con el testigo (día 9). En el caso de la variedad Riesling, las poblaciones máximas de levaduras se alcanzaron entre los días 6 y 7, mientras que en el testigo se produjo alrededor del 9º día.

En general, en todos los casos, la adición de polen de abeja implica un aumento en la población máxima alcanzada de *Saccharomyces cerevisiae*. En cuanto a la dosis de polen, se observó un mayor aumento en las poblaciones de levaduras con dosis entre 5 g/L y 20 g/L, mostrando incrementos de 47,9% a 89,4% para Palomino fino y de 61,2% a 65,4% para Riesling, en comparación con baja dosis entre 0,1 g/L y 1 g/L, que mostraron incrementos de 14,9% a 41,5% para Palomino fino y de 11,4% a 31,3% para Riesling con respecto a sus testigos (Figura 11). Por lo tanto, el polen podría contribuir, además del NFA, con otras sustancias activadoras del crecimiento de las levaduras.

Asimismo, durante las fases estacionaria y de muerte, las poblaciones de levaduras en los mostos Palomino y Riesling permanecen significativamente mucho más altas para todas las dosis de polen (ANOVA $p < 0,05$) con respecto al testigo, especialmente a dosis altas. Por lo tanto, el polen de abeja tiene un efecto en la supervivencia de las poblaciones de levaduras durante la fase de muerte celular o de lisis.

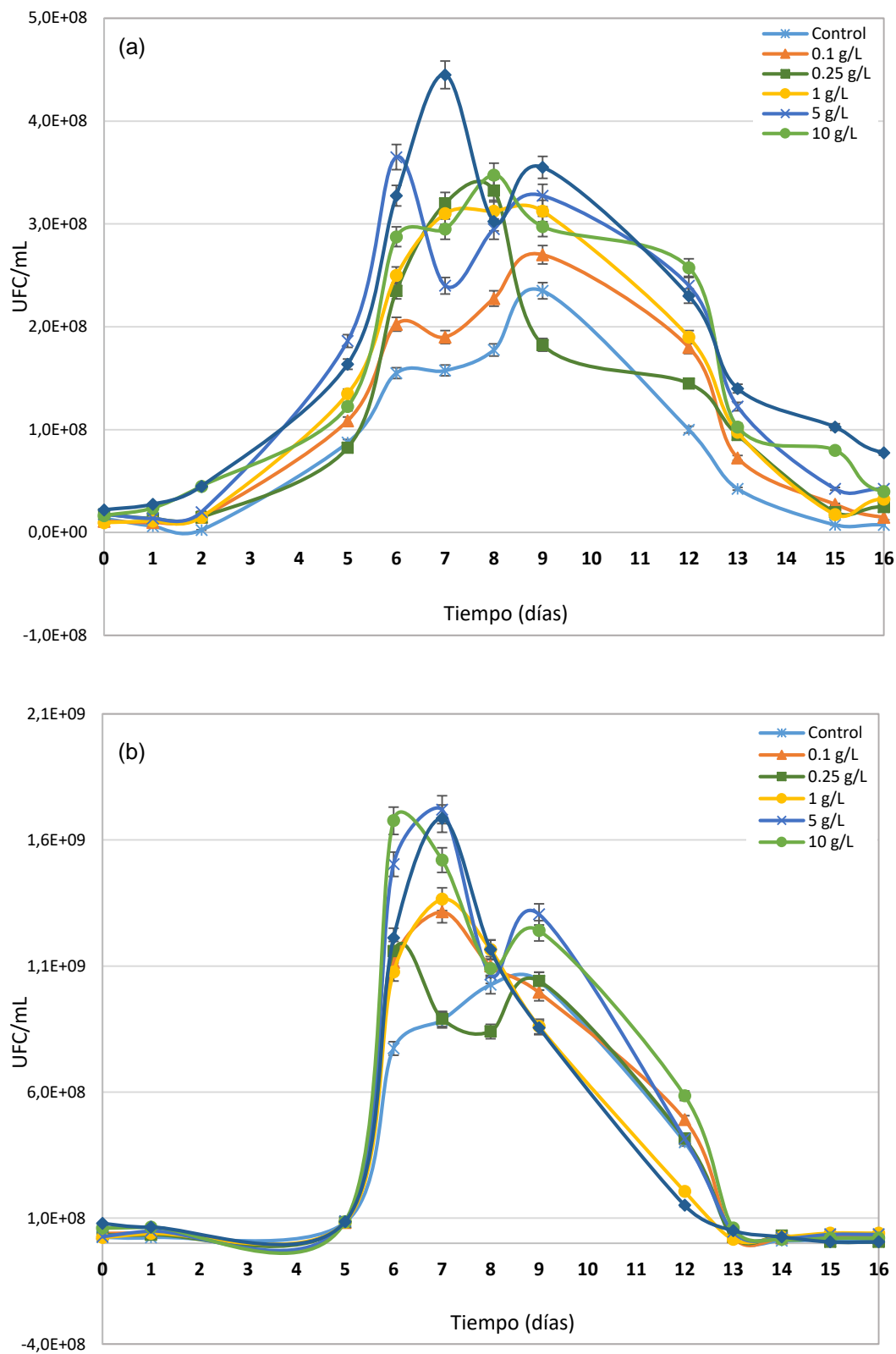


Figura 10. Evolución de la biomasa viable de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* durante el proceso de fermentación alcohólica de mosto de uva Palomino fino (a) y Riesling (b) con diferentes dosis de polen.

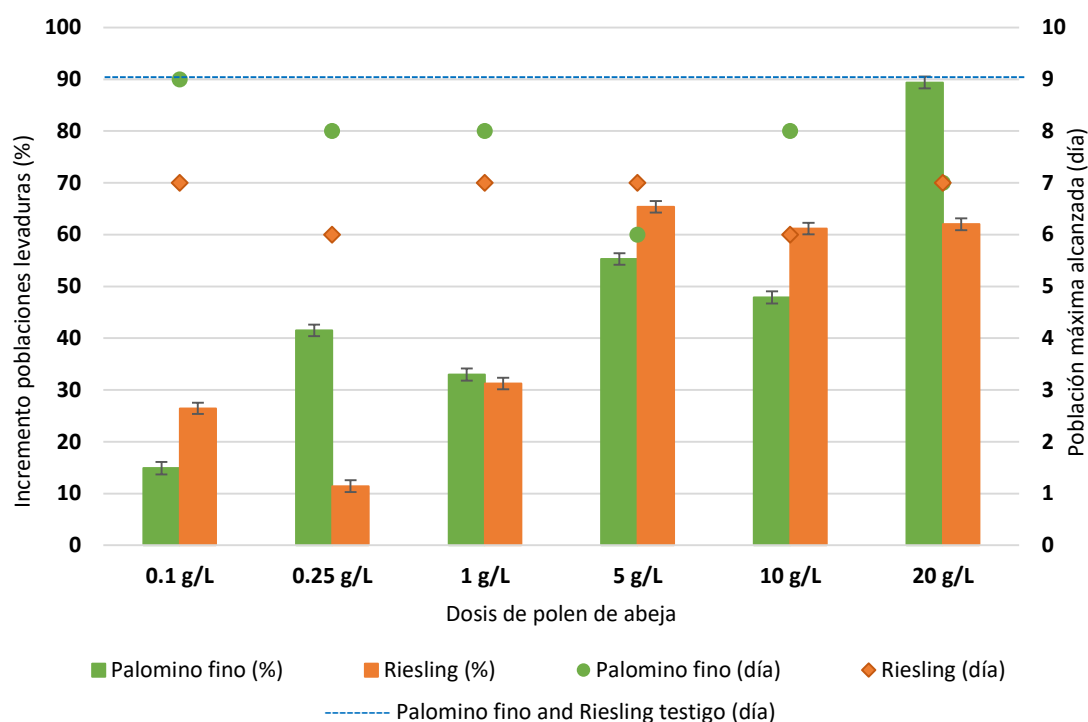


Figura 11. Aumento de las poblaciones de levadura durante la fermentación alcohólica en mostos de Palomino fino y Riesling, con diferentes dosis de polen.

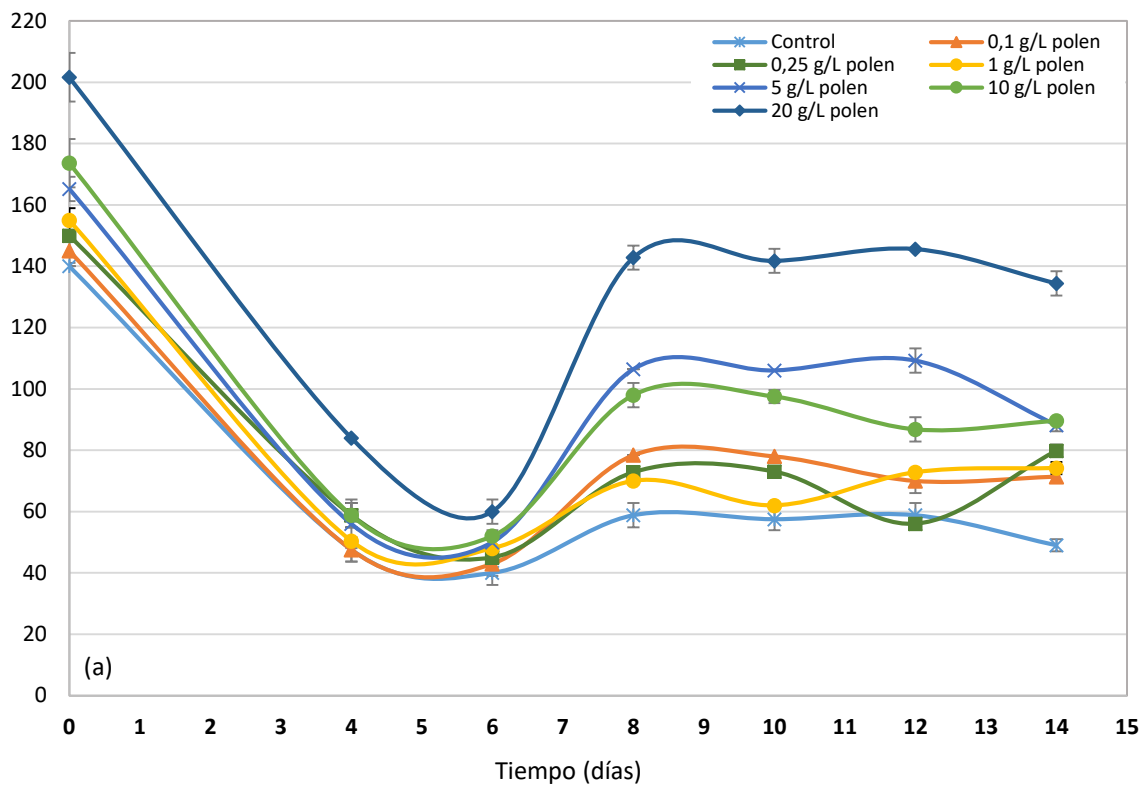
4.1.2.3 Influencia de la dosis de polen sobre la evolución del NFA durante la fermentación alcohólica

Las Figuras 12a y 12b muestran la evolución del NFA en los mostos de Palomino y Riesling durante el transcurso de la FA, respectivamente. Ambos mostos muestran una disminución del NFA en los primeros 6 días, coincidiendo con el final de la fase de crecimiento exponencial (Figura 10). Como se puede observar, el consumo de NFA aumenta con la dosis de polen (Figura 12), debido al aumento de las poblaciones de levaduras alcanzadas en cada caso (Figura 10). Sin embargo, aunque el consumo de NFA mostró cierta correlación con las poblaciones máximas alcanzadas ($r^2 = 0,84$ y $0,87$ para Palomino y Riesling respectivamente), el consumo de NFA por Unidad Formadora de Colonias (UFC) disminuye significativamente en un promedio de 20 % con la adición de polen cuando se compara con el testigo (Figura 13). Eso quiere decir que el consumo de NFA experimentado no es proporcional a las poblaciones máximas alcanzadas de levaduras durante la FA, especialmente en Riesling. Este hecho podría indicar que la adición de polen al mosto debe reducir la demanda de NFA de las levaduras. Esto podría

deberse a que el polen, además de proporcionar NFA, también proporciona otras sustancias activadoras del crecimiento, como son los ácidos grasos α -linolénico, oleico o linoleico (Anexo. Tabla 37) (Xu et al., 2009), que pueden ser metabolizados por las levaduras durante la fermentación y favorecer su crecimiento (Sroka and Tuszyński, 2007). Asimismo, el polen podría estar aportando otros oligoelementos como el magnesio (Mg^{2+}) (Campos et al., 2008; Komosinska-Vassev et al., 2015; Bogdanov, 2017), que en cierta medida interviene en los requerimientos nutricionales de las levaduras en los inicios de fermentación, aumentando la tasa de reproducción celular y posteriormente, la tasa de fermentación durante el desarrollo de la FA (Dombek and Ingram, 1986).

Sin embargo, a partir del sexto día hay un aumento del contenido en NFA hasta el octavo día para todos los mostos de Palomino fino y hasta el duodécimo día para los mostos de Riesling, coincidiendo con la fase de muerte (Figuras 12a y 12b). Los mostos testigos experimentan un ligero aumento en ambos casos. Pero lo que resulta interesantes es que, a excepción de algunas dosis en Palomino, se puede observar como el NFA aumenta en mayor proporción a medida que aumenta la dosis de polen, siendo mucho más significativo y prolongado en los mostos de Riesling. EL etanol producido durante la fermentación alcohólica probablemente favorezca la extracción de NFA del polen hacia el mosto. Además, el aumento de las poblaciones de levadura podría contribuir también al aumento del NFA debido a la autólisis de las levaduras durante la fase de muerte (Dizy and Polo, 1996; Camarasa et al., 2001; Alexandre and Guilloux-Benatier, 2006; Moreno-Arribas and Polo, 2009). Esto justificaría que, los mostos Riesling con mayor contenido de alcohol (12 % v/v), alcanzaron niveles de NFA más altos al final de la fermentación. Además, debe señalarse que estos valores residuales de NFA podrían ser de interés para el posterior desarrollo de una fermentación maloláctica o, en el caso de la Palomino, de una crianza biológica bajo velo de flor. Sin embargo, en ese sentido, las altas dosis de polen de abeja podrían generar también inestabilidad microbiológica en los vinos, proporcionando un medio rico para el desarrollo de bacterias acéticas o *Brettanomyces*. También es probable que los niveles en nitrógeno más altos puedan patrocinar la síntesis de algunas sustancias tóxicas como por ejemplo el carbamato de etilo (Ough et al., 1989).

NFA (mg/L)



NFA (mg/L)

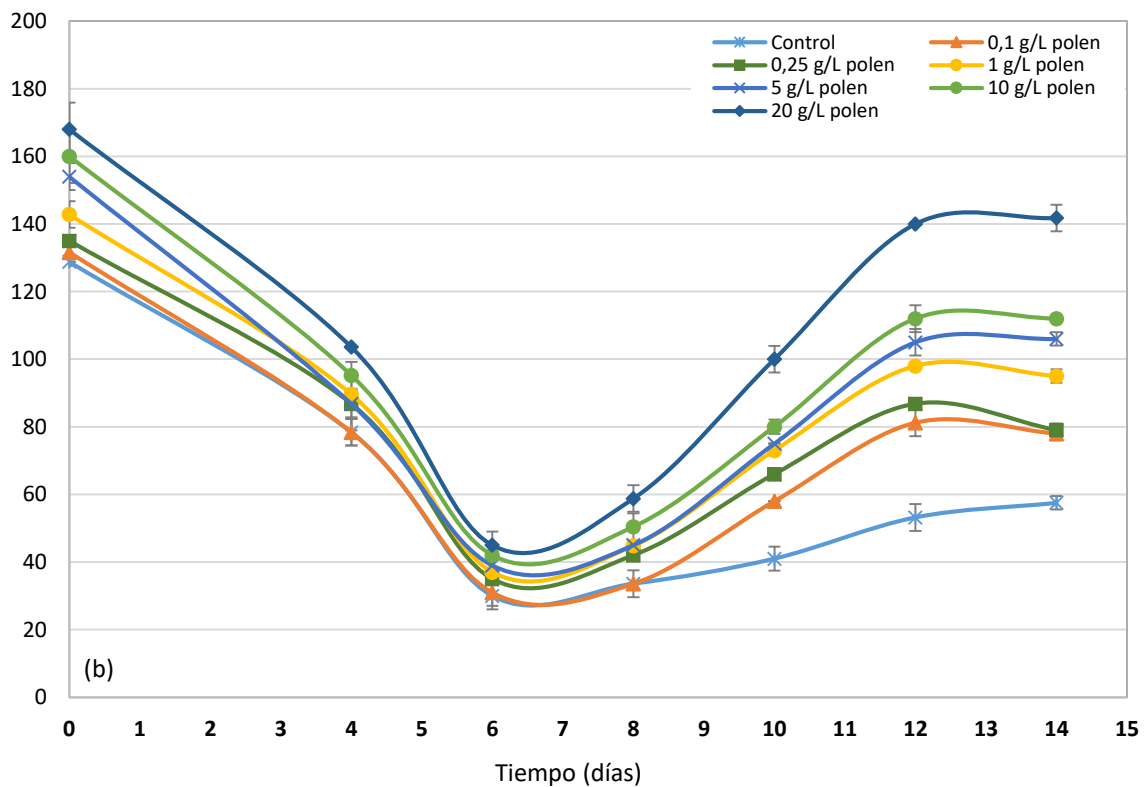


Figura 12. Evolución del nitrógeno fácilmente asimilable por las levaduras (NFA), *Saccharomyces cerevisiae*, en los mostos de uva Palomino fino (a) y Riesling (b) fermentados con diferentes dosis de polen.

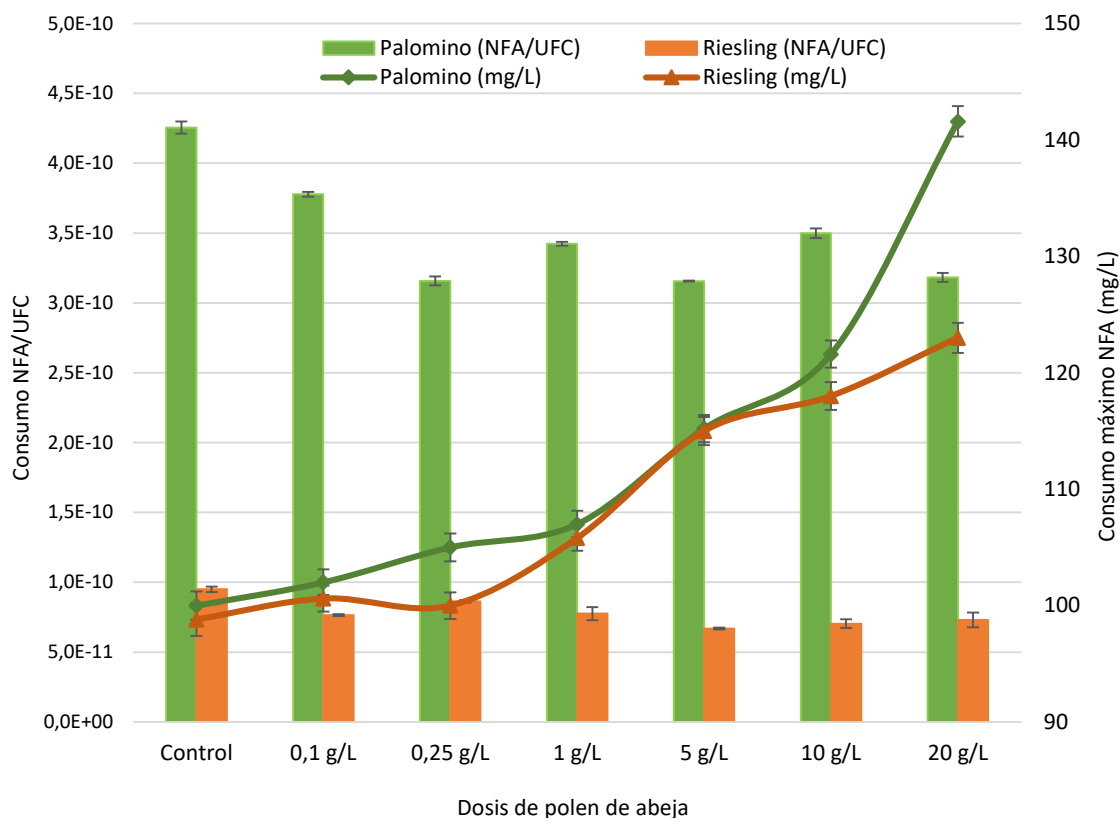


Figura 13. Consumo máximo de NFA frente al consumo máximo de NFA/UFC durante la fase de crecimiento exponencial de mostos de uva Palomino fino y de Riesling fermentados con diferentes dosis de polen.

4.1.3 Influencia de la dosis de polen sobre las propiedades físico-químicas y los parámetros de color de los vinos finales.

Las Tablas 4 y 5 muestran la influencia del polen de abeja sobre los parámetros físico-químicos de los vinos obtenidos con las variedades Palomino fino y Riesling. En primer lugar, se puede observar un ligero aumento, aunque no significativo, del contenido en etanol para la dosis de 20 g/L con respecto al testigo. Asimismo, la acidez volátil, aumenta de manera significativa a partir de la dosis de polen de abeja de 10 g/L respecto al testigo, mientras que a pequeñas dosis (entre 0,1 y 5 g/L) no se observó ningún efecto. Estos aumentos podrían ser debidos principalmente a las pequeñas contribuciones de azúcares que produce el polen a altas dosis (Tablas 2 y 3). Sin embargo, desde el punto de vista enológico, estos incrementos no afectan sensorialmente la calidad de los vinos. En relación con la acidez total y el pH, no se observa influencia alguna con las dosis de polen. Solo a altas dosis (20 g/L) hay una ligera

disminución y aumento en la acidez total y el pH, respectivamente. Este efecto podría atribuirse a la contribución de K del polen, que solo podría ser apreciable a dosis altas ya que se encuentra en el polen en una proporción de 4 g/kg (Campos et al., 2008).

Los valores medios y de desviación estándar de las coordenadas CIELab, a^* (rojo/verde), b^* (amarillo/azul) y L^* (luminosidad), y de saturación del color C^* (croma) y H^* (tono) para todos los vinos, se muestran en las Tablas 4 y 5 (Palomino y Riesling respectivamente). Como se puede observar, los valores de las coordenadas a^* , b^* y C^* aumentan de manera significativa a partir de 1 g/L de polen en ambos vinos, con respecto a los testigos. Este aumento indica un desplazamiento significativo de los vinos hacia a los tonos naranja intenso y oscuro. Por el contrario, tanto el control como las dosis bajas de polen se mantuvieron dentro de las tonalidades amarillas, típicas de los vinos blancos jóvenes. Además, los resultados mostraron un aumento significativo en la intensidad del color y la absorbancia a 420 nm (amarillo), a partir de 1 g/L de polen. Todos estos resultados pueden afectar negativamente a la calidad visual del vino blanco, dando una apariencia mucho más evolucionada en los vinos finales. Este efecto puede deberse a una cierta solubilización de los compuestos polifenólicos y pigmentos, como flavonoides, leucotrienos, catequinas, ácidos fenólicos (1,6 %) y β -caroteno (0,07%) que están presentes en la composición del polen de abeja (Komosinska-Vassev et al., 2015). Este mismo comportamiento se pudo observar cuando se elaboraron hidromieles con polen de abeja (Roldán et al., 2011). Con respecto a los valores de saturación del color, el polen no produce variaciones significativas de L^* y H^* en los vinos finales (Tablas 4 y 5).

Tabla 4. Composición físico-química de los vinos de Palomino fino fermentados con diferentes dosis de polen.

Parámetros	Vinos Palomino fino con dosis de polen						
	Control	0,1 g/L	0,25 g/L	1 g/L	5 g/L	10 g/L	20 g/L
% Alcohol v/v	9,81 ± 0,03 ^a	9,78 ± 0,01 ^a	9,72 ± 0,01 ^a	9,73 ± 0,02 ^a	9,52 ± 0,02 ^a	9,91 ± 0,02 ^a	10,08 ± 0,02 ^a
pH	2,99 ± 0,01 ^a	3,01 ± 0,00 ^a	3,01 ± 0,00 ^a	3,01 ± 0,00 ^a	3,04 ± 0,01 ^a	3,04 ± 0,00 ^a	3,13 ± 0,00 ^a
Acidez total (g/L)	6,24 ± 0,16 ^a	6,01 ± 0,03 ^a	6,08 ± 0,01 ^a	6,27 ± 0,03 ^a	6,44 ± 0,02 ^a	6,21 ± 0,00 ^a	5,97 ± 0,00 ^a
Acidez volátil (g/L)	0,10 ± 0,00 ^a	0,11 ± 0,00 ^a	0,10 ± 0,00 ^a	0,10 ± 0,00 ^a	0,10 ± 0,00 ^a	0,15 ± 0,00 ^b	0,24 ± 0,00 ^c
Glucosa (g/L)	0,214 ± 0,016 ^a	0,187 ± 0,017 ^b	0,190 ± 0,020 ^b	0,170 ± 0,020 ^c	0,110 ± 0,000 ^d	0,110 ± 0,000 ^d	0,130 ± 0,000 ^e
Fructosa (g/L)	0,468 ± 0,019 ^a	0,194 ± 0,007 ^b	0,190 ± 0,010 ^b	0,380 ± 0,040 ^c	0,420 ± 0,000 ^d	0,370 ± 0,000 ^c	0,150 ± 0,010 ^e
L*	98,97 ± 0,04 ^a	98,85 ± 0,16 ^a	98,79 ± 0,07 ^a	98,63 ± 0,10 ^a	98,51 ± 0,08 ^a	98,47 ± 0,06 ^a	97,84 ± 0,05 ^a
a*	1,02 ± 0,03 ^a	1,06 ± 0,03 ^a	1,07 ± 0,02 ^{a,b}	1,16 ± 0,03 ^b	1,28 ± 0,01 ^{c,d}	1,35 ± 0,02 ^d	1,65 ± 0,02 ^e
b*	5,92 ± 0,04 ^a	6,05 ± 0,08 ^a	6,17 ± 0,03 ^a	6,86 ± 0,05 ^b	7,50 ± 0,07 ^{c,d}	7,83 ± 0,01 ^d	10,09 ± 0,01 ^e
H*	99,71 ± 0,32 ^a	99,92 ± 0,40 ^a	99,57 ± 0,15 ^a	99,55 ± 0,25 ^a	99,64 ± 0,04 ^a	99,81 ± 0,12 ^a	99,28 ± 0,08 ^a
C*	6,01 ± 0,04 ^a	6,14 ± 0,07 ^a	6,47 ± 0,03 ^{a,b}	6,96 ± 0,05 ^b	7,61 ± 0,07 ^{c,d}	7,95 ± 0,01 ^d	10,22 ± 0,02 ^e
Intensidad de color	0,11 ± 0,00 ^a	0,11 ± 0,01 ^a	0,12 ± 0,00 ^a	0,14 ± 0,00 ^b	0,16 ± 0,01 ^c	0,18 ± 0,01 ^d	0,21 ± 0,00 ^e
Abs. 420	0,09 ± 0,00 ^a	0,09 ± 0,01 ^a	0,10 ± 0,00 ^{a,b}	0,11 ± 0,00 ^{b,c}	0,12 ± 0,00 ^{c,d}	0,13 ± 0,00 ^d	0,17 ± 0,00 ^e

Diferentes letras en superíndice indican que existen diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$), obtenido mediante ANOVA bidireccional, aplicando la prueba de análisis múltiple de Bonferroni (BSD).

Tabla 5. Composición físico-química de los vinos Riesling fermentados con diferentes dosis de polen

Parámetros	Vinos Riesling con dosis de polen						
	Control	0,1 g/L	0,25 g/L	1 g/L	5 g/L	10 g/L	20 g/L
% Alcohol v/v	12,47 ± 0,15 ^a	12,67 ± 0,05 ^a	12,67 ± 0,05 ^a	12,63 ± 0,05 ^a	12,57 ± 0,05 ^a	12,70 ± 0,10 ^a	12,77 ± 0,05 ^a
pH	3,39 ± 0,01 ^a	3,39 ± 0,01 ^a	3,39 ± 0,01 ^a	3,38 ± 0,01 ^a	3,43 ± 0,01 ^a	3,47 ± 0,05 ^a	3,57 ± 0,02 ^a
Acidez total (g/L)	3,98 ± 0,03 ^a	3,94 ± 0,07 ^a	4,06 ± 0,03 ^a	4,04 ± 0,08 ^a	4,09 ± 0,08 ^a	3,96 ± 0,01 ^a	3,90 ± 0,01 ^a
Acidez volátil (g/L)	0,25 ± 0,01 ^a	0,23 ± 0,01 ^b	0,23 ± 0,01 ^b	0,18 ± 0,00 ^c	0,13 ± 0,01 ^d	0,28 ± 0,01 ^e	0,32 ± 0,01 ^f
Glucosa (g/L)	0,028 ± 0,001 ^a	0,194 ± 0,003 ^b	0,207 ± 0,003 ^c	0,228 ± 0,002 ^d	0,227 ± 0,000 ^d	0,246 ± 0,002 ^d	0,251 ± 0,002 ^d
Fructosa (g/L)	0,083 ± 0,004 ^a	0,436 ± 0,005 ^{b,c}	0,432 ± 0,003 ^c	0,395 ± 0,002 ^d	0,264 ± 0,002 ^e	0,259 ± 0,000 ^e	0,252 ± 0,024 ^e
L*	98,98 ± 0,02 ^a	99,16 ± 0,01 ^a	99,19 ± 0,03 ^a	99,16 ± 0,03 ^a	98,69 ± 0,07 ^a	97,49 ± 0,01 ^a	97,52 ± 0,04 ^a
a*	0,59 ± 0,02 ^a	0,53 ± 0,01 ^a	0,54 ± 0,02 ^a	0,75 ± 0,02 ^b	0,91 ± 0,01 ^c	1,26 ± 0,01 ^d	2,03 ± 0,01 ^e
b*	4,10 ± 0,02 ^a	4,20 ± 0,01 ^a	4,30 ± 0,01 ^a	4,95 ± 0,02 ^b	6,54 ± 0,05 ^c	8,58 ± 0,02 ^d	12,74 ± 0,02 ^e
H*	97,44 ± 0,29 ^a	97,25 ± 0,25 ^a	97,7 ± 0,36 ^a	97,81 ± 0,26 ^a	97,9 ± 0,16 ^a	98,4 ± 0,08 ^a	99,1 ± 0,08 ^a
C*	4,53 ± 0,02 ^a	4,24 ± 0,01 ^a	4,39 ± 0,01 ^a	4,80 ± 0,03 ^a	6,61 ± 0,05 ^b	8,58 ± 0,02 ^c	12,9 ± 0,02 ^d
Intensidad de color	0,08 ± 0,01 ^a	0,07 ± 0,01 ^a	0,07 ± 0,01 ^a	0,10 ± 0,01 ^b	0,12 ± 0,01 ^c	0,19 ± 0,01 ^d	0,25 ± 0,01 ^e
Abs. 420	0,06 ± 0,01 ^a	0,06 ± 0,01 ^{b,c}	0,06 ± 0,01 ^c	0,10 ± 0,01 ^{d,e}	0,10 ± 0,01 ^e	0,14 ± 0,01 ^f	0,21 ± 0,01 ^g

Diferentes letras en superíndice indican que existen diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$), obtenido mediante ANOVA bidireccional, aplicando la prueba de análisis múltiple de Bonferroni (BSD).

4.1.4 Evaluación de los efectos de la adición de polen sobre los compuestos volátiles del vino y sus correspondientes VAO.

4.1.4.1 Influencia de la dosis de polen sobre los compuestos volátiles

En la Figura 14 se muestran los valores de los compuestos volátiles totales obtenidos en los vinos de Palomino y Riesling testigos y a las diferentes dosis de polen. Al igual que ocurría en la fermentación de hidromieles (Roldán et al., 2011), la adición de polen de abeja contribuye con un aumento de la concentración de los compuestos volátiles totales en los vinos de Palomino fino y Riesling. No obstante, el comportamiento que presentan los vinos, al adicionar polen, fue distinto. En los vinos de Palomino fino, se observaron dos rangos de incrementos de los compuestos volátiles con respecto al testigo (Figura 14). Entre las dosis de 0,1 y 1 g/L, se produce un ligero aumento entre un 20 % y un 40 %, mientras que a partir de 5 g/L, los valores aumentan entre 108 % y 120 %, sin que hubiera una correlación entre la concentración de compuestos volátiles y la dosis de polen aplicada. Sin embargo, en los mostos de Riesling, la concentración de compuestos volátiles aumenta de forma progresiva hasta alcanzar un máximo a la dosis de 5 g/L, con un incremento total del 49 %, mientras que para las dosis de 10 y 20 g/L, los aumentos con respecto al testigo se reducen significativamente en torno al 14 %.

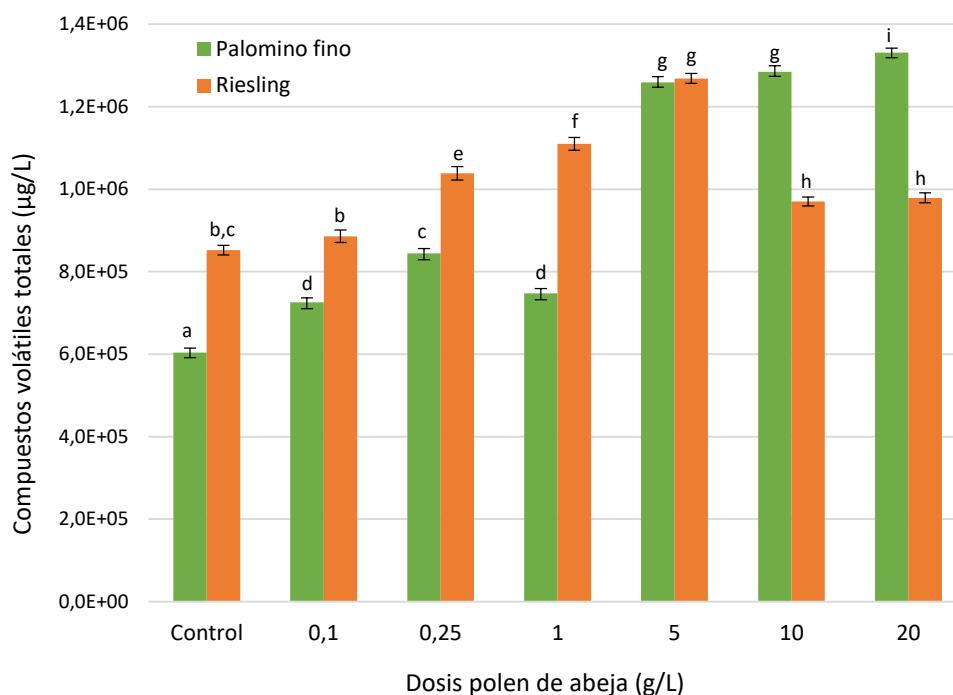


Figura 14. Concentración total de compuestos volátiles de vinos de Palomino fino y Riesling fermentados con diferentes dosis de polen. Diferentes letras en superíndice indican que existen diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$), obtenido mediante ANOVA bidireccional, aplicando la prueba de análisis múltiple de Bonferroni (BSD).

Cuando se analizan los compuestos volátiles totales producidos por gramo de polen en comparación con los testigos (Figura 15), los valores más altos se obtienen en los vinos de Palomino fino y Riesling a las dosis bajas de polen (0,1 y 0,25 g/L). Sin embargo, estos valores se reducen significativamente a partir de la dosis de 5 g/L, alcanzado los niveles más bajos a la dosis de 20 g/L. Este efecto estaría indicando a partir de la dosis de 5 g/L los efectos sobre el aroma no son proporcionales a la cantidad de polen añadido y que probablemente se produzca un cierto efecto de saturación. Como cabría esperar, excepto para la dosis de 1 g/L, se observa que la proporción de compuestos obtenida por gramo de polen es mayor en Palomino que en Riesling.

De forma general, en ambas variedades, el enriquecimiento de compuestos volátiles producidos por el polen de abeja se debe principalmente a los alcoholes superiores, metanol, ésteres y acetaldehído.

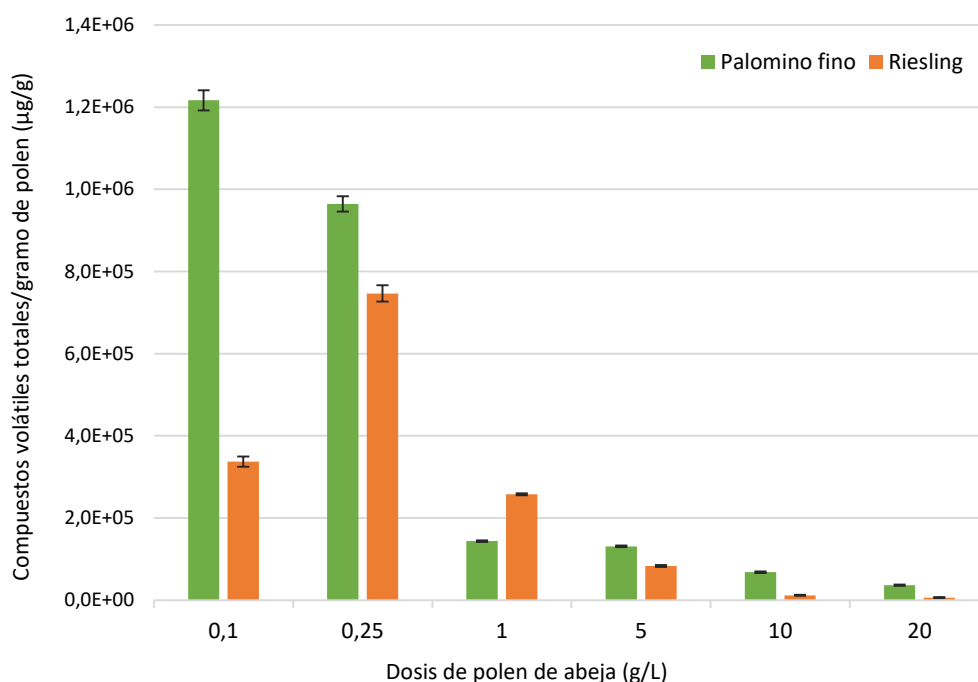


Figura 15. Tasa de producción de compuestos volátiles por gramo de polen en vinos de Palomino fino y Riesling fermentados con diferentes dosis de polen.

4.1.4.2 Alcoholes superiores y metanol

Entre los principales compuestos volátiles, caben destacar por su concentración los alcoholes superiores. Como se puede observar en la Tablas 6 y 7, el alcohol isoamílico alcanza niveles superiores a 400 o 350 mg/L para las dosis entre 5 - 20 g/L, en los vinos de Palomino fino y Riesling respectivamente. Estos valores de alcohol isoamílico podrían afectar a las cualidades sensoriales de los vinos. De hecho, algunos autores señalan que cuando el alcohol isoamílico se encuentra en niveles de 300 mg/L (umbral sensorial) proporcionan un aroma y sabor agradable (Vidrih and Hribar, 2007). Sin embargo, cuando su concentración supera los 400 mg/L, aparecen olores y sabores desagradables que pueden afectar a la calidad global de los vinos (Vidrih and Hribar, 2007). La síntesis de estos alcoholes superiores podría justificarse por dos mecanismos biológicos que se producen en la levadura: en primer lugar, a la vía catabólica de Erlich, basada en los aminoácidos (Styger et al., 2011), y, en segundo lugar, la ruta anabólica de los carbohidratos (Quirós et al., 2013). Según estas teorías, el aumento de los alcoholes superiores con la adición de polen se podría justificar principalmente por la

vía catabólica, teniendo en cuenta que el polen está proporcionando compuestos precursores especialmente aminoácidos (Campos et al., 2008; Roldán et al., 2011).

Por otro lado, las concentraciones de isobutanol, 2-propanol y n-propil alcohol aumentan significativamente en ambas variedades, especialmente a 5 g/L y a altas dosis de polen (10 y 20 g/L). Asimismo, los contenidos de metanol de los vinos se incrementan de forma general con la dosis de polen, probablemente debido a su riqueza en pectinas (Campos et al., 2008). Las pectinas podrían solubilizarse y ser metabolizadas por las levaduras durante la fermentación alcohólica, generando metanol a través de la hidrólisis enzimática (Ribéreau-Gayon et al., 2003; Campos et al., 2008).

4.1.4.3 Aldehídos

En los vinos Palomino fino y en menor medida en los vinos Riesling, se observa un aumento en la concentración de acetaldehído (Tablas 6 Y 7), especialmente a altas dosis de polen, llegándose a superar los niveles de 100 mg/L de acetaldehído, lo que podría afectar a la calidad sensorial del vino. Los altos niveles de acetaldehído alcanzados a dosis de 10 y 20 g/L de polen, podrían estar justificados por reacciones de oxidación química, pero no por la oxidación biológica del etanol a acetaldehído, ya que, una vez finalizada la fermentación alcohólica, los vinos no desarrollaron crianza biológica bajo levadura de flor.

4.1.4.4 Alcoholes

Como se muestra en las Tablas 6 y 7, para ambas variedades, la adición de polen, produce un marcado descenso en las concentraciones de alcoholes totales, con respecto a sus vinos testigo, sin existir una correlación lineal con la dosis de polen aplicada. El porcentaje de reducción medio para Riesling y Palomino fino fue similar, del orden de un 40 y 59 %, respectivamente. Sin embargo, la evolución de los distintos alcoholes presenta diferentes comportamientos para las dos variedades. En los vinos de Riesling, los alcoholes mayoritarios, como el alcohol feniletílico y el 1H-indol-3-etanol, fueron los responsables de esta disminución (Tabla 7). Mientras que los demás alcoholes aumentaron en proporciones diferentes, especialmente el 1-pentanol. En el caso de los

vinos de Palomino fino, el 1-pentanol y el 1H-indol-3-etanol, se redujeron significativamente, mientras que los restantes compuestos fluctuaron con respecto al testigo y a las dosis de polen (Tabla 6). Por lo tanto, se podría indicar que la presencia de polen induce a las levaduras a producir menos alcoholes durante la fermentación alcohólica de mostos de variedades blancas de uva.

4.1.4.5 Ácidos

Respecto al comportamiento de los ácidos, la mayoría de ellos con perfiles aromáticos “grasos”, se observa un ligero aumento con las dosis bajas de polen, del orden del 10 % para los vinos de Palomino fino y del 5 % para los de Riesling. A las dosis altas de polen, 10 y 20 g/L, los niveles de ácidos disminuyeron significativamente en comparación con los testigos (Tablas 6 y 7). El principal compuesto responsable de ese ligero aumento a dosis bajas, es el ácido octanoico, seguido por otros ácidos menos influyentes, como el ácido n-decanoico, el ácido 9-decenoico y el ácido benzoico. Sin embargo, el otro ácido principal, el ácido hexanóico, disminuye significativamente con la dosis de polen, en ambas variedades. La disminución más acusada se produce principalmente a las dosis altas de polen (10 y 20 g/L), donde prácticamente todos los valores de ácidos disminuyen muy por debajo del valor del vino testigo. De acuerdo con estos resultados, podría indicarse que el polen está jugando un papel importante en la producción o la síntesis de ácidos grasos según la dosis añadida. Según algunos autores (Lambrechts and Pretorius, 2000), las levaduras utilizan los ácidos grasos para la síntesis de ácidos grasos monoinsaturados, como el ácido oleico y linoleico. Teniendo en cuenta que el polen de abeja es una fuente significativa y rica en estos ácidos (Anexo. Tabla 37), es posible especular que las levaduras disminuyen la síntesis de ácidos grasos a altas dosis de polen por algún mecanismo de regulación.

4.1.4.6 Ésteres

Los ésteres formados durante la fermentación alcohólica juegan un papel fundamental en el aroma del vino, ya que contribuyen en general con aromas afrutados, que son de gran interés sensorial. Como se puede observar, la evolución de los ésteres, en respuesta a la dosis de polen revelan comportamientos diferentes en los vinos de ambas variedades. En los vinos de Palomino fino, salvo para la dosis de 1 g/L, los valores de ésteres aumentan significativamente, entre un 73 y un 216 %, en comparación con el testigo, sin mostrar una correlación con la dosis de polen (Tabla 6). En el caso de los vinos de Riesling, la concentración de ésteres aumenta mucho menos, de un 14 a un 19 % en comparación con el testigo, desde la dosis de 0,1 a 1 g/L; para luego disminuir significativamente de un 5 a un 25 %, a dosis media y altas (Tabla 7). El acetato de etilo, es el compuesto responsable de este comportamiento y de las diferencias encontradas en los ésteres totales, debido a que es el éster encontrado en mayor concentración en los vinos de ambas variedades, Palomino fino y Riesling.

En cuanto a los otros ésteres principales, también se encuentran diferencias importantes entre los dos tipos de vinos. En los vinos Palomino fino, el succinato de dietilo muestra una tendencia a aumentar con la dosis de polen, mientras que el octanoato de etilo no presenta variaciones (Tabla 6). Sin embargo, en los vinos de Riesling, el octanoato de etilo y el acetato de isoamilo muestran un incremento significativo hasta la dosis de 1 g/L o 0,25 g/L, mientras que el succinato de dietilo permanece constante con respecto a la dosis de polen y el vino testigo (Tabla 7).

La síntesis de ésteres está condicionada por la mayor o menor presencia de ácidos grasos en el mosto, que, junto con los alcoholes, son los sustratos de las reacciones de esterificación. Por lo tanto, la mayor presencia de ácidos grasos en vinos con bajas dosis de polen podría justificar el comportamiento observado en los ésteres. Además, según algunos autores (Yilmaztekin et al., 2009), cuando se encuentran alcoholes superiores como el alcohol isoamílico en concentraciones superiores a 400 mg/L, bloquean la formación de ésteres. Este fenómeno de inhibición se observa a las dosis altas de polen, 10 y 20 g/L, especialmente con el acetato de isoamilo (Tabla 6).

4.1.4.7 Alcoholes C6

Con respecto a los alcoholes C6, responsables de los aromas herbáceos, se observan comportamientos opuestos en ambas variedades con respecto a sus testigos. En los vinos de Palomino fino, los niveles de alcoholes C6, descendieron con el uso de polen, especialmente con las dosis altas (10 y 20 g/L) (Tabla 6); mientras que en los vinos de Riesling, los niveles aumentaron significativamente, con valores máximos para 3-hexen-1-ol (Tabla 7). Este hecho podría justificarse considerando la riqueza del polen en ácido α -linoleico y, en menor medida, ácido linoleico (Szczesna, 2006), los cuales son precursores directos de la síntesis de 3-hexen-1-ol (Z, E) y 1-hexanol, respectivamente, producidos por oxidación enzimática. Estas reacciones tienen lugar en el mosto de uva antes del comienzo de la fermentación, por lo que podríamos indicar que el polen contribuye a la síntesis de alcoholes C6, condicionado por la solubilización de estos ácidos grasos y a la presencia de oxígeno disuelto en el mosto. La formación de estos alcoholes, podría asociarse al tiempo transcurrido entre el momento en que se agrega el polen y el comienzo de la fermentación alcohólica.

4.1.4.8 Terpenos

La fracción de compuestos terpénicos, como los compuestos representativos de los aromas varietales, también presentan un aumento significativo de sus contenidos con la dosis de polen, para ambas variedades. Como se puede observar (Tablas 6 y 7), la mayor parte de los terpenos analizados aumentan ligeramente a dosis bajas e intermedia, para luego disminuir o permanecer constantes con respecto al testigo a dosis altas. Los terpenos, son compuestos aromáticos varietales que dan notas florales y cítricas a los vinos, principalmente concentrados en los hollejos de las uvas (Genovese et al., 2007; Ruiz et al., 2009). Los resultados indican que, dado el origen floral de estos compuestos, el polen apícola también podría ser un portador importante de terpenos que podrían ser solubilizados en el mosto durante la fermentación alcohólica. En este sentido, cabría esperar un aumento mucho más significativo a las dosis más altas de polen; sin embargo, esto no ocurre para la mayoría de los terpenos.

Esto sugiere que, a dosis elevadas de polen, se produce un efecto de saturación por concentración en compuestos terpénicos en el mosto, y/o que se han producido reacciones de oxidación de estos compuestos.

Tabla 6. Concentración de compuestos volátiles ($\mu\text{g/L}$) de los vinos de Palomino fino fermentados con diferentes dosis de polen.

Compuestos volátiles	Dosis de polen						
	Control	0,1 g/L	0,25 g/L	1 g/L	5 g/L	10 g/L	20 g/L
Alcoholes superiores							
2-propanol	105870,0 ^a ±717,0	52530,0 ^b ±99,0	70910,0 ^c ±1418,5	176610,0 ^d ±3464,8	180610,0 ^e ±1547,1	179760,0 ^{d,e} ±660,4	160900,0 ^f ±731,1
alcohol n-propílico	88200,0 ^a ±664,6	114900,0 ^b ±1288,1	108745,0 ^c ±219,9	78335,0 ^d ±290,6	187890,0 ^e ±1216,2	207450,0 ^f ±188,1	209900,0 ^f ±818,8
Isobutanol	28236,7 ^a ±191,1	51910,0 ^b ±118,8	85036,7 ^c ±197,9	29493,3 ^a ±402,8	59415,0 ^d ±210,0	68440,0 ^e ±107,5	69015,0 ^e ±105,4
Alcohol isoamílico	217465,0 ^a ±204,4	283473,3 ^b ±2694,4	333866,7 ^c ±774,4	236230,0 ^d ±4406,7	464700,0 ^e ±1920,5	416405,0 ^f ±642,8	462065,0 ^e ±1791,1
Total	439771,67	502813,3	598558,37	520668,33	892615	872055	901880
% Alcoholes superiores	72,82%	69,29%	70,84%	69,66%	70,89%	67,87%	67,75%
Metanol							
Total	89283,3 ^a ±314,00	110650,00 ^b ±930,55	122585,00 ^c ±365,57	103736,70 ^d ±596,23	207495,00 ^e ±123,74	217445,00 ^f ±610,23	189940,00 ^g ±865,50
% Metanol	14,78%	15,25%	14,51%	13,88%	16,48%	16,92%	14,27%
Ácidos							
Ácido butanoico	31,20 ^a ±0,01	32,46 ^b ±0,05	30,35 ^a ±0,03	47,47 ^c ±0,03	41,67 ^d ±0,04	29,13 ^e ±0,03	24,74 ^f ±0,03
Ácido 3-metil-butanoico	196,67 ^a ±1,88	202,50 ^b ±0,06	203,46 ^c ±0,04	254,65 ^d ±0,01	326,41 ^e ±0,02	202,16 ^f ±0,01	218,98 ^g ±0,03
Ácido hexoxánico	1557,50 ^a ±0,02	1458,17 ^b ±0,02	1560,62 ^c ±0,40	1472,83 ^d ±2,27	1491,13 ^e ±0,03	1176,46 ^f ±0,03	1234,09 ^g ±0,07
Ácido heptanoico	20,74 ^a ±0,02	25,76 ^b ±0,01	26,55 ^b ±0,01	30,21 ^c ±0,02	38,78 ^d ±0,01	30,43 ^{c,e} ±0,02	29,98 ^{c,e} ±0,04
Ácido 2-hexenoico	33,49 ^a ±0,52	42,15 ^b ±0,01	44,44 ^c ±0,02	43,03 ^{b,d} ±0,08	59,23 ^e ±0,00	41,69 ^{b,f} ±0,00	67,47 ^g ±0,03
Ácido octanoico	2455,55 ^a ±0,06	2690,05 ^b ±0,02	2529,38 ^c ±0,01	2262,71 ^d ±0,02	2221,06 ^e ±0,06	1773,16 ^f ±0,00	1477,80 ^g ±0,09
Ácido nonanoico	25,27 ^a ±0,02	43,01 ^d ±0,02	46,18 ^c ±0,03	52,24 ^d ±0,02	78,38 ^e ±0,02	82,09 ^f ±0,02	44,14 ^g ±0,02
ácido n-decanoico	291,65 ^a ±0,49	424,20 ^b ±0,01	520,83 ^c ±0,17	473,76 ^d ±0,04	494,95 ^e ±0,01	287,80 ^f ±0,01	283,15 ^g ±0,01
Ácido 9-decenoico	260,79 ^a ±0,26	353,87 ^b ±0,01	367,01 ^c ±0,01	315,10 ^d ±0,02	142,22 ^e ±0,03	43,95 ^f ±0,01	1,28 ^g ±0,02
Ácido benzoico	47,72 ^a ±0,08	149,31 ^b ±0,01	141,90 ^c ±0,01	136,89 ^d ±0,01	96,52 ^e ±0,03	29,80 ^f ±0,01	49,92 ^g ±0,02
Ácido bencenoacético	39,58 ^a ±0,04	43,99 ^b ±0,01	53,60 ^c ±0,05	59,10 ^d ±0,02	74,89 ^e ±0,01	49,57 ^f ±0,03	48,66 ^g ±0,01
Total	4960,16±801,10	5465,47±838,02	5524,33±808,40	5147,99±727,90	5065,23±722,75	3746,23±582,37	3480,21±524,10
% Ácidos	0,82%	0,75%	0,65%	0,69%	0,40%	0,29%	0,26%
Alcoholes C-6							
1-Hexanol	420,78 ^a ±0,03	397,31 ^b ±0,02	370,64 ^c ±0,02	400,96 ^d ±0,02	378,67 ^e ±0,02	154,25 ^f ±0,02	343,62 ^g ±0,03
(E) -3-hexen-1-ol	15,07 ^a ±0,03	16,46 ^b ±0,01	14,73 ^c ±0,03	18,45 ^d ±0,02	17,48 ^e ±0,01	6,08 ^f ±0,02	11,80 ^g ±0,01
(Z) -3-hexen-1-ol	77,95 ^a ±0,02	79,90 ^b ±0,01	77,10 ^c ±0,02	90,96 ^d ±0,01	90,44 ^e ±0,04	31,64 ^f ±0,01	54,31 ^g ±0,02
Total	513,80±218,36	493,67±204,05	462,46±190,06	510,37±203,18	486,60±190,99	191,97±79,20	409,73±180,56
% Alcoholes C-6	0,09%	0,07%	0,05%	0,07%	0,04%	0,01%	0,03%
Alcoholes							

3-penten-2-ol	7,72 ^a ±0,13	21,87 ^b ±0,00	22,19 ^b ±0,04	24,71 ^c ±0,01	14,48 ^d ±0,01	24,76 ^c ±0,01	6,72 ^e ±0,00
1-pentanol	3289,78 ^a ±0,01	2064,61 ^b ±0,03	932,28 ^c ±0,03	114,86 ^d ±0,03	1360,76 ^e ±0,02	1419,11 ^f ±0,05	132,76 ^g ±0,01
3-etil-2-pentanol	11,39 ^a ±0,04	10,40 ^b ±0,02	10,34 ^b ±0,03	13,17 ^c ±0,01	12,13 ^d ±0,03	16,29 ^e ±0,01	7,06 ^f ±0,01
4-metil-1-pentanol	14,76 ^a ±0,01	15,49 ^b ±0,01	15,69 ^b ±0,03	18,49 ^c ±0,01	22,45 ^d ±0,03	7,40 ^e ±0,02	14,65 ^e ±0,01
3-metil-1-pentanol	74,18 ^a ±0,02	59,07 ^b ±0,01	58,30 ^c ±0,02	76,00 ^d ±0,01	73,85 ^a ±0,03	27,75 ^e ±0,02	35,23 ^f ±0,02
3-etoxi-1-propanol	99,59 ^a ±0,51	82,07 ^b ±0,00	83,19 ^c ±0,02	88,18 ^d ±0,01	87,93 ^e ±0,10	114,35 ^f ±0,02	59,68 ^g ±0,02
1-octanol	18,28 ^a ±0,04	22,79 ^b ±0,01	20,92 ^c ±0,02	26,29 ^d ±0,04	36,25 ^e ±0,02	20,91 ^c ±0,02	37,94 ^f ±0,01
1-nonanol	4,32 ^a ±0,01	8,10 ^b ±0,01	8,94 ^c ±0,02	14,59 ^d ±0,03	32,64 ^e ±0,02	24,95 ^f ±0,04	37,45 ^g ±0,01
Alcohol de bencilo	32,17 ^a ±0,02	40,44 ^b ±0,00	67,41 ^c ±0,01	68,76 ^d ±0,02	102,49 ^e ±0,01	65,13 ^f ±0,03	93,04 ^g ±0,00
Alcohol feniletílico	1500,63 ^a ±1,51	1642,38 ^b ±0,51	1574,53 ^c ±0,03	1394,74 ^d ±0,02	1251,35 ^e ±0,04	2320,58 ^f ±0,01	2053,28 ^g ±0,01
1H-indol-3-etanol	3267,56 ^a ±0,48	1072,85 ^b ±0,03	274,45 ^c ±0,03	287,53 ^d ±0,02	299,26 ^e ±0,01	33,85 ^f ±0,03	100,88 ^g ±0,01
Total	8320,40±1321,94	5040,07±762,56	3068,23±508,33	2127,32±406,21	3293,58±504,76	4075,08±768,80	2578,69±604,64
% Alcoholes	1,38%	0,69%	0,36%	0,28%	0,26%	0,32%	0,19%
Terpenes							
Óxido de linalool	7,75 ^a ±0,04	11,22 ^b ±0,01	10,18 ^c ±0,01	12,11 ^d ±0,01	14,41 ^e ±0,01	6,21 ^f ±0,01	11,59 ^g ±0,09
Linalool	9,35 ^a ±0,01	10,19 ^b ±0,01	12,79 ^c ±0,01	13,09 ^d ±0,01	16,17 ^e ±0,02	6,53 ^f ±0,02	9,83 ^g ±0,02
a-terpineol	11,70 ^a ±0,02	15,27 ^b ±0,01	16,28 ^c ±0,03	17,09 ^d ±0,02	20,51 ^e ±0,01	7,45 ^f ±0,01	19,78 ^g ±0,03
(R)-(+)-β-citronelol	8,76 ^a ±0,01	10,59 ^b ±0,02	12,15 ^c ±0,01	12,12 ^c ±0,01	10,61 ^b ±0,01	3,84 ^d ±0,01	6,86 ^e ±0,04
2,6-dimethyl-3,7-octadiene, -2,6-diol	23,66 ^a ±0,04	27,38 ^b ±0,02	30,19 ^c ±0,02	26,83 ^d ±0,06	37,30 ^e ±0,01	21,03 ^f ±0,01	37,31 ^e ±0,01
8-hydroxylinalool	19,60 ^a ±0,02	23,35 ^b ±0,01	28,80 ^c ±0,03	25,55 ^d ±0,02	65,75 ^e ±0,01	42,93 ^f ±0,01	82,40 ^g ±0,01
Total	80,82±6,58	98,00±7,34	110,39±8,83	106,80±6,77	164,75±20,94	87,99±15,14	167,75±28,85
% Terpenos	0,01%	0,01%	0,01%	0,01%	0,01%	0,01%	0,01%
Ésteres							
Acetato de etilo	15315,00 ^a ±28,99	37330,00 ^b ±213,55	42115,00 ^c ±123,74	9890,00 ^d ±53,74	27393,33 ^e ±364,00	43615,00 ^f ±265,17	51445,00 ^g ±480,13
Butirato de etilo	5,98 ^a ±0,04	9,98 ^a ±0,03	10,51 ^a ±0,02	12,85 ^a ±0,03	4,70 ^a ±0,01	5,03 ^a ±0,02	5,97 ^a ±0,01
Isovalerato de etilo	3,94 ^a ±0,01	7,62 ^a ±0,04	6,10 ^a ±0,02	8,15 ^a ±0,01	2,89 ^a ±0,01	4,15 ^a ±0,01	0,90 ^a ±0,01
Acetato de isoamilo	68,11 ^a ±0,04	67,00 ^a ±0,02	66,39 ^a ±0,03	75,52 ^a ±0,03	16,23 ^a ±0,01	42,36 ^a ±0,01	10,31 ^a ±0,01
Hexanoato de etilo	94,09 ^a ±0,03	95,05 ^a ±0,01	97,80 ^a ±0,03	114,55 ^a ±0,47	80,88 ^a ±0,10	89,62 ^a ±0,40	50,56 ^a ±0,01
Acetato de hexilo	1,67 ^a ±0,02	0,92 ^a ±0,02	1,00 ^a ±0,02	0,29 ^a ±0,01	0,39 ^a ±0,01	0,42 ^a ±0,02	0,45 ^d ±0,01
2-hydrody-3-metil butanoate de etilo	8,55 ^a ±0,01	10,46 ^a ±0,02	0,36 ^a ±0,01	10,58 ^a ±0,01	4,39 ^a ±0,00	1,70 ^d ±0,02	3,32 ^d ±0,01
Octanoato de etilo	302,80 ^a ±0,01	333,93 ^a ±0,10	300,67 ^a ±0,38	267,10 ^a ±0,01	305,52 ^a ±0,02	313,64 ^a ±0,09	286,21 ^a ±0,01
Nonanoato de etilo	10,24 ^a ±0,02	14,68 ^a ±0,01	13,36 ^a ±0,07	14,46 ^a ±0,02	21,21 ^a ±0,01	18,97 ^a ±0,02	22,43 ^a ±0,02
2-hidroxy-4-metilpentanoato de etilo	13,12 ^a ±0,01	24,52 ^a ±0,03	24,71 ^a ±0,27	18,85 ^a ±0,17	14,37 ^a ±0,02	13,62 ^a ±0,07	31,52 ^a ±0,02
Isoamyl lactate	26,27 ^a ±0,01	29,28 ^a ±0,03	31,85 ^a ±0,08	36,18 ^a ±0,01	43,97 ^a ±0,02	9,54 ^a ±0,04	25,94 ^a ±0,02

Decanoato de etilo	40,28 ^a ±0,01	60,96 ^a ±0,01	60,24 ^a ±0,05	58,99 ^a ±0,03	80,01 ^a ±0,01	53,06 ^a ±0,04	39,26 ^a ±0,01
Succinato de dietilo	700,59 ^a ±0,01	876,39 ^{b,h} ±0,03	903,05 ^{c,h} ±2,01	878,97 ^{d,h} ±0,02	931,81 ^{e,h} ±0,01	987,87 ^{f,h} ±0,02	958,23 ^{g,h} ±0,07
9-decenoato de etilo	60,25 ^a ±0,00	80,48 ^a ±0,02	77,57 ^a ±0,46	55,97 ^a ±0,01	31,56 ^a ±0,04	7,47 ^a ±0,02	1,44 ^a ±0,01
Fenilacetato de etilo	2,28 ^a ±0,01	2,19 ^a ±0,01	3,11 ^a ±0,01	2,48 ^a ±0,02	3,49 ^a ±0,03	4,36 ^a ±0,03	4,94 ^a ±0,02
Acetato de fenetilo	51,05 ^a ±0,00	53,60 ^a ±0,02	61,84 ^a ±0,04	61,74 ^a ±0,03	74,85 ^a ±0,05	30,07 ^a ±0,01	41,16 ^a ±0,01
Malato de dietilo	23,95 ^a ±0,00	32,45 ^a ±0,02	35,09 ^a ±0,03	34,88 ^a ±0,01	36,99 ^a ±0,04	38,73 ^a ±0,03	38,20 ^a ±0,02
3-hidroxytridecanoato de etilo	27,09 ^a ±0,01	42,59 ^a ±0,03	45,87 ^a ±0,05	26,41 ^a ±0,01	32,99 ^a ±0,03	18,14 ^a ±0,02	17,30 ^a ±0,07
Vainillato de metilo	1,54 ^a ±0,01	5,50 ^a ±0,02	6,10 ^a ±0,02	4,99 ^a ±0,03	6,72 ^a ±0,03	3,14 ^a ±0,02	5,22 ^a ±0,00
Total	16756,8±3499,0	39077,60±208,83	43860,65±212,74	11572,96±205,80	29086,32±220,61	45256,88±235,23	52988,36±227,22
% Ésteres	2,77%	5,39%	5,19%	1,55%	2,31%	3,52%	3,98%
Aldehídos							
Acetaldehído	44190,00 ^a ±90,00	61910,00 ^b ±106,60	70720,00 ^c ±303,30	103520,00 ^d ±1978,00	120820,00 ^e ±3814,00	141960,00 ^f ±1831,00	179590,00 ^g ±82,66
Benzeneacetaldehído	74,95 ^a ±0,01	80,33 ^a ±0,01	90,46 ^a ±0,64	87,55 ^a ±0,04	86,44 ^a ±0,01	85,20 ^a ±1,00	83,31 ^a ±0,01
Total	44264,95	61990,33	70810,46	103607,55	120906,44	142045,2	179673,31
% Aldehídos	7,33%	8,54%	8,38%	13,86%	9,60%	11,05%	13,50%

Diferentes letras en superíndice indican que existen diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$), obtenido mediante ANOVA bidireccional, aplicando la prueba de análisis múltiple de Bonferroni (BSD).

Tabla 7. Concentración de compuestos volátiles ($\mu\text{g/L}$) de los vinos de Riesling fermentados con diferentes dosis de polen.

Compuestos volátiles	Dosis de polen						
	Control	0,1 g/L	0,25 g/L	1 g/L	5 g/L	10 g/L	20 g/L
Alcoholes superiores							
2-propanol	309195,0 ^a ±1031,7	333025,0 ^b ±2168,7	421750,0 ^c ±1671,6	452105,0 ^d ±557,9	496390,0 ^d ±1294,0	233655,0 ^e ±3259,1	244330,0 ^f ±4692,4
alcohol n-propílico	73876,7 ^a ±146,7	77820,0 ^b ±8,5	85235,0 ^{c,h} ±99,7	84870,0 ^{d,h,i} ±164,0	84740,0 ^{e,i} ±746,4	81616,7 ^{f,i} ±316,0	82863,3 ^{g,i} ±227,7
Isobutanol	42856,7 ^a ±134,8	44130,0 ^a ±139,9	47965,0 ^b ±282,1	49795,0 ^c ±112,4	63143,3 ^c ±248,3	77023,3 ^d ±267,1	87596,7 ^e ±127,0
Alcohol isoamílico	233150,0 ^a ±55,2	234080,0 ^a ±687,3	261420,0 ^b ±898,6	297336,7 ^c ±1180,0	402865,0 ^c ±689,4	387810,0 ^d ±1425,1	363245,0 ^e ±631,4
Total	659078,33	689055	816370	884106,7	1047138,33	780105,01	778034,99
% Alcoholes superiores	77,32%	77,76%	78,58%	79,65%	82,53%	80,37%	79,46%
Metanol							
Total	94920,00 ^a ±661,85	91554,99 ^b ±818,12	116020,00 ^c ±271,53	115415,00 ^c ±675,29	117565,00 ^c ±996,31	106653,30 ^d ±870,21	101043,30 ^e ±265,50
% Metanol	11,14%	10,33%	11,17%	10,40%	9,27%	10,99%	10,32%
Ácidos							
Ácido butanoico	9,20 ^a ±0,01	17,27 ^b ±0,01	19,79 ^c ±0,01	21,03 ^d ±0,02	16,23 ^e ±0,01	14,66 ^f ±0,02	14,79 ^f ±0,03
Ácido 3-metil-butanoico	102,51 ^a ±0,01	172,37 ^b ±0,02	203,13 ^c ±0,02	224,52 ^d ±0,06	226,47 ^e ±0,01	246,63 ^f ±0,02	209,30 ^g ±0,01
Ácido hexoxánico	1800,48 ^a ±0,01	1557,67 ^b ±0,01	1560,62 ^c ±0,05	862,41 ^d ±0,01	1142,74 ^e ±1,26	1243,90 ^f ±0,01	1121,24 ^g ±0,02
Ácido heptanoico	23,11 ^a ±0,01	34,47 ^b ±0,01	49,13 ^c ±0,03	33,74 ^b ±0,02	29,88 ^{d,e} ±0,04	30,26 ^e ±0,00	29,54 ^e ±0,01
Ácido 2-hexenoico	34,45 ^a ±0,00	46,91 ^b ±0,01	58,20 ^c ±0,02	49,73 ^d ±0,02	42,83 ^e ±0,03	75,40 ^f ±0,02	88,30 ^g ±0,01
Ácido octanoico	2842,19 ^a ±0,04	2996,03 ^b ±0,01	1250,66 ^c ±0,10	1865,23 ^d ±0,03	2110,08 ^e ±0,02	1776,85 ^f ±0,01	1559,16 ^g ±0,01
Ácido nonanoico	7,54 ^a ±0,04	13,36 ^b ±0,01	16,64 ^c ±0,01	19,27 ^d ±0,01	23,97 ^e ±0,02	32,28 ^f ±0,04	38,21 ^g ±0,01
ácido n-decanoico	526,20 ^a ±0,02	706,02 ^b ±0,01	853,66 ^c ±0,02	965,94 ^d ±2,49	597,96 ^e ±0,02	515,08 ^f ±0,04	482,44 ^g ±0,01
Ácido 9-decenoico	109,64 ^a ±0,01	173,57 ^b ±0,02	258,01 ^c ±0,01	286,32 ^d ±0,43	75,81 ^e ±0,00	14,45 ^f ±0,01	15,05 ^f ±0,01
Ácido benzoico	72,85 ^a ±0,01	114,87 ^b ±0,01	137,45 ^c ±0,01	138,33 ^d ±0,08	87,65 ^e ±0,02	87,08 ^e ±0,02	71,91 ^f ±0,01
Ácido bencenoacético	8,50 ^a ±0,01	11,90 ^b ±0,01	14,14 ^c ±0,01	15,52 ^d ±0,02	13,86 ^c ±0,01	14,43 ^{c,e} ±0,03	4,09 ^f ±0,03
Total	5536,67±940,19	5844,44±941,96	4421,42±555,39	4482,05±590,41	4367,47±667,10	4051,03±596,20	3634,04±527,25
% Ácidos	0,65%	0,66%	0,43%	0,40%	0,34%	0,42%	0,37%
Alcoholes C-6							
1-Hexanol	435,69 ^a ±0,01	509,13 ^b ±0,02	520,71 ^c ±0,52	567,83 ^d ±0,04	582,96 ^e ±0,00	565,08 ^f ±0,00	606,67 ^g ±0,01
(E) -3-hexen-1-ol	14,44 ^a ±0,01	29,92 ^b ±0,00	37,89 ^c ±0,00	40,44 ^d ±0,01	28,84 ^e ±0,02	35,97 ^f ±0,01	29,45 ^g ±0,01
(Z) -3-hexen-1-ol	38,19 ^a ±0,01	22,53 ^b ±0,00	102,31 ^c ±0,01	100,70 ^d ±0,01	75,91 ^e ±0,00	95,33 ^f ±0,00	81,30 ^g ±0,00
Total	488,32±236,65	561,59±278,83	660,90±262,15	708,97±288,67	687,71±307,23	696,38±289,87	717,43±319,34
% Alcoholes C-6	0,06%	0,06%	0,06%	0,06%	0,05%	0,07%	0,07%
Alcoholes							

3-penten-2-ol	11,23 ^a ±0,01	28,27 ^a ±0,02	26,36 ^a ±0,01	43,71 ^a ±0,01	28,96 ^a ±0,14	39,17 ^a ±0,01	27,56 ^a ±0,00
1-pentanol	1217,15 ^a ±0,02	1553,91 ^b ±0,01	1124,13 ^a ±0,02	1527,07 ^b ±0,01	2104,81 ^c ±0,01	2501,02 ^d ±0,02	1995,81 ^c ±0,01
3-etil-2-pentanol	8,52 ^a ±0,02	21,54 ^a ±0,04	22,77 ^a ±0,02	30,25 ^a ±0,07	21,57 ^a ±0,02	30,58 ^a ±0,03	21,17 ^a ±0,01
4-metil-1-pentanol	13,77 ^a ±0,02	26,96 ^a ±0,02	34,72 ^a ±0,02	50,19 ^a ±0,04	40,99 ^a ±0,06	51,54 ^a ±0,01	32,78 ^a ±0,03
3-metil-1-pentanol	59,45 ^a ±0,01	125,56 ^b ±0,01	149,20 ^c ±0,02	222,10 ^d ±0,02	191,50 ^e ±0,05	191,66 ^f ±0,02	122,59 ^e ±0,02
3-etoxi-1-propanol	4,20 ^a ±0,00	7,05 ^b ±0,02	8,43 ^c ±0,01	10,12 ^d ±0,01	6,58 ^e ±0,01	8,85 ^f ±0,01	9,41 ^g ±0,01
1-octanol	20,66 ^a ±0,01	33,96 ^b ±0,02	40,30 ^c ±0,01	34,64 ^d ±0,05	29,55 ^e ±0,50	38,50 ^f ±0,02	42,26 ^g ±0,01
1-nonanol	9,36 ^a ±0,01	20,23 ^b ±0,01	24,74 ^c ±0,02	20,30 ^d ±0,01	16,78 ^e ±0,03	16,00 ^f ±0,05	16,18 ^g ±0,01
Alcohol de bencilo	60,41 ^a ±0,01	63,26 ^b ±0,01	61,22 ^{a,c} ±0,03	62,99 ^{a,d} ±0,04	58,40 ^{a,e} ±0,02	56,64 ^a ±0,02	64,48 ^a ±0,03
Alcohol feniletílico	4501,22 ^a ±0,02	1478,17 ^b ±0,01	1244,57 ^c ±0,02	1606,35 ^d ±0,04	1982,44 ^e ±0,02	1173,59 ^c ±0,02	1662,03 ^d ±0,02
1H-indol-3-etanol	774,17 ^a ±0,05	467,92 ^b ±0,00	123,07 ^c ±0,03	180,05 ^{c,d} ±0,05	683,67 ^a ±0,58	30,64 ^{c,d} ±0,02	196,19 ^d ±0,01
Total	6680,15±1352,52	3826,84±592,51	2859,51±459,91	3787,77±608,34	5165,25±802,90	4138,20±782,52	4190,46±721,90
% Alcoholes	0,78%	0,43%	0,28%	0,34%	0,41%	0,43%	0,43%
Terpenes							
Óxido de linalool	9,51 ^a ±0,01	13,78 ^b ±0,00	14,76 ^c ±0,01	13,87 ^d ±0,01	10,50 ^e ±0,02	13,76 ^b ±0,01	12,54 ^f ±0,04
Linalool	7,32 ^a ±0,01	14,15 ^b ±0,01	16,81 ^c ±0,01	14,45 ^d ±0,01	11,61 ^e ±0,02	12,25 ^f ±0,03	11,43 ^g ±0,00
a-terpineol	15,14 ^a ±0,01	13,78 ^b ±0,01	22,48 ^c ±0,03	15,84 ^d ±0,01	12,91 ^e ±0,01	24,29 ^f ±0,06	19,12 ^g ±0,02
(R)-(+)-β-citronelol	3,79 ^a ±0,01	3,09 ^b ±0,01	13,85 ^c ±0,01	6,57 ^d ±0,01	5,41 ^e ±0,02	6,85 ^f ±0,00	6,43 ^g ±0,02
2,6-dimethyl-3,7-octadiene, -2,6-diol	73,26 ^a ±0,01	83,26 ^b ±0,00	98,70 ^c ±0,02	84,10 ^d ±0,01	60,32 ^e ±0,03	76,95 ^f ±0,03	78,61 ^g ±0,01
8-hydroxylinalool	6,66 ^a ±0,01	14,91 ^b ±0,01	21,24 ^c ±0,02	27,57 ^d ±0,02	43,75 ^e ±0,02	87,33 ^f ±0,03	109,00 ^g ±0,01
Total	115,68±26,72	142,97±29,45	187,83±33,19	162,39±28,75	144,50±22,42	221,42±35,64	237,13±43,32
% Terpenos	0,01%	0,02%	0,02%	0,01%	0,01%	0,02%	0,02%
Ésteres							
Acetato de etilo	50925,00 ^a ±147,79	57905,00 ^a ±382,54	58695,00 ^b ±777,11	60005,00 ^c ±219,91	47705,00 ^d ±269,41	36933,33 ^e ±322,32	42606,67 ^f ±159,48
Butirato de etilo	5,00 ^a ±0,00	27,51 ^a ±0,01	29,06 ^a ±0,04	47,79 ^a ±0,02	21,06 ^a ±0,07	48,49 ^a ±0,03	11,33 ^a ±0,01
Isovalerato de etilo	2,75 ^a ±0,01	9,09 ^a ±0,00	10,68 ^a ±0,05	16,15 ^a ±0,00	9,20 ^a ±0,01	17,39 ^a ±0,03	6,40 ^a ±2,01
Acetato de isoamilo	105,45 ^a ±0,01	432,75 ^b ±0,02	441,85 ^b ±0,03	582,80 ^{b,d} ±0,01	343,03 ^b ±0,02	312,30 ^{e,b} ±0,02	148,02 ^{e,d} ±0,01
Hexanoato de etilo	63,77 ^a ±0,02	193,77 ^a ±0,01	258,82 ^a ±0,01	277,49 ^a ±0,03	149,03 ^a ±0,13	183,78 ^a ±0,03	126,21 ^a ±0,02
Acetato de hexilo	2,66 ^a ±0,02	9,24 ^a ±0,01	15,84 ^a ±0,00	15,16 ^a ±0,01	6,19 ^a ±0,06	1,63 ^a ±0,01	1,11 ^a ±0,01
2-hydroxy-3-metil butanoate de etilo	4,24 ^a ±0,01	7,63 ^a ±0,00	10,00 ^a ±0,03	6,38 ^a ±0,00	4,92 ^a ±0,01	5,21 ^a ±0,01	10,93 ^a ±0,06
Octanoato de etilo	249,17 ^a ±0,01	379,25 ^a ±0,00	455,84 ^b ±0,03	285,89 ^a ±0,00	183,13 ^a ±0,03	218,12 ^a ±0,01	254,06 ^a ±0,02
Nonanoato de etilo	9,02 ^a ±0,01	14,05 ^a ±0,00	16,11 ^a ±0,01	15,41 ^a ±0,02	11,42 ^a ±0,06	21,11 ^a ±0,01	22,47 ^a ±0,04
2-hidroxy-4-metilpentanoato de etilo	20,31 ^a ±0,01	29,69 ^a ±0,00	38,04 ^a ±0,02	33,36 ^a ±0,02	27,60 ^a ±0,02	35,63 ^a ±0,00	28,97 ^a ±0,08
Isoamyl lactate	21,31 ^a ±0,01	38,77 ^a ±0,01	48,90 ^a ±0,02	46,06 ^a ±0,02	31,34 ^a ±0,02	42,97 ^a ±0,01	37,83 ^a ±0,01

Decanoato de etilo	43,97 ^a ±0,01	70,17 ^a ±0,01	80,91 ^a ±0,02	76,72 ^a ±0,02	44,49 ^a ±0,02	46,32 ^a ±0,01	53,53 ^a ±0,03
Succinato de dietilo	1038,64 ^a ±0,03	1028,32 ^a ±0,01	1088,97 ^a ±0,90	1081,04 ^a ±1,03	1057,36 ^a ±0,74	1027,63 ^a ±1,00	1120,15 ^a ±1,04
9-decenoato de etilo	12,75 ^a ±0,01	24,37 ^a ±0,01	31,77 ^a ±0,01	17,45 ^a ±0,04	6,63 ^a ±0,13	0,53 ^a ±0,01	3,46 ^a ±0,02
Fenilacetato de etilo	1,97 ^a ±0,02	1,38 ^a ±0,00	3,16 ^a ±0,02	3,21 ^a ±0,01	3,00 ^a ±0,01	3,92 ^a ±0,01	4,27 ^a ±0,01
Acetato de fenetilo	63,63 ^a ±0,01	133,45 ^a ±0,00	182,30 ^a ±0,01	224,47 ^a ±0,02	190,60 ^a ±0,05	87,35 ^a ±0,01	67,02 ^a ±0,00
Malato de dietilo	33,59 ^a ±0,01	50,62 ^d ±0,00	62,40 ^a ±0,01	64,70 ^a ±0,02	62,96 ^a ±0,09	71,30 ^a ±0,04	74,26 ^a ±0,01
3-hidroxytridecanoato de etilo	11,63 ^a ±0,03	15,08 ^a ±0,01	24,24 ^a ±0,01	22,96 ^a ±0,02	15,18 ^a ±0,82	10,53 ^a ±0,03	16,65 ^a ±0,01
Vainillato de metilo	23,04 ^a ±0,02	37,45 ^a ±0,01	46,72 ^a ±0,01	44,67 ^a ±0,06	29,28 ^a ±0,28	31,86 ^a ±0,01	31,39 ^a ±0,01
Total	52637,91±242,78	60407,56±255,44	61540,61±272,12	62866,68±274,57	49901,42±250,80	39099,41±242,11	44624,73±259,88
% Ésteres	6,18%	6,82%	5,92%	5,66%	3,93%	4,03%	4,56%
Aldehídos							
Acetaldehído	32870,00 ^a ±77,00	34665,00 ^b ±270,82	36780,00 ^c ±15,00	38420,00 ^d ±79,20	43720,00 ^e ±354,97	35560,00 ^f ±298,98	46653,33 ^g ±323,30
Benzeneacetaldehído	33,17 ^a ±0,00	47,60 ^a ±0,05	100,50 ^a ±0,01	72,09 ^a ±0,02	67,55 ^a ±0,00	62,92 ^a ±0,01	51,39 ^a ±0,04
Total	32903,17	34712,6	36880,5	38492,09	43787,55	35622,92	46704,72
% Aldehídos	3,86%	3,92%	3,55%	3,47%	3,45%	3,67%	4,77%

Diferentes letras en superíndice indican que existen diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$), obtenido mediante ANOVA bidireccional, aplicando la prueba de análisis múltiple de Bonferroni (BSD).

4.1.5 Análisis de Componentes Principales de compuestos volátiles (ACP)

La Tabla 8 muestra los resultados de carga de los factores para el Análisis de Componentes Principales (ACP), en la que se han incluido como variables la concentración total de compuestos volátiles por familias aromáticas: alcoholes superiores, ácidos, alcoholes, ésteres, terpenoides, alcoholes C6 y aldehídos. El análisis extrae 2 factores que representan el 71 % de la varianza total explicada. El factor 1 (F1), se correlaciona positivamente con los alcoholes C6 y de forma negativa con el metanol y los aldehídos, representados en gran parte por el acetaldehído. Este factor, representa los efectos que el polen de abeja podría producir en los vinos, especialmente a dosis altas.

El factor 2 (F2) se correlaciona positivamente con los alcoholes superiores, terpenos y ésteres, y de forma negativa con los ácidos y alcoholes. Este factor agrupa los principales efectos enológicos que el polen puede producir sobre los compuestos volátiles de los vinos: aumento de alcoholes superiores, terpenos y ésteres, y disminución de alcoholes y ácidos. Como se puede observar en la Figura 16, F1 tiende a aumentar con la dosis de polen en los vinos de Palomino, lo que indica que los efectos secundarios de la formación de acetaldehído y metanol han sido importantes, especialmente a dosis altas, los que provoca un marcado desequilibrio en el perfil de compuestos volátiles en comparación con el testigo. En los vinos de Riesling, F1 permanece sin cambios en todos los casos, tanto en el vino testigo como los dosificados con polen; esto refleja que los diferentes efectos secundarios agrupados en este factor son mucho más equilibrados y no dependen tanto de la dosis de polen utilizada.

En F2, se observa un incremento significativo con la dosis de polen en los vinos de Palomino fino, y entre 5 y 20 g/L de polen de abeja, tuvo un efecto más importante sobre la formación de alcoholes superiores, ésteres y terpenos, que sobre la disminución de alcoholes y ácidos durante la fermentación alcohólica. Sin embargo, en los vinos de Riesling, los cuales obtuvieron valores más altos en F2 para el vino testigo en comparación a los valores correspondientes en el caso de Palomino fino, se produce un ligero aumento de este factor con la adición de polen, sin correlación entre el factor y la

dosis utilizada. Por lo tanto, los principales efectos del polen sobre los vinos de Riesling, son nuevamente más equilibrados y menos dependientes de la dosis empleada.

Tabla 8. Cargas de las componentes principales de los compuestos volátiles en vinos de Palomino fino y Riesling fermentados con diferentes dosis de polen.

Compuestos volátiles	F1	F2
Alcoholes superiores	-0,197	0,862
Metanol	-0,898	0,318
Acidos	0,289	-0,712
Alcoholes C-6	0,851	0,400
Alcoholes	0,352	-0,513
Terpenos	0,352	0,826
Esteres	0,221	0,595
Aldehídos	-0,954	0,118
Varianza explicada (%)	37,92	33,11

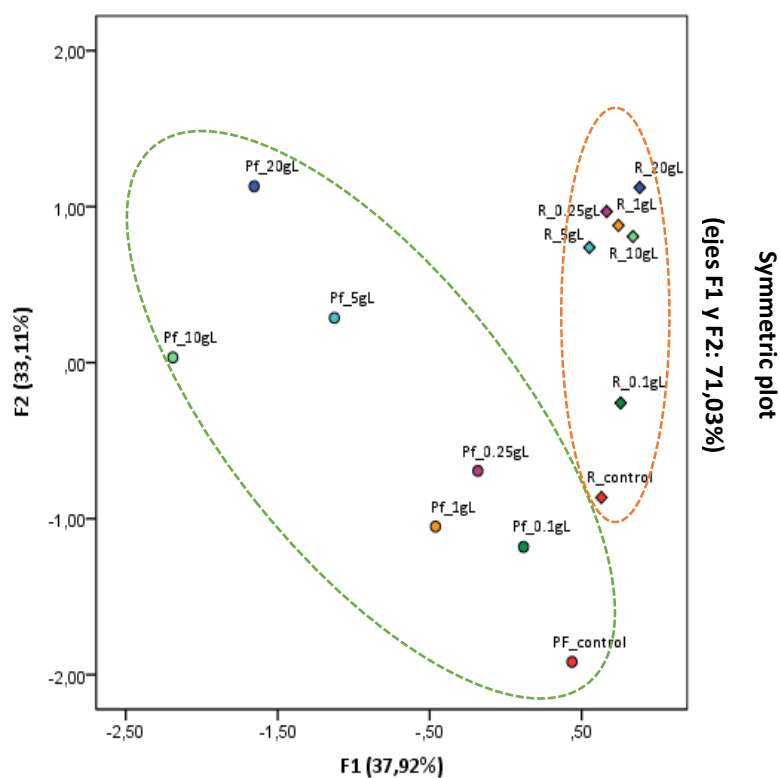


Figura 16. Análisis de componentes principales en vinos de Palomino fino (Pf) y Riesling (R) fermentados con diferentes dosis de polen.

4.1.6 Descripción del Valor de la Actividad Odorante (VAO)

En la Tabla 9 se muestra el resumen de los valores de la actividad del aroma (Σ VAO) con los que participan los compuestos volátiles en sus diferentes series aromáticas, junto con los valores de la suma total (Σ VAO_T). Como se puede observar, tanto en los vinos de Palomino fino como en los vinos de Riesling, la adición de polen de abeja aumenta los niveles de Σ VAO_T en comparación con los vinos testigo. Sin embargo, estos incrementos son más pronunciados y con un mayor rango de variación en los vinos Riesling (27-109 %) (que como vimos presentaban menores incrementos en compuestos volátiles) que en los vinos de Palomino fino (12-22 %), donde los compuestos volátiles aumentaban por encima de 100 % a dosis entre 5 y 20 g/L de polen (Figura 13). Este comportamiento se debe a que los principales compuestos volátiles que aumentan en los vinos Palomino con la adición de polen (acetaldehído, alcohol isoamílico, acetato de etilo, etc.), tienen umbrales de percepción muy altos (10 mg/L, 30 mg/L y 12 mg/L, respectivamente) y, por lo tanto, contribuyen menos al VAO (Tabla 9). Por el contrario, en los vinos de Riesling, en comparación con los vinos de Palomino fino, hay un aumento significativo en algunos ésteres menores, como acetato de isoamilo, hexanoato de etilo y octanoato de etilo, que contribuyen más significativamente al VAO debido a los bajos umbrales de percepción que presentan (Anexo. Tabla 33).

En todo caso, los vinos de Palomino y Riesling establecen una cierta correlación lineal positiva entre el Σ VAO y los valores de los compuestos volátiles totales de $r^2 = 0,81$ y $r^2 = 0,75$, respectivamente, en el rango de dosis de polen de 0 (testigo) a 1 g/L. Por el contrario, a partir de la dosis de 5 g/L hasta 20 g/L, se establece una correlación negativa de $r^2 = -0,89$ y $r^2 = -0,48$; lo que indica que algunos compuestos aromáticos con un umbral de percepción bajo están disminuyendo significativamente en este intervalo, especialmente en el caso de los vinos de Palomino fino.

Considerando el estudio de Σ OAV por series odorantes (Tabla 9), las series odorantes predominantes son principalmente la afrutada, seguida por la floral y, finalmente, la grasa. Se pudo observar que el polen de abeja mejoró el perfil sensorial de los vinos y aumentó el impacto de las series afrutadas y florales respectivas al testigo. En los vinos Palomino fino, el polen aumentó principalmente las series florales, mientras

que en los vinos Riesling aumentó la serie afrutada. En ambas variedades, los incrementos para la serie afrutada ocurren principalmente a dosis bajas, alcanzando un máximo a la dosis de 0,25 g/L, para luego disminuir a dosis más altas.

Tabla 9. Sumatorio de los Valores de Actividad Odorante (Σ VAO) agrupados por serie odorantes de vinos de Palomino y Riesling fermentados con diferentes dosis de polen

Series odorantes	Palomino fino							Riesling						
	Control	0,1 g/L	0,25 g/L	1 g/L	5 g/L	10 g/L	20 g/L	Control	0,1 g/L	0,25 g/L	1 g/L	5 g/L	10 g/L	20 g/L
Afrutado	96,36	110,36	107,24	97,07	88,86	95,09	80,74	85,80	154,75	186,60	165,23	109,75	126,89	111,89
Floral	17,39	29,01	31,21	32,56	33,73	23,23	31,07	9,48	13,50	24,73	18,87	17,10	16,30	13,70
Graso	5,56	6,16	5,95	5,40	5,40	4,16	3,58	6,53	7,05	3,74	5,00	5,15	4,43	3,92
Herbáceo	2,43	2,96	2,81	2,27	4,46	4,42	4,75	2,07	2,21	2,62	2,63	2,54	2,58	2,57
Fruto secos	0,44	0,62	0,71	1,04	1,21	1,42	1,80	0,33	0,35	0,37	0,39	0,44	0,36	0,47
Terroso, hongos	0,07	0,06	0,06	0,08	0,07	0,03	0,04	0,06	0,13	0,15	0,22	0,19	0,19	0,12
Química	0,05	0,15	0,14	0,14	15,59	13,91	15,45	0,07	0,11	0,14	0,14	0,09	0,09	0,07
Especiada	0,02	0,06	0,06	0,06	0,04	0,06	0,02	0,04	0,08	0,08	0,12	0,08	0,11	0,08
Σ VAO _T	122,32	149,38	148,17	138,62	149,35	142,32	137,44	104,38	178,18	218,43	192,60	135,34	150,93	132,81

Suma de los valores de actividad odorante (Σ VAO) de los compuestos odorantes principales encontrados en los vinos de Palomino fino y Riesling, producidos tras la fermentación alcohólica de los vinos testigo y con la adición de diferentes dosis de polen de abeja (de 0,1 a 20 g/L). Σ VAO_T significa la suma total de Σ VAO.

En vinos de Palomino fino, este descenso fue menos pronunciado, alcanzándose valores más bajos que el vino testigo. Sin embargo, en los vinos de Riesling se observó una caída significativa en las series odorantes, especialmente a dosis de 5 a 20 g/L de polen, alcanzando valores superiores al vino testigo. Esto se debe principalmente a que el alcohol isoamílico, a dosis de polen entre 0,1 y 1 g/L, aporta aromas afrutados (Perestrelo et al., 2006); y, sin embargo, a las dosis de 5 a 20 g/L de polen, participa con un aroma predominantemente químico o punzante, ya que su concentración excede los 400 mg/L (Vidrih and Hribar, 2007). En cuanto a las series florales, el Σ OAV se mantiene más o menos constante con fluctuaciones más importantes en los vinos de Riesling.

Los valores de Σ OAV, para la serie odorant grasa (ácidos grasos), fueron similares a los testigos en ambas variedades, con solo incrementos leves en dosis bajas de polen. En el caso de las notas herbáceas, el resultado obtenido para el Σ OAV también fue muy similar a los vinos testigo, excepto en los vinos de Palomino fino con las dosis altas 5, 10 y 20 g/L (donde Σ OAV se duplicó con respecto al testigo). Estos aumentos podrían causar desviaciones en la calidad de la evaluación sensorial de los vinos finales. Este efecto de intensificación del Σ OAV a altas dosis de polen en los vinos de Palomino fino también se observó en la serie odorante de frutos secos, principalmente debido a la contribución del acetaldehído. Finalmente, las series terrosas y especiadas, no se vieron afectadas por la presencia de polen en los vinos.

Por lo tanto, los resultados de Σ OAV indican que la adición de polen de abeja multifloral puede mejorar las notas afrutadas y florales en los vinos cuando se aplican dosis inferiores a 1 g/L. A partir de 5 g/L, las dosis de polen hacen que los vinos pierdan su carácter afrutado, apareciendo desviaciones sensoriales inadecuadas para la tipicidad de los vinos blancos jóvenes.

4.1.7 Evaluación sensorial de los vinos resultantes.

Para obtener una descripción detallada de todos los parámetros organolépticos de los vinos, se realizó un análisis sensorial de todos los vinos de Palomino fino y Riesling, tanto de los vinos testigos como los elaborados con polen de abeja. Los diagramas de araña (Figuras 17 y 18), muestran los resultados obtenidos para los atributos evaluados en el análisis sensorial de los vinos de Palomino fino y Riesling, respectivamente.

Para los vinos de ambas variedades (Palomino fino y Riesling) las diferencias más significativas se encuentran en los atributos relacionados con la intensidad del color, los aromas afrutados, florales, a frutos secos, a polen y el grado de aceptación (juicio global) de los vinos por los catadores (Figuras 17b y 18b). Particularmente, los vinos Palomino fino muestran diferencias significativas en el amargor (Figura 17b) y los vinos Riesling mostraron diferencias significativas en la calidad olfatoria (Figura 18b). Como se muestra en el análisis sensorial, los vinos Palomino fino y Riesling con bajas dosis de polen de abeja (0,1 y 0,25 g/L) son evaluados como superiores en términos de calidad aromática y gustativa, obteniendo también los valores más altos en el juicio global.

En cuanto a las series aromáticas evaluadas en los vinos, como se esperaba, para las dos variedades de vinos las dosis más bajas de polen (0,1 y 0,25 g/L) presentan las puntuaciones más altas para las series afrutadas y florales, destacando especialmente el carácter floral en los vinos de Palomino fino y el carácter afrutado en los vinos de Riesling (Figuras 17b y 18b). Esto corresponde a lo que se observó en los resultados de los Σ OAV (Tabla 9). Sin embargo, los vinos con las dosis más altas de polen (10 y 20 g/L) presentan las puntuaciones más bajas en relación con las series afrutadas y florales, destacando en otras series aromáticas que algunos catadores asocian con el aroma de polen de abeja, como "nueces" o "vegetal", especialmente en el caso de los vinos de Palomino fino. Los atributos aromáticos restantes no presentan diferencias significativas entre las diferentes muestras.

El polen de abeja también puede modificar algunos de los atributos de sabor de los vinos, aunque no tan extensamente como los olfativos. Los vinos de Palomino fino y Riesling con bajas dosis de polen de abeja (0,1 y 0,25 g/L) presentan una mayor, aunque no significativa, suavidad y persistencia en boca con respecto al control y a las altas dosis de polen de abeja. En particular, en los vinos Palomino fino la presencia de polen aumenta la percepción de amargor, especialmente a dosis de 10 y 20 g/L (Figura 17b). Esto no fue valorado positivamente por los catadores, ya que tiene una evaluación inversa en comparación con la calidad gustativa. Estas percepciones amargas podrían deberse a la presencia de pigmentos, principalmente polifenoles, transferidos por el polen de abeja al mosto de uva durante la fermentación alcohólica.

Además, este fenómeno es responsable de una mayor apreciación de la intensidad del color con la dosis de polen en ambos vinos (Figuras 17b y 18b). El aumento de la concentración de polifenoles puede favorecer el desarrollo de reacciones de oxidación y pardeamiento en presencia de oxígeno y la consecuente deprecisión de la calidad. Este fenómeno de oxidación puede ser directamente responsable de las bajas puntuaciones de calidad visual que presentan los vinos Palomino fino a altas dosis de polen de abeja (10 y 20 g/L). Por lo tanto, la presencia de polen de abeja en los vinos podría inducir un aumento en la intensidad del color y los fenómenos de oxidación.

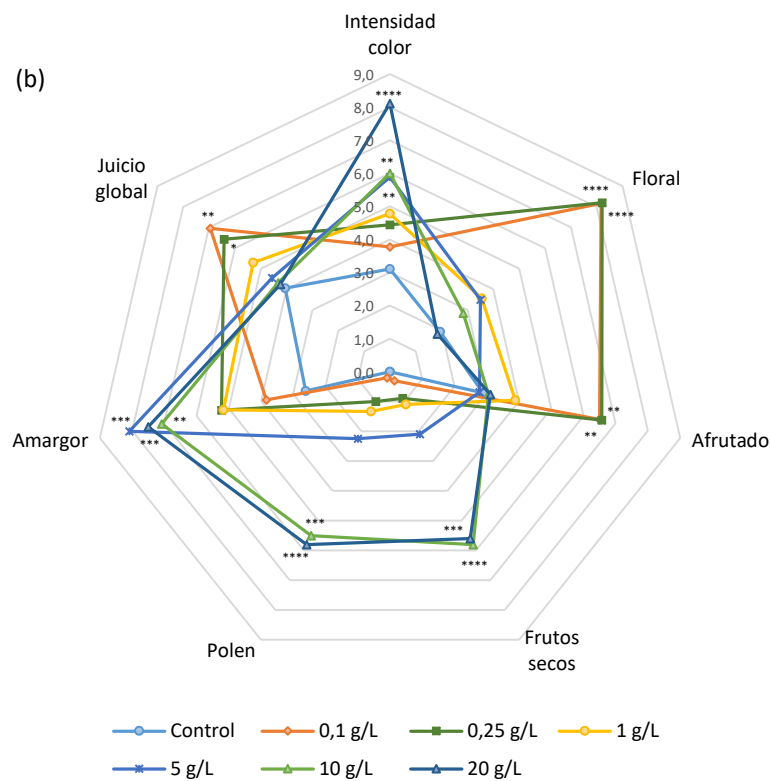
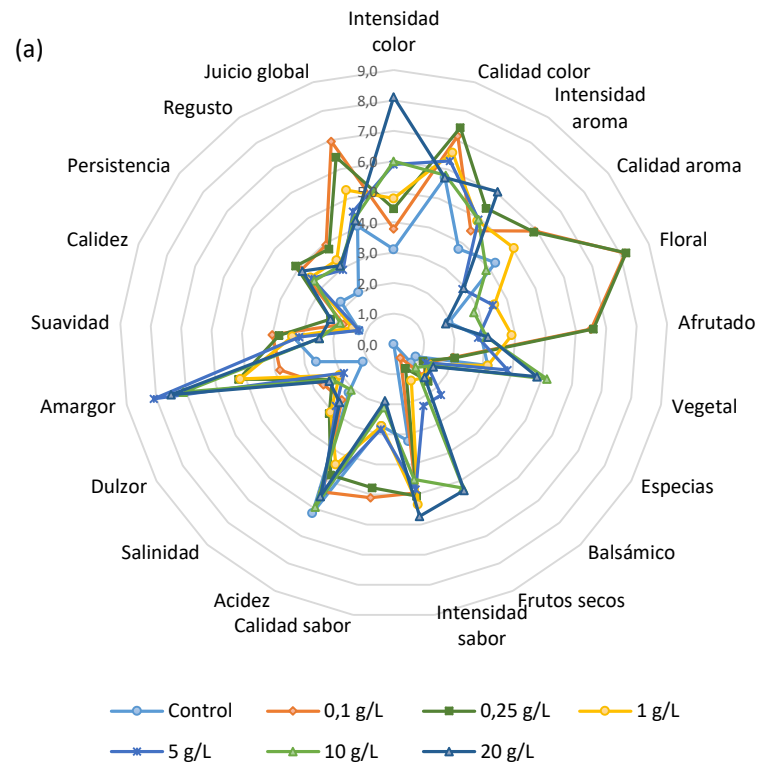


Figura 17. Evaluación sensorial descriptiva de los vinos de Palomino fino fermentados con polen (a). Evaluación de los atributos más significativos en los vinos de Palomino fino (b). (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$)

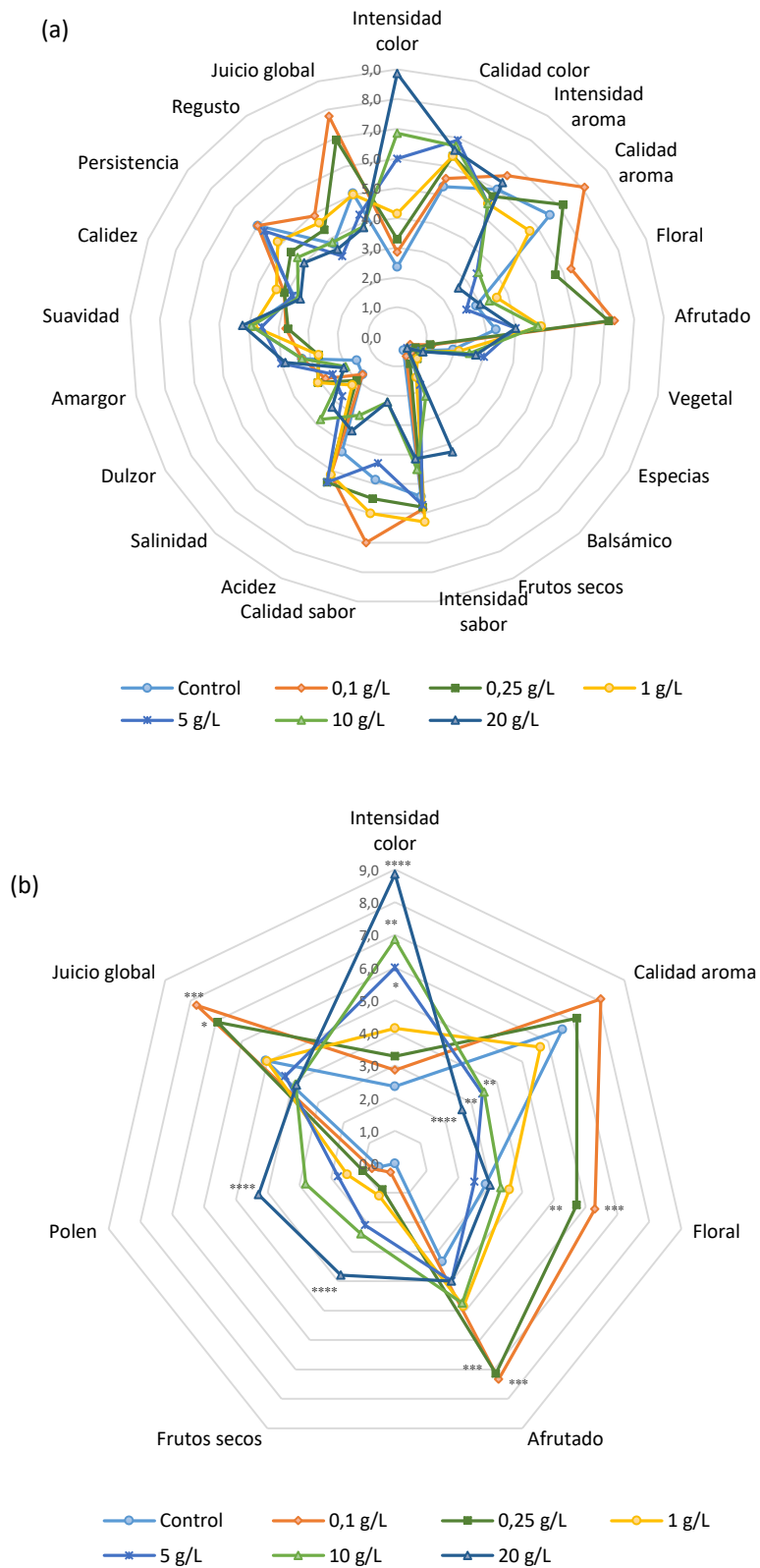


Figura 18. Evaluación sensorial descriptiva de los vinos de Riesling fermentados con polen (a). Evaluación de los atributos más significativos en los vinos de Riesling (b). (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001)

Estudio y evaluación a escala laboratorio-piloto
de los efectos de la adición de polen en la
vinificación en tinto

4.2 Estudio y evaluación a escala laboratorio-piloto de los efectos de la adición de polen en la vinificación en tinto.

4.2.1 Influencia de la dosis de polen sobre las propiedades físico-químicas del mosto

Los parámetros físico-químicos del mosto de Tintilla de Rota con adición de polen de abeja y el testigo, se muestran en la Tabla 10. Como se puede observar, el contenido en azúcar no se ve afectado de forma significativa por la adición de polen, salvo para las dosis de 10 y 20 g/L (dosis altas), donde se produce un incremento entre 7 y 6,5 % respectivamente, en comparación con el testigo. Este efecto que se había observado en la vinificación en blanco (Tablas 2 y 3), puede ser debido al aporte de azúcares por parte del polen sobre todo cuando se emplean dosis elevadas (Campos et al., 2008). La adición de polen no parece tener un efecto en la acidez total del mosto, salvo para la dosis más alta (20 g/L) donde se observa un ligero aumento. Sin embargo, en cuanto al pH, se observó un incremento significativo a partir de la dosis de 10 g/L, alcanzándose pH superiores a 3,75. Este efecto, también observado en vinos blancos de Palomino y Riesling (Tablas 2 y 3), podría ser debido al aporte de potasio del polen al mosto (Campos et al., 1997; da Silva et al., 2014).

Por otro lado, en cuanto al NFA de los mostos, se observan incrementos significativos con respecto al testigo (140 mg/L) a partir de la dosis de 0,25 g/L. Al igual que ocurría con los mostos blancos, se vuelve a establecer una correlación lineal entre la dosis de polen y los incrementos de NFA observados ($r^2 = 0,85$) (Figura 19). Sin embargo, los incrementos de NFA en mosto de Tintilla de Rota (entre 3,5 y 48,5 %), son ligeramente mayores a los experimentados en los mostos de variedades blancas (entre 3 y 44 %, Palomino fino; entre 2 y 30 %, Riesling). Conforme aumenta la dosis de polen disminuye la aportación de NFA por g de polen (Figura 19), efecto también detectado en los mostos blancos. Esto viene a corroborar que el mosto probablemente se satura en NFA a partir de la dosis de 0,25 g/L, quedando una reserva de NFA significativa en el polen a las dosis más altas, que puede ser extraída durante la fermentación alcohólica.

Tabla 10. Composición físico-química del mosto de Tintilla de Rota con adición de polen (control, 0,1, 0,25, 1, 5, 10 y 20 g/L)

Parámetros	Dosis de polen en mosto de Palomino fino						
	Control	0,1 g/L	0,25 g/L	1 g/L	5 g/L	10 g/L	20 g/L
Azúcar (g/L)	240,7 ± 0,8 ^a	240,7 ± 0,8 ^a	244,3 ± 0,6 ^a	243,3 ± 0,6 ^a	241,2 ± 0,8 ^a	257,6 ± 0,5 ^b	256,4 ± 0,0 ^b
Acidez Total (g/L TH ₂)	5,28 ± 0,03 ^a	5,28 ± 0,03 ^a	5,28 ± 0,03 ^a	5,28 ± 0,03 ^a	5,22 ± 0,03 ^a	5,34 ± 0,03 ^a	5,99 ± 0,03 ^b
pH	3,67 ± 0,01 ^a	3,68 ± 0,01 ^a	3,71 ± 0,01 ^{a,b,c}	3,72 ± 0,01 ^{a,b,c}	3,73 ± 0,01 ^{a,b,c}	3,78 ± 0,01 ^{b,c}	3,80 ± 0,01 ^c
NFA (mg/L)	140 ± 0 ^a	145 ± 4 ^a	162 ± 4 ^b	170 ± 1 ^c	179 ± 4 ^d	185 ± 8 ^e	208 ± 4 ^f

Diferentes letras en superíndice indican que existen diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$), obtenido mediante ANOVA bidireccional, aplicando la prueba de análisis múltiple de Bonferroni (BSD).

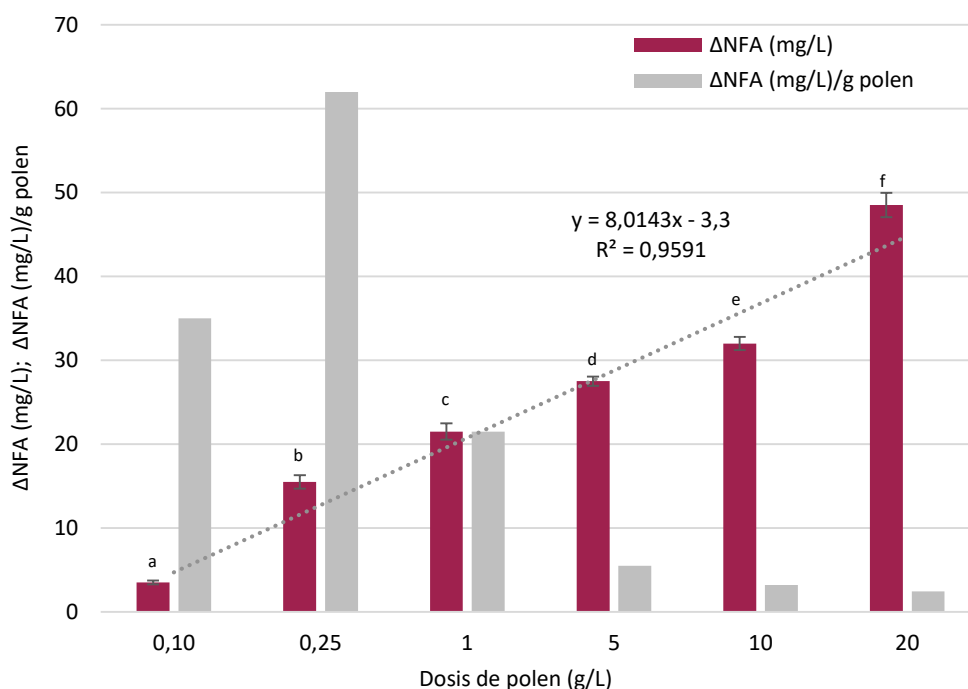


Figura 19. Comparativa del incremento de NFA por dosis de polen, frente al incremento de NFA producido por gramo de polen de abeja, en mostos de uva tinta Tintilla de Rota. Diferentes letras en superíndice indican que existen diferencias significativas entre las muestras (ANOVA, $p < 0,05$).

4.2.2 Análisis de los efectos sobre la cinética fermentativa, el desarrollo de las poblaciones de levaduras y el nitrógeno fácilmente asimilable durante la fermentación alcohólica.

4.2.2.1 Influencia de la dosis de polen de abeja en la cinética de fermentación alcohólica

En la Figura 20 se muestra la influencia que tiene el polen de abeja sobre la cinética fermentativa durante el encubado del mosto de Tintilla de Rota. Como se puede observar, cuanto mayor es la dosis de polen aplicada, más acusada es la disminución de la densidad en el tiempo sobre todo en la fase tumultuosa. De manera que a partir del 2º día empiezan a existir diferencias significativas (ANOVA, $p < 0,05$) entre los mostos con dosis de polen de 1, 5, 10 y 20 g/L y el control, y a partir del 4º día hasta el día 13 con todas las dosis. Por tanto, en el caso de la Tintilla de Rota la adición de polen produce un aumento significativo de la velocidad de fermentación y una mejora en la cinética fermentativa, a diferencia de los mostos blancos, donde prácticamente no se producían variaciones salvo a las dosis altas (Figura 8). Asimismo, cabe señalar que el polen tiene un mayor efecto sobre la velocidad de fermentación que sobre el tiempo de duración

de la fase de latencia. Como se puede observar, el polen incluso a dosis elevadas no produce un adelanto significativo en el inicio de la fase tumultuosa (Figura 20). En todo caso, esta mejora en la cinética fermentativa probablemente es debida, como se ha comentado anteriormente, al enriquecimiento en NFA y otros activadores fermentativos que produce el polen. Cabe recordar que algunos autores han comprobado como la suplementación de los mostos de uva con NFA (Bell and Henschke, 2005; Kotarska et al., 2006; Gutiérrez et al., 2012) y con polen en el caso de los hidromieles (Roldán et al., 2011), produce un efecto similar y de forma significativa en la cinética fermentativa.

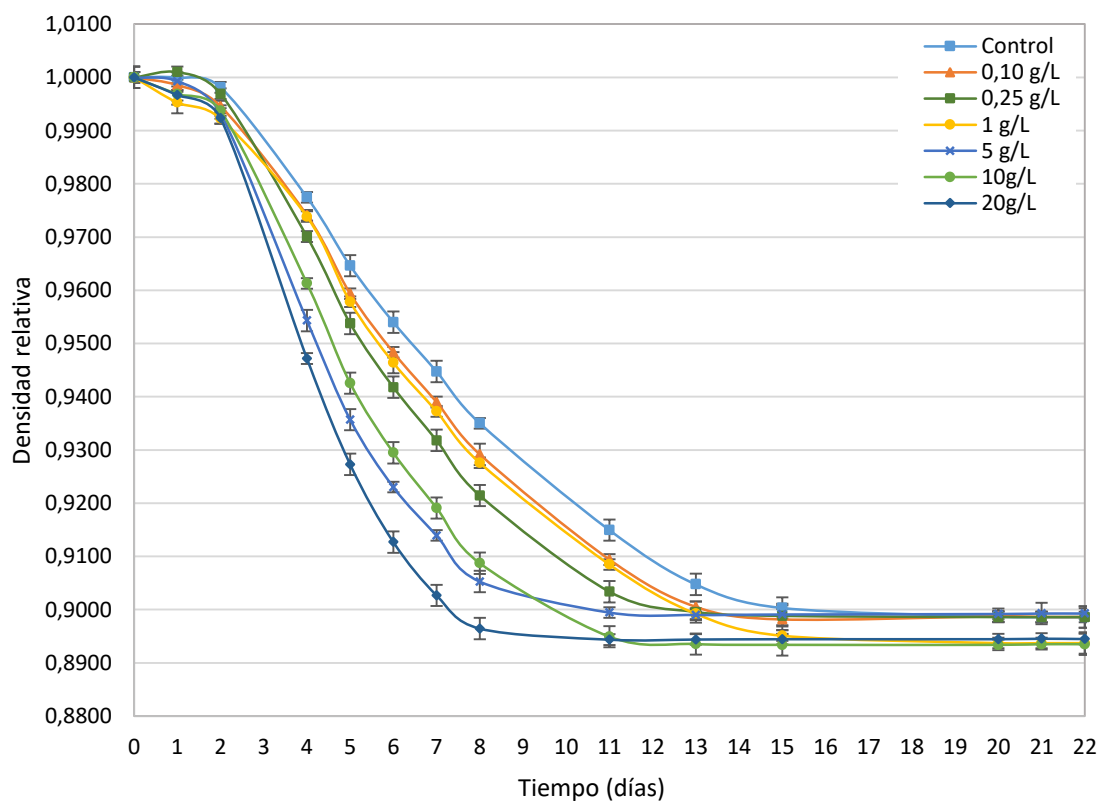


Figura 20. Evolución densidad relativa durante la FA de mostos de Tintilla de Rota con distintas dosis de polen.

4.2.2.2 Influencia de la dosis de polen sobre la cinética de crecimiento de las levaduras durante la fermentación alcohólica

En La Figura 21 se muestra la evolución de las poblaciones viables de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación alcohólica del mosto de Tintilla de

Rota con las diferentes dosis de polen. Tal y como se puede observar, el uso de polen de abeja en todos los casos consigue adelantar 48 horas la fase exponencial de crecimiento de las células de levaduras, en comparación con el testigo. El aporte de NFA y otras sustancias activadoras, permiten que las células de levaduras dispongan de nutrientes además de factores de crecimiento que hacen disminuir el tiempo de adaptación al medio (Ough et al., 1989; Stanley et al., 1993; Kotarska et al., 2006; Gutiérrez et al., 2012).

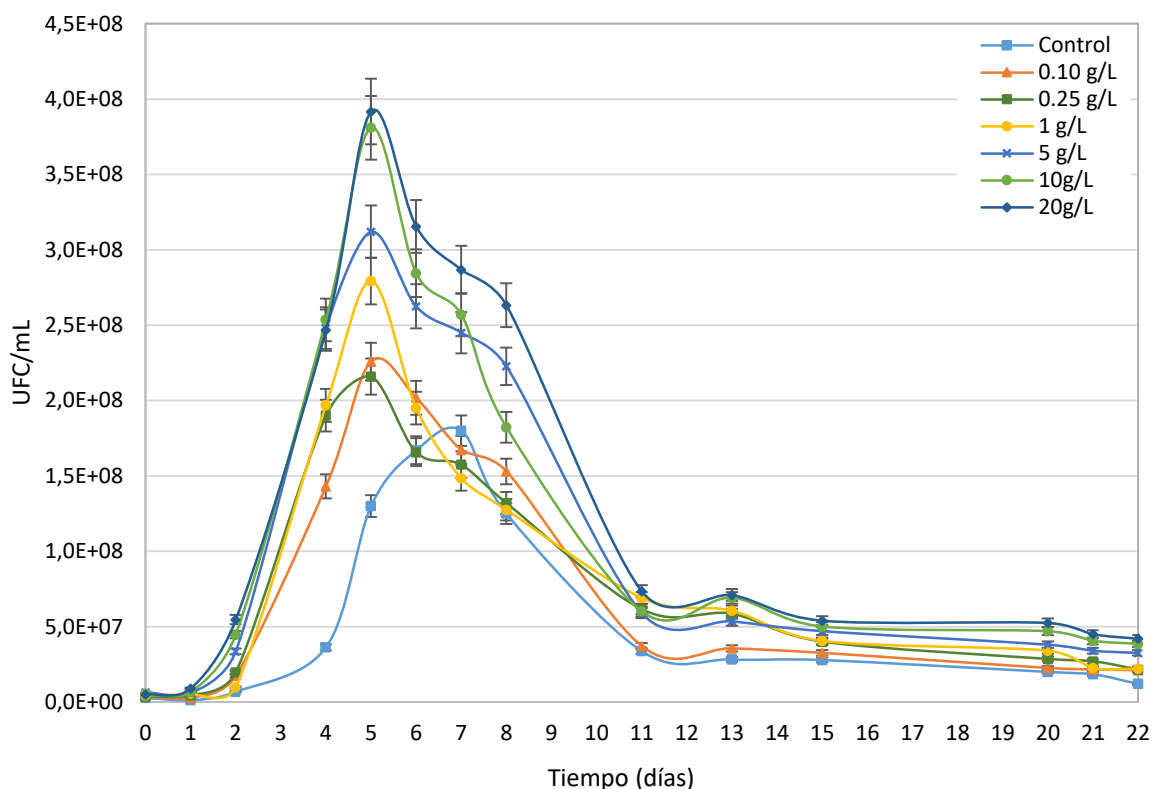


Figura 21. Evolución de la biomasa viable de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* durante el proceso de fermentación alcohólica de mosto de Tintilla de Rota con dosis de polen.

El uso de polen favorece e incrementa las poblaciones de levaduras viables al inicio de la fase exponencial de crecimiento en un rango entre 39 y 67 % en comparación con el testigo, siendo este incremento significativo y lineal con la dosis de polen empleadas ($r^2 = 0,70$). La adición de polen favorece la supervivencia de las levaduras durante la fase de latencia, permitiendo una mayor fiabilidad sobre la implantación de la cepa inoculada para la fermentación del mosto.

En todos los casos, con polen de abeja se alcanzaron poblaciones máximas de levaduras significativamente superiores al testigo ($1,80 \times 10^8$ UFC/mL), con incrementos entre 20 % y 55 % para las dosis entre 0,1 y 1 g/L ($2,26 \times 10^8$, $2,16 \times 10^8$ y $2,79 \times 10^8$ UFC/mL, para 0,1, 0,25 y 1 g/L respectivamente) y entre 73,33 % y 117,64 % para dosis entre 5 y 20 g/L ($3,12 \times 10^8$, $3,81 \times 10^8$ y $3,92 \times 10^8$ UFC/mL, para 5, 10 y 20 g/L respectivamente) (Figura 22). En todos los casos la adición de polen conlleva alcanzar la población máxima de levaduras dos días antes (5º día), en comparación con el testigo (7º día) (Figura 22).

Nuevamente, se vuelve a observar cómo el polen influye también en la fase de muerte de las levaduras, de manera que conforme mayor es la dosis de polen mayores son las poblaciones de levaduras viables al final de fermentación ($r^2 = 0,78$) (ANOVA, $p < 0,05$). De manera que las poblaciones de levaduras se incrementan entre 42-71 % con respecto al control (Figura 22). Desde el punto de vista enológico, esta característica resulta de gran interés, sobre todo para la terminación de la fermentación alcohólica de vinos con potencial alcohólico elevado.

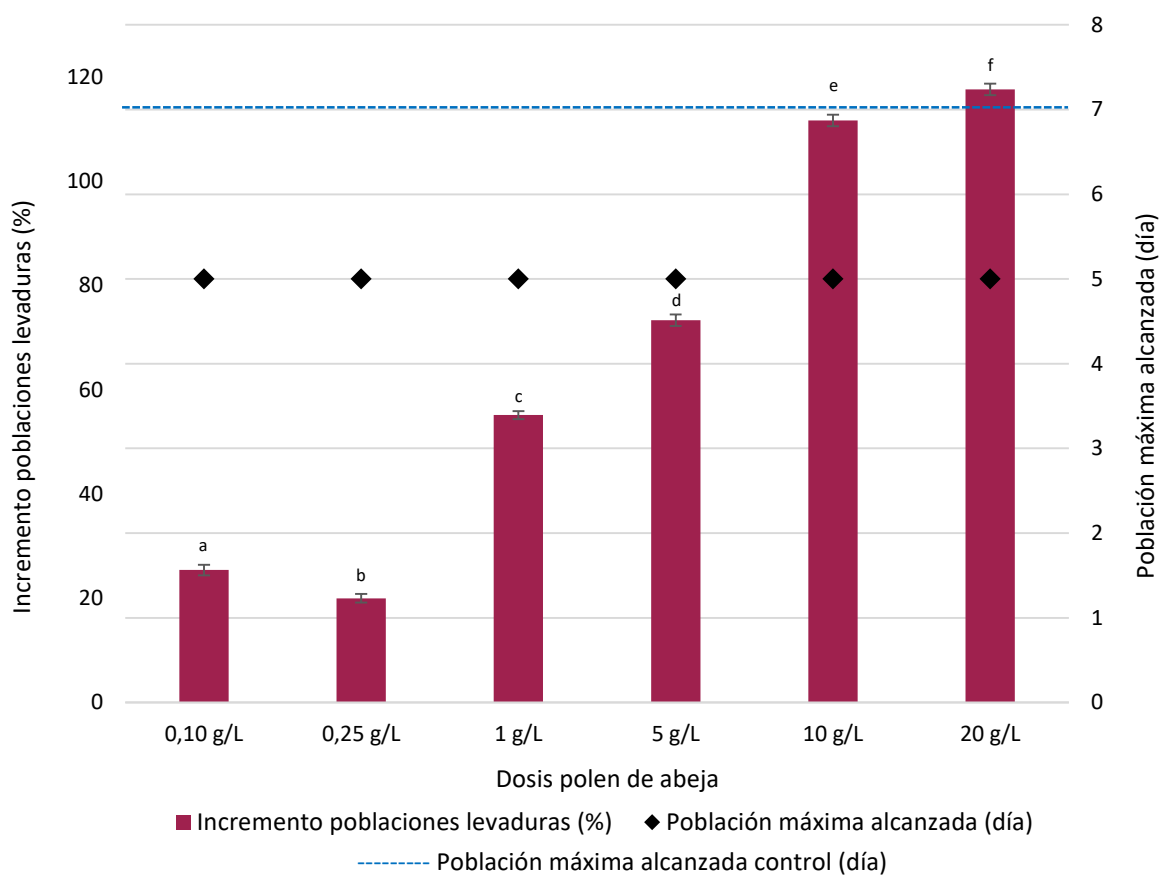


Figura 22. Aumento de las poblaciones de levadura durante la fermentación alcohólica en mostos de Tintilla de Rota con diferentes dosis de polen. Diferentes letras en superíndice indican que existen diferencias significativas entre las muestras (ANOVA, $p < 0,05$).

4.2.2.3 Influencia de la dosis de polen sobre la evolución del NFA durante la fermentación alcohólica

En la Figura 23 se muestra la evolución del contenido de NFA durante la fermentación alcohólica de mosto de Tintilla de Rota con la adición de polen de abeja. Como se puede observar, durante los primeros 3 días la adición de polen en dosis elevadas (5, 10 y 20 g/L) reduce significativamente el consumo de NFA de las levaduras durante la fase de latencia o adaptación al medio (Figura 23). Esto podría indicar que el polen además de NFA está aportando otras sustancias que regulan su adaptación al medio. Sin embargo, el comportamiento se invierte cuando comienza la fase exponencial de crecimiento, en la que el consumo y el descenso de NFA es mayor, cuanto más alta es la dosis de polen (Figura 23). Este mayor consumo está directamente relacionado con el nivel de población de levaduras, que crece conforme aumenta la

dosis de polen. De hecho, todas las dosis de polen menos la de 0,1 g/L alcanzan un mínimo de NFA al 5º día, coincidiendo aproximadamente con las máximas poblaciones de levaduras (Figura 22), mientras que el testigo y la dosis de 0,1 g/L alcanzan el mínimo al 7º día. Sin embargo, aunque el consumo de NFA es mayor durante este periodo, la adición de polen conlleva a una disminución de la demanda de NFA por UFC en el 4º día (Figura 24), lo que viene a reafirmar nuevamente que el polen puede estar aportando otras sustancias beneficiosas complementarias al NFA para crecimiento de las levaduras (Bely et al., 1990b, a; Garde-Cerdán and Ancín-Azpilicueta, 2008; Campos et al., 2008; De-melo et al., 2018)

Pero lo que resulta de gran interés es que, una vez alcanzado el mínimo, los niveles de NFA se incrementan de forma significativa, tanto más cuanto mayor es la dosis de polen. Esto también se había observado en la vinificación en blanco, pero de manera menos acusada. Queda patente, por tanto, que el polen tiene una reserva importante de NFA, sobre todo en las dosis altas (donde proporcionalmente no se extraía tanto antes del inicio de la fermentación) que se puede ir liberando durante el transcurso de la FA probablemente con la ayuda del etanol. Otro efecto que podría contribuir a la extracción de NFA es la agitación durante los bazuqueos (diaria). Cuando se agita la mezcla de hollejos, mosto y polen, con el bazuqueo, se favorece la renovación de la capa límite de mosto-vino en contacto con el polen, manteniéndose los gradientes de concentración de NFA muy altos. Esto favorece la difusión y la solubilización de los compuestos presentes en el polen, de la misma forma que ocurre con los polifenoles durante un remontado (Ribéreau-Gayon et al., 2003; Togoires, 2011).

Al final de la fermentación (del día 13 al 17), se observó un aumento de NFA en todos los casos, incluso en el vino testigo (Figura 23). Posiblemente, este efecto pueda también estar relacionado con la lisis celular y la difusión de NFA interno de las levaduras al medio.

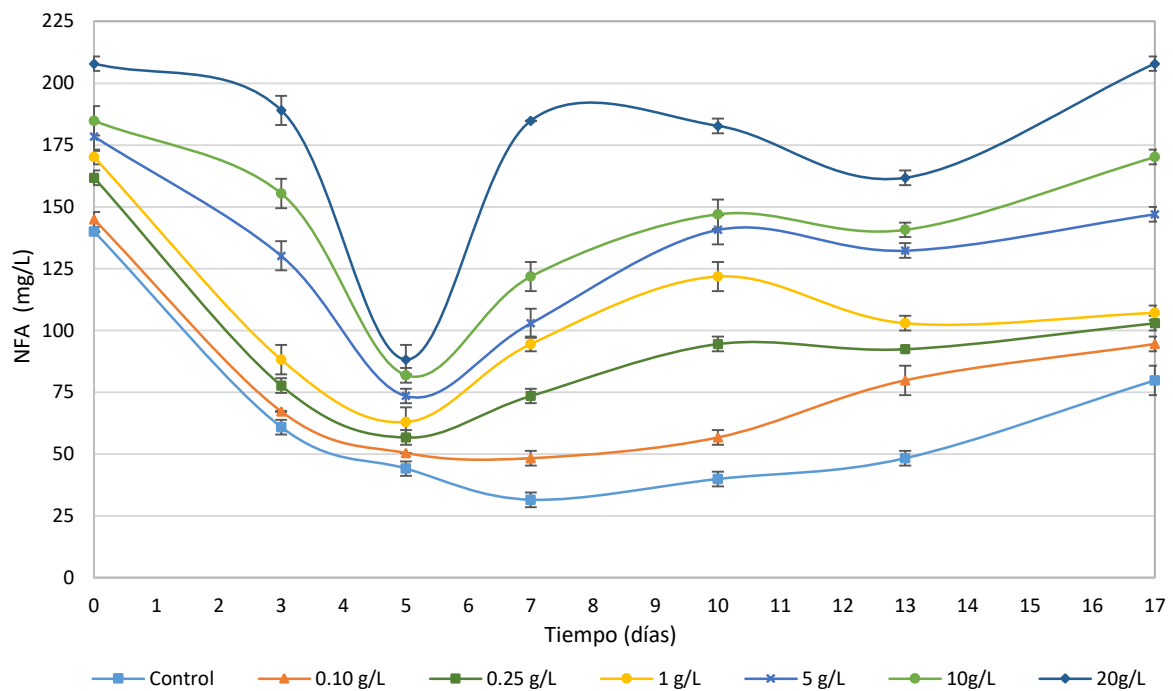


Figura 23. Evolución del nitrógeno fácilmente asimilable por las levaduras (NFA), *Saccharomyces cerevisiae*, en los mostos de Tintilla de Rota, fermentados con diferentes dosis de polen.

Finalmente, de forma global, tanto en el vino testigo como a dosis bajas de polen, el consumo neto de NFA (diferencia ente el valor final e inicial) es mayor que en las dosis altas (5, 10 y 20 g/L), donde prácticamente no se produce variación alguna. Estos niveles, pueden ser potencialmente interesantes para el desarrollo de otras fermentaciones, como la maloláctica (FML), o un inconveniente como fuente inestable para el desarrollo de contaminaciones microbianas.

En la Figura 24 se representa la relación entre el consumo de NFA y la población máxima alcanzada hasta el 5º día de fermentación.

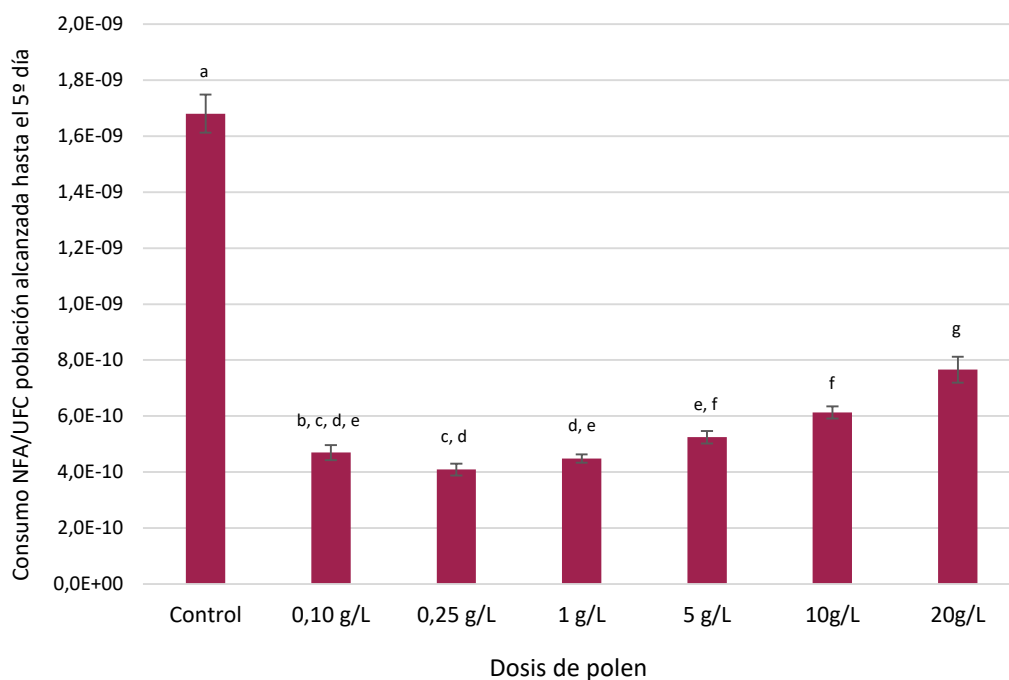


Figura 24. Consumo de NFA/UFC durante la fase de crecimiento exponencial de mostos de uva Tintilla de Rota fermentados con diferentes dosis de polen. Diferentes letras en superíndice indican que existen diferencias significativas entre las muestras (ANOVA, $p < 0,05$).

4.2.3 Influencia de la dosis de polen sobre el contenido en ácido málico durante la FML

Una vez finalizada la fermentación alcohólica de los vinos tintos (< 2 g/L azúcar residual), se prepararon para el desarrollo de la fermentación maloláctica (FML) añadiendo un inóculo de bacterias lácticas comerciales *Oenococcus oeni* S11B P2 Instant (Laffort, Francia). El control de la evolución de la FML se lleva a cabo cuantificando el contenido en ácido málico en cada uno de los fermentados con diferentes dosis de polen y testigos. Como se puede observar en la Figura 25, el uso de polen presenta un cierto efecto sobre la FML. Durante la fase de crecimiento exponencial, el contenido en ácido málico desciende significativamente con la dosis de polen, salvo para 0,1 g/L, mostrando cierta correlación lineal ($r^2 = 0,84$). Esta relación, es mucho más clara cuando se observa el incremento significativo que se produce sobre la velocidad de consumo de ácido málico (Figura 25). En este sentido, se pueden establecer dos grupos diferenciados de respuesta según la dosis de polen. Por un lado, las dosis bajas e intermedia, muestran

incrementos de velocidad de consumo de málico moderados (6,57 %, 17,79 % y 18,18 %, para 0,1, 0,25 y 1 g/L respectivamente) y, por otro lado, las dosis altas, que mostraron los incrementos mayores (53,14 % y 55,25 %, para 5 y 10 g/L respectivamente), sobre todo a la dosis de 20 g/L (77,31 %). Por tanto, el polen ejerce un efecto positivo sobre las bacterias ácido lácticas, favoreciendo el consumo de ácido málico. Desde el punto de vista enológico, este efecto puede tener un gran interés, sobre todo, para potenciar las fermentaciones malolácticas en vinos problemáticos o con dificultades para su desarrollo (Zeeman et al., 1982; Davis et al., 1985).

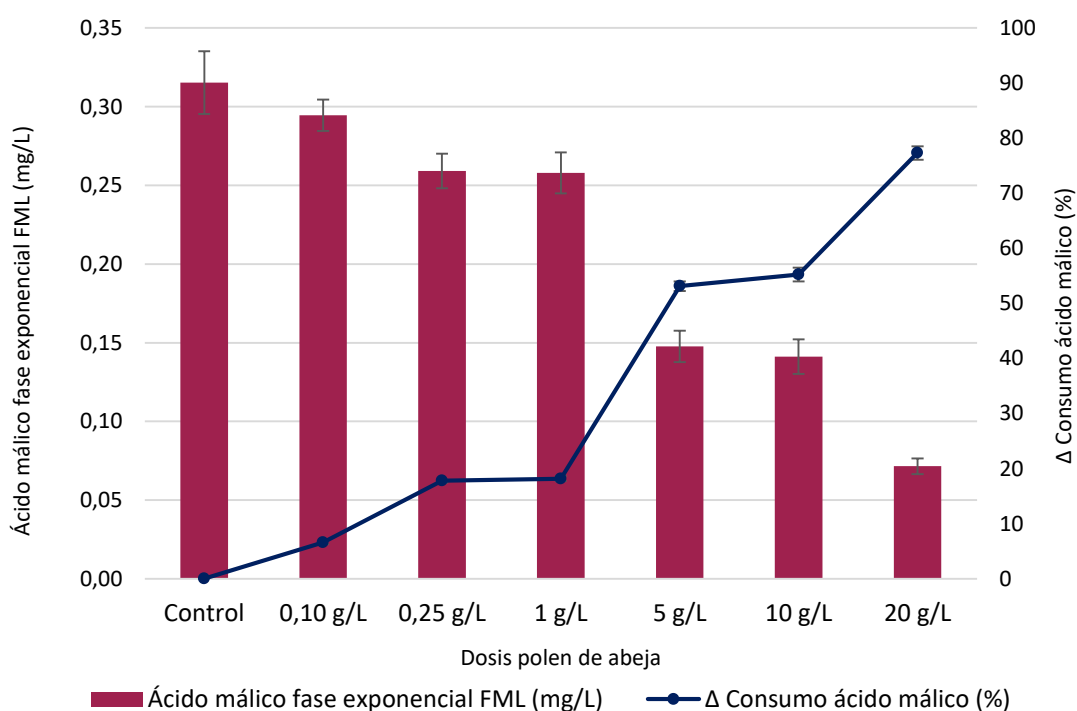


Figura 25. Concentración de ácido málico durante la fase exponencial de crecimiento bacteriano, frente al incremento de la velocidad de consumo (%).

4.2.4 Evaluación de la dosis de polen sobre las propiedades físico-químicas y los parámetros de color de los vinos finales.

En la Tabla 11, se muestra la influencia del polen de abeja sobre la composición físico-química y los parámetros de color de los vinos finales de Tintilla de Rota. En primer lugar, hay que indicar que, no se observa ningún efecto del polen sobre el grado alcohólico. Sin embargo, con respecto al pH se observa un ligero incremento, de hasta 0,1 unidades en el caso de las dosis altas, tal como ocurría en los vinos blancos de

Palomino fino y Riesling. Desde el punto de vista enológico, estos pH más elevados pueden haber contribuido a favorecer en cierta medida la fermentación maloláctica y complementaría el efecto activador del polen descrito descrito en el apartado 4.2.3. El responsable de este incremento de pH a dosis elevadas, puede ser debido a la cesión de potasio, dada la riqueza del polen en este mineral (Campos et al., 1997; da Silva et al., 2014; Conrad, 2017), teniendo en cuenta su elevado porcentaje de cenizas (entre 2 y 6 % en peso seco) (Campos et al., 1997, 2008).

Con respecto al testigo, en todos los casos hay una ligera disminución de la acidez volátil, alcanzándose los niveles más bajos para las dosis de 1 y 5 g/L (0,2 unidades más bajas). Este mismo comportamiento se constató en vinos blancos para dosis altas de polen (Tablas 4 y 5). Algunos autores han verificado que cuando los medios son ricos en nitrógeno, se reduce la producción de ácido acético durante la fermentación alcohólica (Arias-Gil et al., 2007; Barbosa et al., 2009; Fairbairn et al., 2017). Por lo tanto, es muy probable que el enriquecimiento en NFA que produce el polen sea el responsable de la reducción de la acidez volátil en los vinos finales.

Por otro lado, no se observa ningún efecto del polen sobre los contenidos de azúcares residuales (glucosa y fructosa). Como cabía esperar, los niveles de azúcares residuales se encontraron dentro de valores normales para vinos secos (< 2 g/L), indicativo de que todos los vinos incluyendo el testigo terminaron la fermentación (Tabla 11).

En cuanto al contenido en NFA de los vinos, hay que señalar que los valores de la Tabla 11 corresponden a los vinos después de haber realizado la fermentación maloláctica. Como se puede observar, los niveles de NFA aumentan de forma generalizada (control y polen) entre un 5 – 15 % desde el final de la fermentación alcohólica (Figura 23). Este aumento puede ser debido a la acción hidrolítica que ejercen las bacterias lácticas sobre las paredes celulares de las levaduras, favoreciendo de este modo cesión de compuestos nitrogenados (NFA) al vino (Lonvaud-Funel et al., 1988; Ribéreau-Gayon et al., 2003). Por lo tanto, los niveles de NFA quedan relativamente altos después de la fermentación maloláctica, para las dosis altas de polen. En el caso de los

vinos tintos, esto puede tener repercusiones o consecuencias negativas, puesto que puede favorecer el desarrollo de microorganismos contaminantes.

En cuanto a los antocianos y taninos el polen no parece afectar a sus contenidos y solo se aprecian ligeras fluctuaciones (Tabla 11). Estas oscilaciones en los resultados pueden ser debidas a las condiciones de manipulación de los vinos y/o errores de medida. Sin embargo, el IPT aumenta de forma proporcional con la dosis de polen (ANOVA, $p < 0,05$), llegando a incrementarse hasta más de un 45 % con respecto al testigo, para el caso de la dosis de 20 g/L. Esto indica, algo que ya habíamos observado en la vinificación en blanco, y es que el polen puede estar aportando polifenoles y otros pigmentos al vino (Silva et al., 2006, 2009; Campos et al., 2008; Bogdanov, 2017), que se están cuantificando en la medida del IPT (Abs 280nm). Al igual que ocurría con el contenido en NFA, la extracción de polifenoles producida por gramo de polen es mayor con las dosis bajas. Volvemos a encontrar un efecto de sobresaturación para las dosis altas, un comportamiento ya observado en el caso de los vinos blancos y para otros parámetros como el NFA (Figura 12).

Como se puede observar, este incremento en el IPT, no se ve reflejado cuantitativamente en las coordenadas cromáticas de los vinos. Atendiendo a los valores de las coordenadas del plano de color a^* (rojo-verde), los vinos con polen, disminuyen ligeramente con respecto al testigo, en algunos casos siendo significativo (0,1, 0,25 y 1 g/L). En el caso de b^* (amarillo-azul), hay un ligero aumento significativo para algunas dosis (ANOVA, $p < 0,05$) (Tabla 11). Esto significa que el polen puede producir una ligera pérdida de la componente roja (a^*) y un ligero aumento de la componente amarilla (b^*). Tanto L^* (luminosidad), como C^* (croma), disminuyen ligeramente con la adición de polen, lo que implica que los vinos con polen van a presentar una componente ligeramente más oscura en comparación con el testigo, lo que podría compensar el ligero aumento de b^* . En ningún caso se observa correlación de todos estos parámetros con la dosis de polen.

Al estudiar la intensidad colorante (IC) de los vinos, se observa un aumento con la dosis de polen sin correlación alguna. Al contrario que ocurría con el IPT, para la IC se obtienen los máximos a dosis bajas (0,1 y 1 g/L). En la Figura 26, se observa cómo se

produce un incremento en la IC de forma significativa en todos los casos (ANOVA, $p < 0,05$), y un aumento de la componente amarilla a partir de la dosis de 0,25 g/L, reflejada en la tonalidad (N). Nuevamente, no se observa correlación entre la IC y el IPT, por lo que se podría indicar que los compuestos cedidos por el polen (cuantificados junto al IPT), no tienen efecto importante sobre el color de los vinos. Únicamente, el ligero efecto de incremento de la componente amarilla frente a la roja (N).

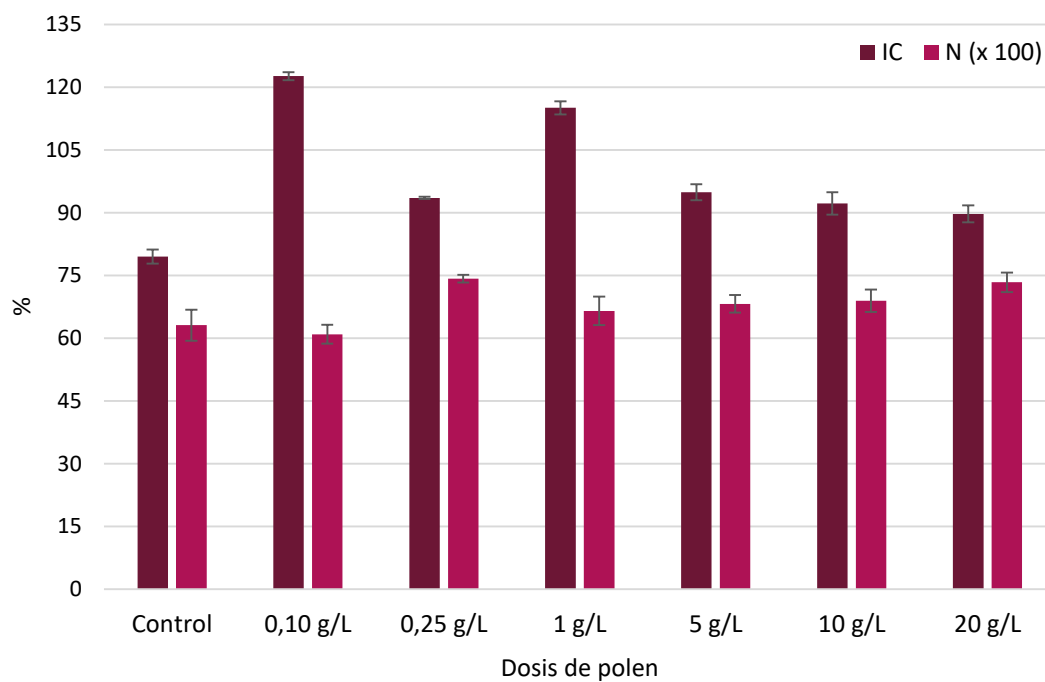


Figura 26. Intensidad colorante (IC) y tonalidad (N) de los vinos tintos de Tintilla de Rota, elaborados con diferentes dosis de polen.

Tabla 11. Composición físico-química de los vinos de Tintilla de Rota con diferentes dosis de polen (control, 0,1, 0,25, 1, 5, 10 y 20 g/L)

Parámetros	Vinos Tintilla de Rota con polen de abeja						
	Control	0,1 g/L	0,25 g/L	1 g/L	5 g/L	10 g/L	20 g/L
% Alcohol v/v	13,97 ± 0,06 ^{a,b}	13,97 ± 0,14 ^{a,b}	14,22 ± 0,03 ^a	14,15 ± 0,03 ^a	13,65 ± 0,07 ^b	14,14 ± 0,03 ^a	13,89 ± 0,08 ^{a,b}
pH	3,79 ± 0,01 ^{a,b}	3,73 ± 0,02 ^b	3,84 ± 0,01 ^{a,b}	3,84 ± 0,01 ^{a,b}	3,81 ± 0,01 ^{a,b}	3,89 ± 0,01 ^a	3,90 ± 0,01 ^a
Acidez total (g/L)	4,83 ± 0,04 ^a	4,88 ± 0,01 ^a	4,83 ± 0,04 ^a	4,93 ± 0,04 ^a	4,88 ± 0,01 ^a	4,93 ± 0,04 ^a	4,78 ± 0,04 ^a
Acidez volátil (g/L)	0,63 ± 0,01 ^a	0,56 ± 0,01 ^b	0,58 ± 0,02 ^b	0,44 ± 0,01 ^c	0,44 ± 0,01 ^c	0,50 ± 0,01 ^d	0,53 ± 0,01 ^e
Glucosa (g/L)	0,378 ± 0,002 ^a	0,282 ± 0,002 ^{b,c,d,e}	0,291 ± 0,000 ^{c,d,e}	0,384 ± 0,004 ^a	0,375 ± 0,005 ^a	0,282 ± 0,001 ^d	0,294 ± 0,004 ^e
Fructosa (g/L)	0,293 ± 0,008 ^a	0,371 ± 0,007 ^b	0,297 ± 0,001 ^a	0,324 ± 0,003 ^c	0,270 ± 0,002 ^{d,f}	0,254 ± 0,004 ^e	0,273 ± 0,000 ^f
Anthocianos (mg/L)	777,13 ± 1,24 ^a	833,13 ± 1,24 ^b	725,50 ± 0,01 ^{c,d,e}	772,31 ± 0,62 ^a	709,31 ± 0,62 ^d	743,44 ± 0,62 ^e	795,94 ± 0,62 ^a
Taninos (g/L)	2,65 ± 0,01 ^a	2,67 ± 0,01 ^a	2,61 ± 0,01 ^a	2,74 ± 0,01 ^b	2,59 ± 0,01 ^a	2,51 ± 0,01 ^c	2,40 ± 0,01 ^d
IPT	60,48 ± 1,81 ^a	66,38 ± 0,89 ^b	74,36 ± 0,41 ^c	75,48 ± 0,47 ^c	79,53 ± 0,84 ^d	83,56 ± 1,66 ^e	88,72 ± 0,98 ^f
L*	78,092 ± 0,030 ^a	75,999 ± 0,048 ^a	77,810 ± 0,010 ^a	75,593 ± 0,035 ^a	75,593 ± 0,035 ^a	77,721 ± 0,023 ^a	77,984 ± 0,172 ^a
a*	19,959 ± 0,066 ^a	16,297 ± 0,060 ^b	18,332 ± 0,025 ^{c,e}	14,429 ± 0,025 ^d	18,625 ± 0,023 ^e	18,642 ± 0,014 ^e	18,745 ± 0,079 ^e
b*	5,256 ± 0,095 ^a	6,446 ± 0,160 ^b	7,006 ± 0,041 ^c	5,890 ± 0,066 ^{d,e}	6,092 ± 0,391 ^{e,f}	5,434 ± 0,005 ^a	6,158 ± 0,483 ^f
C*	20,64 ± 0,06 ^a	17,53 ± 0,01 ^b	19,63 ± 0,03 ^{c,f}	15,58 ± 0,05 ^{d,e}	15,58 ± 0,05 ^e	19,42 ± 0,01 ^f	19,73 ± 0,22 ^f
Tonalidad (N)	0,631 ± 0,001 ^a	0,609 ± 0,001 ^a	0,742 ± 0,001 ^{b,f}	0,665 ± 0,002 ^{c,d}	0,682 ± 0,002 ^{d,e}	0,689 ± 0,001 ^e	0,733 ± 0,002 ^f
Intensidad Colorante (IC)	0,795 ± 0,001 ^a	1,226 ± 0,008 ^b	0,935 ± 0,001 ^{c,f,g}	1,150 ± 0,001 ^d	0,949 ± 0,001 ^{e,f}	0,922 ± 0,001 ^{f,g}	0,897 ± 0,001 ^g

Diferentes letras en superíndice indican que existen diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$), obtenido mediante ANOVA bidireccional, aplicando la prueba de análisis múltiple de Bonferroni (BSD).

4.2.5 Evaluación de los efectos de la adición de polen sobre los compuestos volátiles del vino y sus correspondientes VAO.

4.2.5.1 Influencia de la dosis de polen sobre los compuestos volátiles

En primer lugar, hay que decir que la adición de polen, en los vinos de Tintilla de Rota, no tiene un efecto tan acusado en la producción de compuestos volátiles (Tabla 12), como ocurría en los vinos blancos (Tablas 6 y 7), y la producción de compuestos volátiles por gramo de polen es cuantitativamente muy inferior (Figura 27). Posiblemente, los hollejos que participan específicamente en dicha vinificación, están aportando los precursores necesarios para la producción de compuestos aromáticos (Slegers et al., 2015) teniendo en cuenta la alta proporción en que se encuentran los hollejos frente al polen. Esto hace que la contribución del polen sea menos acusada en vinos tintos que en vinos blancos, donde los hollejos son separados en la prensa antes de la fermentación (Togores, 2011). En la fermentación de vinos blancos, las levaduras toman los nutrientes disponibles en el mosto y los que directamente está aportando el polen.

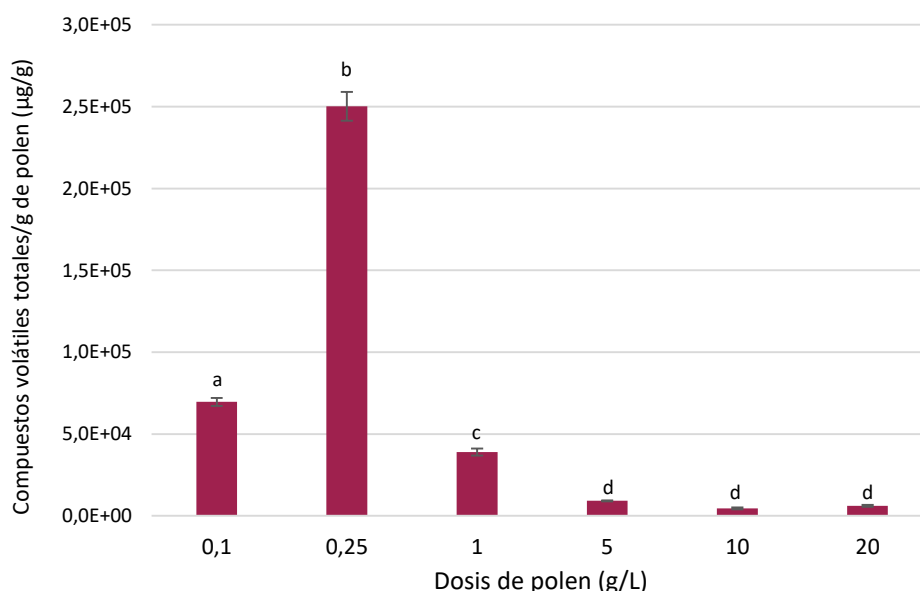


Figura 27. Tasa de producción de compuestos volátiles por gramo de polen en los vinos de Tintilla de Rota fermentados con diferentes dosis de polen. Diferentes letras en superíndice, significa que existen diferencias significativas entre las muestras (ANOVA, $p < 0,05$)

Sin embargo, el polen afecta de manera importante al perfil de los compuestos volátiles. A continuación, se analiza las distintas familias de compuestos volátiles detectados en el vino.

4.2.5.2 Alcoholes superiores y metanol

Los alcoholes superiores se encuentran en concentraciones totales del orden de 200 mg (Tabla 12), por debajo de los niveles alcanzados en vinos blancos con las dosis altas de polen (Tablas 6 y 7). De forma general, los alcoholes superiores no se ven afectados por el uso de polen, salvo para la dosis de 0,25 g/L, donde el alcohol isoamílico es ligeramente superior, sin llegar a sobrepasar los 400 mg/L. Teniendo en cuenta los niveles de NFA de los vinos tintos son superiores a los de los vinos blancos, cabía esperar que los niveles de alcoholes superiores en tintos fueran superiores, sin embargo, esto no ocurre. Estos resultados hacen pensar que no existe una relación entre NFA y producción de alcoholes superiores, y que la presencia del hollejo está amortiguando el efecto del polen.

4.2.5.3 Aldehídos

De manera general, los contenidos en aldehídos de los vinos tintos (3066 – 5699 µg/L) (Tabla 12) son mucho más bajos que en vinos blancos (44264 – 179673 y 32903 – 46704 µg/L, Palomino fino y Riesling respectivamente). No se observa ninguna correlación entre la formación de aldehídos y la dosis de polen, y sus contenidos fluctúan entre las diferentes dosis. Como cabía esperar, el acetaldehído es el compuesto mayoritario en esta familia, seguido por benzeneacetaldehído, contribuyendo ambos al perfil sensorial de los vinos con notas de fruto seco y floral. A diferencia de los vinos blancos, en este caso, se identificaron dos nuevos compuestos, nonanal y 3-metilbutanal, que debido a los bajos umbrales de percepción contribuyen como veremos en cierta medida en el perfil aromático de los vinos.

4.2.5.4 Alcoholes

En los vinos tintos, en general, el contenido en alcoholes es mucho mayor que en blancos (< 1%), representando entre el 4 – 5,5 % del total de compuestos volátiles (Tabla 12). Los valores de los alcoholes presentan fluctuaciones en todas las dosis de polen, sin seguir ninguna correlación. Este comportamiento está marcado principalmente por alcohol fenilético, que es el alcohol mayoritario, junto con 1-

pentanol y 1H-indole-3-ethanol. Tanto el alcohol feniletílico como el 1H-indole-3-ethanol, presentan fluctuaciones con las dosis de polen. Sin embargo, el 1-pentanol junto a la mayoría de los alcoholes, tienden a aumentar de forma significativa con respecto al testigo.

4.2.5.5 Ácidos

De partida, el contenido en ácidos de los vinos tintos es mucho menor que en los vinos blancos, un aspecto que podría ser atribuido al carácter varietal y también a la presencia de los hollejos en la fermentación. Algunos autores han constatado que, en la vinificación en tinto, los hollejos aportan ácidos grasos (oleico y linoleico), que son metabolizados e incorporados a las membranas celulares de las levaduras, reduciéndose globalmente la síntesis de los ácidos volátiles por parte de las levaduras (Ribéreau-Gayon et al., 2003; Togores, 2011). Este efecto podría justificar las diferencias entre los vinos tintos y blancos. Sin embargo, cuando se analiza el perfil de los ácidos, se pueden distinguir dos comportamientos muy diferenciados (Tabla 12). Por un lado, tanto el testigo como las dosis bajas e intermedia (0,1 – 1 g/L), presentan concentraciones entre 1688,54 y 2177,68 µg/L, y por otro, las dosis altas (5 – 20 g/L) muestran un rango mayor de concentración, con valores entre 3265,30 y 4064,52 µg/L. Se esperaba un comportamiento similar al observado anteriormente en vinos blancos, o sea, una ligera disminución a dosis elevadas de polen, ya que la concentración de estos dos ácidos (oleico y linoleico) sería mayor. Una posible explicación a estos incrementos, podría ser debida a los fenómenos de autólisis producidos durante el periodo entre el final de la FA y de la FML, ya que como consecuencia de la lisis celular se pueden ceder al medio ácidos grasos volátiles que forman parte de las membranas celulares. Este fenómeno ha sido constatado por algunos autores que han podido verificar que al final de la FML se produce una solubilización importante de ácidos grasos como el hexanoico, octanoico, decanoico y dodecanoico, que son liberados por las levaduras por la autólisis (Lonvaud-Funel et al., 1988; Ribéreau-Gayon et al., 2003).

4.2.5.6 Ésteres

De forma global, los niveles y los porcentajes de representación de los ésteres producidos en los vinos tintos (10,86 – 22,34 %) (Tabla 12), son superiores a los obtenidos en los vinos blancos (1,55 – 5,39 %, Palomino fino y Riesling, respectivamente) (Tablas 6 y 7). Asimismo, se observa una correlación lineal entre la concentración de ésteres en los vinos y las dosis de polen ($r^2 = 0,96$). Este comportamiento no se produce en los vinos blancos, donde incluso se observa una disminución de los ésteres, posiblemente causado por un efecto de inhibición debido a un exceso de concentración de algunos alcoholes superiores (Amores-Arrocha et al., 2018). En la mayoría de los casos, los ésteres aumentan con la dosis de polen: acetato de etilo ($r^2 = 0,96$), acetato de isoamilo, octanoato de etilo, succinato de dietilo ($r^2 = 0,68$), acetato de fenetilo, lactato de etilo ($r^2 = 0,64$), hexadecanoato de metilo, ácido hexadecanoico, éster etílico, 8-nonanoato de etilo ($r^2 = 0,90$), acetato de hexilo ($r^2 = 0,78$), nonanoato de etilo ($r^2 = 0,71$) y malato de dietilo ($r^2 = 0,67$).

Por lo tanto, se podría decir, que, con la adición de polen, se favorece la formación de ésteres en los vinos tintos de Tintilla de Rota. Esto podría indicar que durante la fermentación se está favoreciendo la síntesis de algunos de sus precursores como los alcoholes. Es importante tener en cuenta, en que estos compuestos han sido cuantificados en vinos tintos después de la realizar la fermentación maloláctica. Según indican algunos autores, después de la FML, se pueden observar incrementos en la concentración de ésteres como el acetato de etilo, hexanoato de etilo, lactato de etilo y octanoato de etilo, así como disminuciones en algunos ésteres (Zeeman et al., 1982; Dittrich, 1987; Laurent et al., 1994; De Revel et al., 1999; Delaquis et al., 2000; Gambaro et al., 2001; Swiegers et al., 2005). Esto justificaría las diferencias encontradas entre vinos tintos y blancos, pero no podría explicar la razón del aumento de ésteres con la adición de polen.

4.2.5.7 Alcoholes C6

Los alcoholes C6 se encuentran en los vinos tintos en un rango entre 490 y 587 $\mu\text{g/L}$ (Tabla 12), mientras que en los vinos blancos se presentan entre 191 – 513 $\mu\text{g/L}$ y

488- 717 $\mu\text{g/L}$, para Palomino fino y Riesling, respectivamente (Tablas 6 y 7). Estos compuestos, con aromas vegetales y a hierbas frescas, son formados antes de la fermentación alcohólica, por acción enzimática sobre sus principales precursores, el ácido linoleico y el ácido linolénico (Crouzet and Flanzy, 1998). Durante la fermentación alcohólica, estos compuestos formados son reducidos por las levaduras hacia alcoholes, principalmente hexanol y hexenol, siendo el segundo más odorante pero encontrado en menor concentración en los vinos (Crouzet and Flanzy, 1998; Cheynier et al., 2010). Estos compuestos también existen en la propia uva, en su forma glicolisada, aunque no en niveles tan altos ya que se forman en mayor medida durante las etapas prefermentativas. Los vinos tintos, debido a la presencia de sustancias polifenólicas antioxidantes en los hollejos, presentan menor tendencia a las oxidaciones que los blancos, en este sentido se estaría amortiguando la formación de estos compuestos. En todo caso no se observa ningún efecto relevante del polen sobre dichos compuestos.

4.2.5.8 *Terpenos*

Los terpenos representan un porcentaje muy bajo dentro de las diferentes familias de compuestos volátiles de los vinos los vinos tintos obtenidos ($< 0,1\%$) (Tabla 12). Estos compuestos son característicos de algunas variedades de uvas, aportando importantes notas florales en el aroma de los vinos (Bayonove, 1998). Los principales terpenos con capacidad de aportar aroma al vino, se encuentran de forma natural en los hollejos de las uvas, por lo que las operaciones de vinificación que favorecen la extracción (maceraciones o bazuqueos), además de las propias acciones enzimáticas, pueden ayudar a liberarlos al medio (Cheynier et al., 2010).

Como se puede observar (Tabla12) los contenidos en terpenos aumento con la adición de polen, no existiendo una correlación directa con la dosis aplicada. Por tanto, cabe pensar que además del hollejo, el polen está aportando de manera directa terpenos al vino. Como cabía esperar, los niveles de estos compuestos para los vinos tintos (158 – 318 $\mu\text{g/L}$) son más elevados que en blancos (80–167 $\mu\text{g/L}$ y 115–237 $\mu\text{g/L}$, Palomino fino y Riesling, respectivamente). Como se puede observar en la Tabla 12, la mayoría de los terpenos aumentan con respecto al testigo, destacando el 8-

hidroxilinalool. Este enriquecimiento en compuestos terpénicos puede afectar positivamente al perfil sensorial de los vinos como veremos más adelante.

4.2.5.9 Fenoles

La mayoría de estos compuestos son formados durante la fermentación alcohólica, mediante procesos de descarboxilación de ácidos hidroxicinámicos llevados a cabo por *Saccharomyces cerevisiae*. Los fenoles se encuentran en muy poca concentración en los vinos tintos debido a inhibición de la actividad enzimática ejercida por los taninos (Chatonnet et al., 1993), mientras que, en los vinos blancos, estos compuestos no llegan a alcanzar niveles significativos porque rápidamente son degradados por la acción del etanol (Dugelay et al., 1993). En los vinos blancos estudiados no fueron detectados, mientras que, en los vinos tintos, los dos compuestos fenólicos mayoritarios fueron el 4-vinilguaiacol, seguido por acetovainillona, aportando notas especiadas en el aroma de los vinos, notas de aroma típicas en la variedad Tintilla de Rota. Como se puede observar, los contenidos en fenoles fluctúan con las dosis de polen y no podemos establecer ninguna pauta o comportamiento al respecto.

4.2.5.10 Tioles, acetales, norisoprenoides

Los tioles, acetales y norisoprenoides representan las tres familias de compuestos minoritarias dentro del perfil de compuestos volátiles de los vinos tintos analizados (Tabla 12). En este caso, los tioles están representados por 3-(metiltio)-1-propanol, cuya concentración se incrementa con el aumento de las dosis de polen. La formación de estos compuestos tiene su origen en precursores a partir de la cisteína presente en el mosto (Cheynier et al., 2010) y son las levaduras las que degradan estos precursores para dar lugar a los tioles. Teniendo en cuenta que el polen aporta cisteína (Campos et al., 2008; da Silva et al., 2014; Bogdanov, 2017), podría justificarse el aumento en la producción de este compuesto.

En cuanto a los acetales, son compuestos que pueden provenir del acetaldehído y el glicerol, aunque su concentración solo suele ser elevada en vinos fortificados (Cheynier et al., 2010). En este caso, esta familia está representada por 1-(1-etoxietoxi)-

pentano, cuya concentración en los vinos presenta una tendencia a incrementarse sobre todo a partir de la dosis de 5 g/L. Sin embargo, no son compuestos que tengan contribución al aroma de los vinos ya que son inodoros.

En último lugar, se encuentra la familia de los norisoprenoides, en este caso, representado por 3-oxo- α -ionol, cuya concentración se incrementa con la adición de polen, siendo mayor este incremento a las dosis altas (10 y 20 g/L polen). Algunos norisoprenoides (trans- β -damascenona, 3-hidroxi-trans- β -damascona, 3-oxo- α -ionol, 3-oxo- α -ionona, β -ionona) han sido encontrados en varios tipos de miel y tienen su origen directo en precursores de carotenoides (Jerkovic, 2018). Teniendo en cuenta que una de las principales materias primas de la miel es el polen, cabe la posibilidad de que el polen esté cediendo estos compuestos durante la vinificación.

4.2.5.11 Lactonas

Las lactonas se forman por una reacción de esterificación interna entre un grupo funcional ácido y un grupo funcional alcohol en una misma molécula, dando lugar a una molécula heterocíclica oxigenada; entre las que se encuentran algunas de origen fermentativo, susceptibles de participar en los aromas de los vinos (Ribéreau-Gayon et al., 2012). En el perfil de los vinos tintos estudiados, los dos compuestos identificados en la familia de las lactonas fueron dihydro-5-pentil-2(3H)-furanona y 2,3-dihydro benzofuranona, representando menos de 0,1% de la composición total de los compuestos volátiles. Dihydro-5-pentyl-2(3H)-furanona presenta un comportamiento con oscilaciones, mientras que 2,3-dihydro-Benzofuranona se mantuvo con valores constantes para todas las dosis. Dado que solo el primer compuesto presentó umbral de percepción conocido, y siendo éste un valor alto, el perfil sensorial de los vinos, como veremos, no se verá afectado.

Tabla 12. Concentración de los compuestos volátiles ($\mu\text{g/L}$) en vinos tintos de Tintilla de Rota con diferentes dosis de polen.

Compuestos volátiles	Dosis de polen							
	Control	0,1 g/L	0,25 g/L	1 g/L	5 g/L	10 g/L	20 g/L	
Alcoholes superiores								
2 – Propanol	34953,9 ± 1276,1 ^a	36052,5 ± 2210,1 ^a	38842,7 ± 4907,9 ^a	34985,5 ± 1788,9 ^a	36902,1 ± 799,7 ^a	34768,3 ± 1495 ^a	33171,9 ± 815,5 ^a	
N-propilo	27691,4 ± 2165,4 ^a	28078,3 ± 3292,1 ^{a,b}	27692,6 ± 1445 ^a	33332,2 ± 3069,1 ^{b,c}	29588,4 ± 720,7 ^{a,c}	30273,1 ± 2148,2 ^{a,c}	34846,2 ± 2039,4 ^c	
Isobutanol	31385,1 ± 1539,9 ^{a,b}	31248,3 ± 1983,1 ^a	39121 ± 683,8 ^b	38397,8 ± 1745,5 ^{a,b}	34307,7 ± 358,1 ^{a,b}	36460,3 ± 1599,1 ^{a,b}	50569 ± 1463,5 ^c	
Alcohol isoamílico	354323,6 ± 16785,8 ^{a,b}	350155,6 ± 21853 ^{a,b}	393105,9 ± 5534 ^a	354546,7 ± 16445 ^{a,b}	316247,7 ± 3734,7 ^b	347556,9 ± 15377,3 ^{a,b}	355663,7 ± 10652,6 ^{a,b}	
Total	448353,9 ± 21767,1	445534,8 ± 29338,3	498762,1 ± 12570,7	461262,2 ± 23048,6	417045,8 ± 5613,1	449058,5 ± 20619,7	474250,8 ± 14971	
% Alcoholes superiores	77,53%	76,12%	77,82%	74,73%	70,49%	71,89%	67,65%	
Metanol								
Total	32708,5 ± 3833 ^{a,b}	34834,6 ± 3461,2 ^{a,c,d}	27651,5 ± 141,1 ^b	40294 ± 5164 ^{c,d,e}	40450,6 ± 1741,7 ^{d,e}	43161,7 ± 5621 ^e	33131,9 ± 4624,9 ^{a,b}	
% Metanol	5,66%	5,95%	4,31%	6,53%	6,84%	6,91%	4,73%	
Ácidos								
Ácido butanoico	30 ± 0,2 ^{a,b}	33 ± 0,7 ^b	34,2 ± 0,8 ^{c,d}	29,3 ± 0,8 ^a	32 ± 2,5 ^{b,c,d}	29,8 ± 0,4 ^{a,b}	29,4 ± 0,7 ^{a,b}	
Ácido 3-metil-butanoico	189 ± 1,6 ^a	190,4 ± 2,7 ^a	182,2 ± 10,7 ^a	188,8 ± 13,5 ^a	193,4 ± 6,8 ^a	189,9 ± 14,1 ^a	184,2 ± 7,3 ^a	
Ácido hexanoico	556,3 ± 42,4 ^a	651,6 ± 5,8 ^b	466,5 ± 26,1 ^{c,e,f}	390,4 ± 4,5 ^d	463,5 ± 29,4 ^{e,f}	477,2 ± 3,3 ^f	770,4 ± 23 ^g	
Ácido heptanoico	20,7 ± 0,7 ^a	24 ± 0,6 ^a	24,7 ± 0,5 ^a	25,6 ± 0,7 ^a	27,9 ± 0,9 ^a	74,8 ± 0,9 ^b	144,4 ± 10,7 ^c	
Ácido 2-Hexenoico	34 ± 0,6 ^a	39,4 ± 0,6 ^{b,c}	39,9 ± 0,3 ^c	44,6 ± 1,6 ^{d,e}	45,7 ± 1,7 ^e	53,7 ± 4,5 ^f	60 ± 0,2 ^g	
Ácido octanoico	624,4 ± 19,8 ^a	366,6 ± 23,9 ^{b,c}	443,7 ± 30,9 ^c	648,1 ± 37,2 ^a	1424,5 ± 14 ^{d,e}	1443,3 ± 30,6 ^e	1253,8 ± 39,3 ^f	
Ácido nonanoico	87,7 ± 2,1 ^a	76,4 ± 3,4 ^a	90,5 ± 3,7 ^a	116,2 ± 1,4 ^a	556,2 ± 9,7 ^b	182,6 ± 0,4 ^c	184,4 ± 11,1 ^c	
Ácido n-Decanoico	0,19 ± 0,01 ^a	398,5 ± 26,5 ^{b,c,f}	412,4 ± 1,3 ^{c,f}	311,9 ± 6,9 ^d	866,4 ± 46,2 ^e	440,9 ± 3,0 ^f	450,3 ± 39,6 ^f	
Ácido 9-Decenoico	21,4 ± 1,5 ^a	154,3 ± 12,4 ^b	33,8 ± 1,9 ^{c,d}	39,1 ± 0,8 ^d	80,1 ± 1,3 ^{e,g}	52,7 ± 2,7 ^f	87,9 ± 0,6 ^g	
Ácido benzoico	84,2 ± 5,9 ^a	200,8 ± 0,1 ^b	108,7 ± 1,4 ^{a,c}	125 ± 5,8 ^c	328,8 ± 29,8 ^d	274 ± 3,5 ^e	371,3 ± 12,2 ^f	
Ácido bencenoacético	40,8 ± 0,4 ^a	42,8 ± 0,8 ^{a,b,c}	41,9 ± 1,1 ^a	43,9 ± 0,5 ^{a,b,c}	46 ± 0,7 ^{b,c}	46,4 ± 0,7 ^c	49,5 ± 2,2 ^c	
Total	1688,6 ± 75,2	2177,7 ± 77,5	1878,5 ± 78,7	1962,8 ± 73,8	4064,5 ± 143,1	3265,3 ± 64,1	3585,5 ± 147	
% Ácidos	0,29%	0,37%	0,29%	0,32%	0,69%	0,52%	0,51%	
Alcoholes C-6								
1-Hexanol	493,9 ± 9,5 ^a	431,1 ± 1,7 ^{b,c,d}	436,6 ± 19,2 ^{c,d}	433 ± 10,2 ^d	434,2 ± 20,2 ^e	520,3 ± 1,4 ^a	539,5 ± 53,1 ^a	
(E)-3-Hexen-1-ol	16,7 ± 0,2 ^a	29,1 ± 0,5 ^{b,c}	30,9 ± 0,9 ^{c,d}	33,1 ± 0,8 ^d	35,7 ± 1,7 ^e	36,1 ± 0,6 ^e	37,7 ± 1,4 ^e	
(Z)-3-Hexen-1-ol	25,3 ± 2,4 ^a	30 ± 1,4 ^{a,d}	31,8 ± 1,0 ^a	91,2 ± 0,4 ^b	101,1 ± 6,8 ^c	6,2 ± 0,3 ^d	9,5 ± 0,1 ^{a,d}	
Total	535,9 ± 12,1	490,3 ± 3,6	499,2 ± 21	557,2 ± 11,4	571 ± 28,7	562,6 ± 2,3	586,7 ± 54,6	
% Alcoholes C-6	0,09%	0,08%	0,08%	0,09%	0,10%	0,09%	0,08%	
Alcoholes								
3-Penten-2-ol	103,6 ± 4,9 ^a	45,1 ± 2,4 ^{b,c}	50,6 ± 0,1 ^c	63,6 ± 4,7 ^{d,e,f}	67,2 ± 3,9 ^{e,f}	70,9 ± 0,1 ^f	129,5 ± 2,0 ^g	
1-Pentanol	1358,2 ± 53,1 ^a	1812,7 ± 73,5 ^{b,c,d,e}	1331,8 ± 123,8 ^a	1746,8 ± 14,0 ^{c,d,e}	1847,5 ± 17,9 ^{d,e}	1992,8 ± 0,5 ^e	2925,1 ± 187,4 ^f	
3-Etil-2-pentanol	10,1 ± 0,3 ^a	12,7 ± 0,7 ^{b,c}	13,9 ± 1,0 ^c	16,6 ± 0,1 ^{d,e}	17,8 ± 0,1 ^e	20 ± 0,2 ^f	21,3 ± 1,9 ^f	
4-metil-1-pentanol	13 ± 0,7 ^a	16 ± 0,8 ^{b,c,d}	17,3 ± 0,6 ^{c,d}	18,3 ± 0,7 ^{d,e}	20,5 ± 0,4 ^{e,f}	20,7 ± 1,1 ^f	25,8 ± 1,7 ^g	

3-metil-1-pentanol	290,4 ± 8,0 ^a	278,7 ± 2,9 ^a	184,1 ± 7,2 ^b	320,1 ± 20,5 ^c	288,6 ± 15,5 ^a	273,6 ± 4,3 ^a	110,2 ± 8,7 ^d
3-etoxi-1-Propanol	99,3 ± 0,7 ^a	100,7 ± 0,7 ^a	112,4 ± 2,8 ^{b,c,e}	118,9 ± 1,1 ^{c,d,e,f}	125 ± 0,8 ^{d,e,f}	120 ± 1,6 ^{e,f}	125,9 ± 0,6 ^f
1-Octanol	20,8 ± 1,0 ^a	23 ± 0,7 ^{a,b}	24,7 ± 0,4 ^{b,c,d,e}	25,5 ± 0,1 ^{c,d,e,f}	25,9 ± 0,1 ^{d,e,f}	25,8 ± 1,6 ^{e,f}	27,6 ± 0,7 ^f
1-Nonanol	3,8 ± 0,3 ^a	2,4 ± 0,2 ^{b,c,d,e}	2,7 ± 0,02 ^{c,d,f}	2,4 ± 0,2 ^{d,e}	2,2 ± 0,2 ^e	2,8 ± 0,2 ^{f,g}	3,1 ± 0,02 ^g
Alcohol bencílico	84,5 ± 7,1 ^a	93,7 ± 0,6 ^a	133 ± 10,6 ^{a,b}	179,7 ± 3,8 ^b	603,9 ± 58,2 ^c	248,8 ± 2,3 ^d	247,7 ± 18,8 ^d
Alcohol fenilético	23942,5 ± 1414,2 ^a	23512 ± 235,9 ^a	28318,7 ± 302,5 ^{b,c}	24110,5 ± 1481,8 ^a	27830,4 ± 2039,4 ^c	22209,8 ± 331,3 ^a	23346,3 ± 2021,2 ^a
1H-indol-3-etanol	862,1 ± 25 ^a	1313,5 ± 10,6 ^{b,c}	1452 ± 118,6 ^c	1823,4 ± 2,6 ^{d,e}	1866,8 ± 64,1 ^e	452 ± 28,7 ^f	551,7 ± 6,5 ^f
1-Butanol	31,2 ± 1,6 ^a	22,7 ± 0,9 ^{a,b}	15,3 ± 0,9 ^{b,e}	23,3 ± 1,7 ^{a,e}	114,3 ± 5,8 ^c	44,3 ± 1,0 ^d	29,7 ± 0,8 ^a
3-metil-2-Buten-1-ol	41,5 ± 1,7 ^a	25,8 ± 1,2 ^b	46,9 ± 1,4 ^{a,c}	49,3 ± 4,3 ^c	57,1 ± 2,8 ^d	65,5 ± 4,1 ^e	77,9 ± 1,1 ^f
Total	26861 ± 1518,6	27259 ± 331,2	31703,5 ± 570	28498,3 ± 1535,6	32867,2 ± 2209	25547 ± 377	27622 ± 2251,4
% Alcoholes	4,64%	4,66%	4,95%	4,62%	5,56%	4,09%	3,94%
Fenoles							
2,6-di-terc-butil-4-etilfenol	23,1 ± 0,8 ^a	29,1 ± 0,5 ^{b,c}	29,8 ± 0,4 ^c	20,1 ± 0,1 ^{d,e,f}	18,6 ± 1,4 ^{e,f}	20,8 ± 0,9 ^{a,f}	23,3 ± 0,1 ^a
4-Etilfenol	6,7 ± 0,2 ^a	8,2 ± 0,4 ^{b,e}	9,4 ± 0,7 ^{c,d,e}	10,1 ± 0,1 ^d	8,6 ± 0,2 ^e	4,9 ± 0,5 ^f	7,2 ± 0,1 ^a
4-Vinilguaicol	33,4 ± 1,1 ^a	55,7 ± 5,3 ^b	76,6 ± 3,7 ^{c,d}	74,9 ± 6,3 ^d	23,1 ± 0,8 ^{e,f}	23 ± 1,4 ^f	41,5 ± 0,3 ^g
Acetovainillina	19,7 ± 0,7 ^a	32,7 ± 0,8 ^{b,d,f}	46,2 ± 0,5 ^c	32,6 ± 0,7 ^{d,f}	26,3 ± 0,7 ^e	20,5 ± 1,4 ^a	36,3 ± 0,7 ^f
Total	82,9 ± 2,9	125,6 ± 7	162 ± 5,2	137,7 ± 7,2	76,6 ± 3,1	69,2 ± 4,1	108,3 ± 1,2
% Fenoles	0,01%	0,02%	0,03%	0,02%	0,01%	0,01%	0,02%
Terpenos y derivados							
Óxido de linalool	50,5 ± 0,9 ^a	74,2 ± 1,8 ^b	86,3 ± 8,1 ^{c,f}	59,1 ± 0,8 ^d	50,1 ± 3,5 ^a	38,2 ± 0,6 ^e	88,3 ± 2,7 ^f
Linalol	11,5 ± 0,5 ^a	12,9 ± 0,8 ^{a,b}	13,5 ± 0,1 ^b	16,7 ± 0,3 ^{c,e}	11,8 ± 0,5 ^a	18,4 ± 0,8 ^d	17 ± 0,5 ^{e,d}
α-Terpieol	9,7 ± 0,2 ^a	10,8 ± 0,1 ^a	15,3 ± 0,1 ^b	19,1 ± 0,9 ^{c,e}	23,2 ± 1,4 ^d	18,9 ± 1,4 ^e	34 ± 2,4 ^f
(R)-(+)-β-Citronellol	8,7 ± 0,2 ^a	9,7 ± 0,2 ^{a,b}	10,2 ± 0,1 ^b	13,8 ± 0,9 ^{c,e}	16,8 ± 0,9 ^{d,f}	12,7 ± 0,8 ^e	15,7 ± 1,4 ^f
2,6-dimetil-3,7-Octadiene-2,6-diol,	29 ± 0,1 ^a	32,8 ± 0,4 ^{b,e,f,g}	38,9 ± 0,2 ^{c,d,e}	41,2 ± 1,5 ^d	36,2 ± 0,7 ^{e,f}	33,3 ± 0,6 ^{f,g}	32,6 ± 0,7 ^g
8-Hydroxylinalool	49,4 ± 2,1 ^a	100,4 ± 0,9 ^{b,d,g}	202,4 ± 0,3 ^c	91,1 ± 7,9 ^d	387,1 ± 8,9 ^e	142,2 ± 11,8 ^f	130,3 ± 9,8 ^{f,g}
Total	158,8 ± 4,1	240,8 ± 4,3	366,7 ± 8,9	240,9 ± 12,4	525,2 ± 15,8	263,7 ± 16	318 ± 17,4
% Terpenos y derivados	0,03%	0,04%	0,06%	0,04%	0,09%	0,04%	0,05%
Ésteres							
Acetato de etilo	60290,1 ± 5264,2 ^a	65998,8 ± 4222,7 ^{a,b}	68955 ± 3516,9 ^{a,b}	75224,6 ± 6073,5 ^{b,c}	85400,4 ± 1651,2 ^{c,d}	94930,8 ± 4988,6 ^d	151421,2 ± 10126 ^e
Butirato de etilo	0,15 ± 0,01 ^a	27,2 ± 0,7 ^{b,g}	37,5 ± 2,8 ^c	55,3 ± 1,8 ^d	127,1 ± 2,4 ^e	16,7 ± 0,1 ^f	23 ± 1,9 ^g
Isovalerato de etilo	5,6 ± 0,3 ^a	14,5 ± 0,2 ^b	17,7 ± 0,1 ^c	20,9 ± 0,8 ^{d,g}	25,1 ± 0,7 ^e	27,6 ± 0,1 ^f	19,9 ± 2,1 ^g
Acetato de isoamilo	29,4 ± 0,9 ^a	45,5 ± 1,6 ^{b,c}	50,5 ± 0,3 ^c	75,5 ± 1,9 ^d	180,1 ± 3,8 ^e	107,6 ± 0,1 ^f	126,9 ± 1,4 ^g
Hexanoato de etilo	60 ± 0,1 ^a	107,6 ± 2,1 ^{b,c,g}	105,1 ± 0,7 ^{c,g}	124,9 ± 1,8 ^{d,e,f}	118,9 ± 0,3 ^{e,h}	133,6 ± 1,4 ^f	115 ± 4,3 ^h
Acetato de hexilo	26,3 ± 0,01 ^a	29,4 ± 0,01 ^{a,b}	30,3 ± 0,01 ^{b,c,d,e}	32,8 ± 0,7 ^{c,g}	28,3 ± 1,4 ^{a,e}	33,4 ± 0,01 ^{d,g}	42,6 ± 2,1 ^f
Ácido butanoico, 2-hidroxi-3-metil, etil éster	13,2 ± 1,3 ^a	15,8 ± 0,9 ^a	17,7 ± 0,7 ^a	29,6 ± 0,8 ^{b,e}	63,3 ± 2,7 ^c	37 ± 1,4 ^d	33,4 ± 3,0 ^e
Octanoato de etilo	204,5 ± 6,1 ^a	349,9 ± 32,6 ^{b,c,g}	372 ± 0,6 ^{c,g}	244,8 ± 22,1 ^{d,e,f}	261,2 ± 26,5 ^{e,f}	245,4 ± 21,8 ^f	346,7 ± 3,1 ^g
Nonanoato de etilo	10,9 ± 0,9 ^a	12,2 ± 1,0 ^{b,c,g}	11 ± 0,6 ^{a,g}	13 ± 0,8 ^c	16,3 ± 0,6 ^{d,e,f}	15,8 ± 1,4 ^e	17,1 ± 0,5 ^f
Ethyl 2-hydroxy-4-methylpentanoate	36,8 ± 1,6 ^a	36,2 ± 3,1 ^a	37,4 ± 2,7 ^a	82,6 ± 0,7 ^b	112,9 ± 7,6 ^c	39,3 ± 1,9 ^a	47,8 ± 2,0 ^d
Isoamyl lactate	43,3 ± 1,8 ^a	139 ± 0,6 ^{b,f}	229,3 ± 3,1 ^c	101,2 ± 1,0 ^d	255,5 ± 7,1 ^e	146,6 ± 2,1 ^f	127,8 ± 0,4 ^f

Decanoato de etilo	112,1 ± 7,1 ^a	122,4 ± 0,3 ^a	154,8 ± 3,6 ^b	111,8 ± 5,3 ^a	270,2 ± 7,5 ^{c,d}	127,1 ± 1,6 ^a	273,9 ± 5,8 ^d
Succinato de dietilo	509,3 ± 12,2 ^a	681,5 ± 2,5 ^{b,d,e}	950,9 ± 48 ^{c,f}	636,5 ± 51,2 ^{d,e}	633,3 ± 44,2 ^e	907,9 ± 43,2 ^f	1310,2 ± 125,7 ^g
Ethyl 9-decanoate	59,7 ± 0,8 ^{a,c}	63,9 ± 2,3 ^{a,b}	66,1 ± 0,8 ^{b,d}	64,3 ± 1,3 ^{a,b,d}	59,4 ± 0,7 ^a	56,5 ± 1,3 ^c	62,8 ± 0,8 ^{a,b,d}
Fenilacetato de etilo	1,27 ± 0,01 ^a	2,23 ± 0,01 ^{b,c,d,f,g}	2,27 ± 0,03 ^{c,d,f,g}	2,39 ± 0,07 ^{d,e,f}	2,55 ± 0,04 ^e	2,27 ± 0,08 ^{f,g}	2,2 ± 0,08 ^g
Acetato de fenetilo	33,8 ± 0,1 ^a	97,4 ± 6,8 ^{b,e,d,f}	104,5 ± 4,1 ^{c,d}	94,9 ± 2,6 ^{d,f}	279,1 ± 5,1 ^e	80,9 ± 2,6 ^f	251 ± 3,1 ^g
Dietilo malato	24,4 ± 0,7 ^a	32,9 ± 0,9 ^{b,c,d}	34,9 ± 0,9 ^{c,d,e}	36 ± 0,9 ^{d,e}	37 ± 0,6 ^e	40,6 ± 0,7 ^f	45,1 ± 0,9 ^g
Vainillato de metilo	242,7 ± 0,5 ^a	287,4 ± 5,2 ^a	610,1 ± 8,2 ^{b,c}	550,3 ± 45,8 ^{c,e,f}	1541,4 ± 18,6 ^d	454 ± 44,7 ^{e,f}	470,4 ± 62,1 ^f
Lactato de etilo	121,4 ± 1,5 ^a	173,8 ± 5,3 ^{b,c}	155,9 ± 4,3 ^c	204,6 ± 21,0 ^{d,e}	199 ± 3,2 ^e	271,1 ± 25,7 ^f	256 ± 4,0 ^f
Ácido butanoico, 3-hidroxi, éster etílico	51,8 ± 2,5 ^a	63 ± 1,3 ^{a,b}	57 ± 5,2 ^a	76 ± 3,5 ^{b,d}	231,3 ± 3,8 ^c	82,7 ± 1,3 ^d	105,1 ± 8,0 ^e
Ethyl (Z) -4-decanoate	60,9 ± 1,2 ^a	165,9 ± 3,7 ^{b,d}	203,7 ± 17,7 ^c	191,3 ± 6,1 ^{d,c}	391,5 ± 6,4 ^e	31,9 ± 1,6 ^a	57,4 ± 0,6 ^a
Dodecanoato de etilo	68,2 ± 2,6 ^a	35,6 ± 2,0 ^b	143,5 ± 14,1 ^{c,f}	172 ± 2,8 ^d	303,9 ± 8,1 ^e	121,1 ± 1,0 ^f	91,8 ± 0,3 ^g
Tetradecanoato de metilo	34,8 ± 1,5 ^a	66,4 ± 7,2 ^{b,c,d,f}	88,5 ± 6,6 ^{c,d,f}	72,8 ± 3,8 ^{d,f}	297,9 ± 18,1 ^e	80,5 ± 0,8 ^f	87,5 ± 1,9 ^f
Ácido Succinoico, 2-hidroxi-3-metil, dietil éster	93,3 ± 8,1 ^a	110,3 ± 10,4 ^{a,b,e}	126,9 ± 3,4 ^{b,c,e,f}	144,2 ± 4,8 ^{c,e,f}	450,8 ± 36,4 ^d	131,8 ± 1,5 ^e	147,2 ± 2,3 ^f
Hexadecanoato de metilo	81,4 ± 4,6 ^a	100,9 ± 5,2 ^{b,e}	147,6 ± 0,7 ^c	219,3 ± 10,1 ^{d,g}	106,3 ± 2,1 ^e	186,4 ± 4,3 ^f	227,6 ± 5,2 ^g
Ácido hexadecanoico, éster etílico	310,8 ± 7,4 ^{a,f,g}	420,9 ± 33,5 ^{b,d}	732,6 ± 20,6 ^{c,e}	435,7 ± 10,9 ^d	719,8 ± 61,2 ^e	300,3 ± 2,5 ^f	356,1 ± 14,5 ^g
Ácido propanoico, éster 2-metil-, propílico	84,7 ± 0,8 ^a	116,1 ± 11,1 ^b	160 ± 2,4 ^{c,d,f}	154,5 ± 4,5 ^{d,f}	181,7 ± 0,1 ^e	147,7 ± 8,1 ^f	155,2 ± 9,2 ^f
Ethyl 8-nonenoato	205,6 ± 3,5 ^a	216,4 ± 3,1 ^{a,b}	235,9 ± 0,8 ^{b,f}	209,4 ± 2,2 ^{a,f}	293,9 ± 6,5 ^{c,d}	313 ± 17,6 ^d	363,5 ± 20,5 ^e
Total	62816,5 ± 5332,3	69533,2 ± 4366,3	73838,8 ± 3669,9	79381,1 ± 6282,9	92587,9 ± 1927,1	99069,5 ± 5177,4	156584,3 ± 10411,7
% Ésteres	10,86%	11,88%	11,52%	12,86%	15,65%	15,86%	22,34%
<u>Aldehídos</u>							
Acetaldehído	4890,4 ± 279,7 ^{a,b}	4810,7 ± 204,3 ^a	5520,7 ± 263,1 ^b	4482,1 ± 472,6 ^a	2887,5 ± 294,1 ^{c,d}	3292,9 ± 322,7 ^d	4422,9 ± 417,9 ^a
Benzeneacetaldehído	66,6 ± 1,9 ^a	74,3 ± 5,7 ^{a,e}	131,9 ± 10,4 ^{b,d}	145,3 ± 11,7 ^c	119,8 ± 7,0 ^d	80,5 ± 3,8 ^{a,e}	85,1 ± 2,6 ^e
Nonanal	10,5 ± 0,6 ^{a,e}	13,4 ± 0,4 ^{b,d}	16,2 ± 1,0 ^c	14,2 ± 0,5 ^d	10,7 ± 0,6 ^a	9,9 ± 0,1 ^{a,e}	8,6 ± 0,7 ^e
3-metil-butanal	15,1 ± 0,5 ^a	28,5 ± 1,5 ^{b,c}	30,1 ± 0,5 ^{c,d}	35,1 ± 2,6 ^d	48,8 ± 2,6 ^e	10 ± 0,3 ^a	15,4 ± 0,4 ^a
Total	4982,6 ± 282,7	4926,8 ± 212	5698,9 ± 275	4676,8 ± 487,4	3066,8 ± 304,4	3393,3 ± 326,9	4532,1 ± 421,6
% Aldehídos	0,86%	0,84%	0,89%	0,76%	0,52%	0,54%	0,65%
<u>Thiols</u>							
3- (metiltio)-1-Propanol	21,4 ± 1,8 ^a	49,3 ± 3,8 ^b	148,9 ± 7,5 ^c	95,7 ± 3,7 ^{d,f}	198,5 ± 3,2 ^e	88,1 ± 8,6 ^f	111,7 ± 2,4 ^g
Total	21,4 ± 1,8	49,3 ± 3,8	148,9 ± 7,5	95,7 ± 3,7	198,5 ± 3,2	88,1 ± 8,6	111,7 ± 2,4
% Thiols	0,004%	0,01%	0,02%	0,02%	0,03%	0,01%	0,02%
<u>Acetales</u>							
1-(1-etoxietoxi)-pentano	2,1 ± 0,1 ^a	2 ± 0,1 ^a	1,8 ± 0,1 ^a	3,2 ± 0,1 ^b	4,4 ± 0,2 ^c	5,4 ± 0,1 ^d	5,7 ± 0,2 ^e
Total	2,1 ± 0	2 ± 0	1,8 ± 0,1	3,2 ± 0	4,4 ± 0,2	5,4 ± 0,1	5,7 ± 0,2
% Acetales	0,0004%	0,0003%	0,0003%	0,0010%	0,0010%	0,0010%	0,0010%
<u>Norisoprenoids</u>							
3-Oxo- α -ionol	7,6 ± 0,1 ^a	13,3 ± 0,4 ^{b,c,d,e}	13,1 ± 0,1 ^{c,d,e}	14,1 ± 0,2 ^{d,e}	14,7 ± 0,1 ^e	42,8 ± 0,6 ^f	44,9 ± 1,0 ^f
Total	7,6 ± 0,1	13,3 ± 0,4	13,1 ± 0,1	14,1 ± 0,2	14,7 ± 0,1	42,8 ± 0,6	44,9 ± 1
% Norisoprenoids	0,001%	0,002%	0,002%	0,002%	0,002%	0,010%	0,010%

Lactones							
Dihydro-5-pentyl-2(3H)-Furanona	59,6 ± 0,7 ^a	55,8 ± 4,8 ^a	107,2 ± 2,8 ^{b,d}	78,8 ± 0,5 ^c	106,8 ± 0,3 ^d	66,8 ± 0,2 ^a	120,6 ± 8,4 ^e
2,3-dihydro-benzofuran	50,6 ± 1,1 ^a	50 ± 4,0 ^a	50,6 ± 1,1 ^a	42,3 ± 0,8 ^b	49,5 ± 0,8 ^a	48,8 ± 1,5 ^a	50,1 ± 1,6 ^a
Total	110,2 ± 1,7	105,8 ± 8,8	157,8 ± 4	121,1 ± 1,4	156,2 ± 1,1	115,6 ± 1,7	170,7 ± 10
% Lactones	0,02%	0,02%	0,02%	0,02%	0,03%	0,02%	0,02%

Diferentes letras en superíndice indican que existen diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$), obtenido mediante ANOVA bidireccional, aplicando la prueba de análisis múltiple de Bonferroni (BSD).

4.2.6 Análisis de Componentes Principales de compuestos volátiles (ACP)

En la Tabla 13 se muestran los resultados de las cargas de los factores extraídos en el análisis de componentes principales (ACP), incluyendo como variables la concentración total de compuestos volátiles por familias aromáticas: alcoholes superiores, metanol, ácidos, alcoholes C6, alcoholes, fenoles, terpenoides, ésteres, aldehídos, acetales, norisoprenoides y lactonas. El ACP extrae 3 factores que representan más del 91 % de la varianza total. El factor 1 (F1) se correlaciona de forma positiva con los ácidos, alcoholes C6, ésteres, acetales y norisoprenoides, estos dos últimos representados por 1-(1-etoxietoxi)-pentano y los norisoprenoides por 3-oxo- α -ionol. En este factor, están representadas todas las familias cuya concentración puede verse influenciada en mayor o menor medida por la presencia de polen, por lo que podríamos llamar a F1: factor polen, siendo los ésteres, la que presenta la mayor carga con 0,958.

Tabla 13. Cargas de las componentes principales de los compuestos volátiles en los vinos de Tintilla de Rota dosificados con polen y testigo.

Compuestos volátiles	F1	F2	F3
Alcoholes superiores	0,179	0,936	-0,059
Metanol	0,193	-0,862	-0,082
Ácidos	0,648	-0,533	0,492
Alcoholes C-6	0,744	-0,449	0,151
Alcoholes	-0,282	0,102	0,948
Fenoles	-0,284	0,831	0,152
Terpenos y derivados	0,129	-0,196	0,961
Ésteres	0,958	0,056	0,164
Aldehídos	-0,355	0,895	-0,242
Thiols	0,190	-0,080	0,955
Acetales	0,895	-0,420	0,121
Norisoprenoides	0,945	-0,079	-0,140
Lactonas	0,513	0,336	0,769
<i>Varianza explicada (%)</i>	<i>32,75</i>	<i>30,37</i>	<i>28,80</i>

En el factor 2 (F2), están representados todas las familias de compuestos que no tienen relación con la influencia del polen. La disminución de algunas de estas familias podría estar relacionada con la formación de ésteres. Podría decirse que se trata de

compuestos intermedios o precursores para la formación de otros y que por lo tanto su concentración puede fluctuar con la dosis de polen. Por lo tanto, F2 podría llamarse factor precursor. En este sentido, en F2 se explican todas las fluctuaciones que ocurren con las familias de compuestos. En algunos casos, se observan familias donde a determinadas dosis de polen, sus concentraciones se encuentran con valores inferiores al testigo. Este comportamiento, posiblemente sea un reflejo del consumo de esos compuestos para formar otros.

El factor 3 (F3), se corresponde con la respuesta del polen sobre el perfil aromático de los vinos. En F3 se incluyen las familias de los compuestos volátiles que presentan incrementos más altos en su concentración con la presencia de polen, no teniendo una correlación con las dosis.

Como se puede observar en la Figura 28, F1 tiende a aumentar con la dosis de polen, llegando a los niveles superiores para las dosis altas (10 y 20 g/L), lo que indica que el efecto de formación de ésteres es el efecto mayoritario, teniendo en cuenta que es una de las familias de compuestos con gran participación en el perfil aromático de los vinos (10,86 – 22,34 %). F2, sitúa el control y la dosis de 0,1 g/L, con comportamientos muy parecidos, mientras que desplaza hacia valores positivos aquellas dosis que generan un aumento en los alcoholes superiores, aldehídos y fenoles, principalmente. Sin embargo, este factor se ve contrarrestado por el peso ejercido por el metanol. Como se ha observado anteriormente, este compuesto presentaba fluctuaciones en su concentración, y eso hace que el F2 no tenga una correlación con la dosis de polen. El factor F3, junto con F1, muestra una tendencia en aumento tanto de los compuestos formados por la presencia de polen como de los cedidos por el polen. Sin embargo, cabría esperar que las dosis altas se hubieran desplazado más hacia valores mayores en F3. Este efecto puede estar explicado por un efecto de sobresaturación de compuestos cedidos del polen a los vinos, sobre todo los terpenos.

Por lo tanto, se podría indicar que el uso del polen en la vinificación con Tintilla de Rota, favorece la producción de compuestos responsables de los aromas afrutados y florales en los vinos.

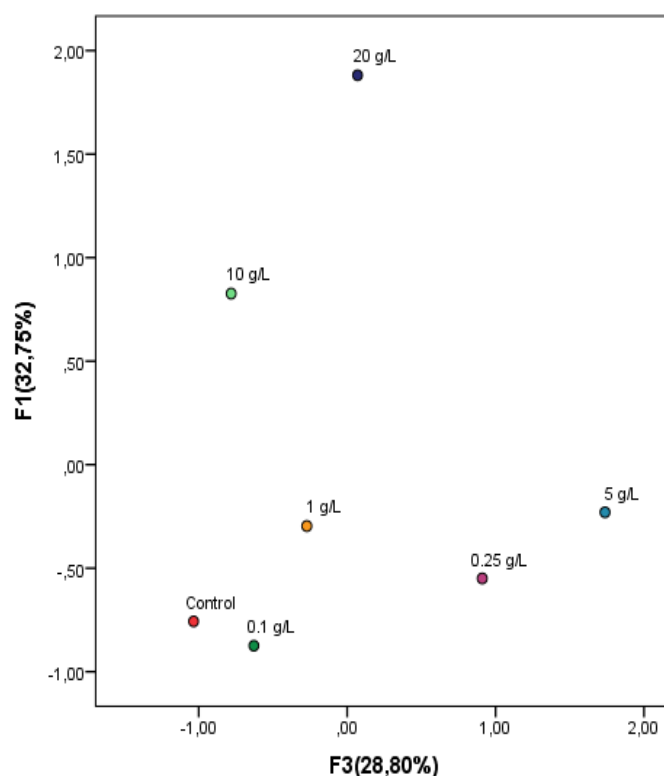


Figura 28. Análisis de componentes principales en vinos de Tintilla de Rota fermentados con diferentes dosis de polen.

4.2.7 Descripción del Valor de la Actividad Odorante (VAO)

En la Tabla 14 se muestran los valores de actividad del aroma (Σ OAV) de todos los compuestos volátiles que participan en el perfil aromático de los vinos. De forma general, se produce un incremento total entre 30,7 – 63,6 % en todos los casos con la dosis de polen, sin presentar correlación alguna. Las series odorantes con mayor peso en el perfil sensorial de los vinos es la serie de aromas afrutados, siendo la que más se incrementa con la dosis de polen (129,35 – 154,61), alcanzando los niveles máximos para las dosis de 0,25 g/L, seguido por 20 g/L y 5 g/L (Tabla 14). La serie floral, alcanza los niveles máximos para las dosis entre 0,25 – 1 g/L, mientras que comienza a disminuir a partir de la dosis de 10 g/L. Los aromas responsables de la serie especiada, se intensifican entre 1 – 10 g/L de polen, con un incremento medio de 58 %. En ambos casos, se observa un comportamiento nuevamente fluctuante con la dosis, un comportamiento ya descrito anteriormente. Los aromas representados en la serie grasa, aumentan ligeramente a partir de 5 g/L, con un incremento medio de 25 % sobre el

ΣOAV_T . La serie responsable de las notas herbáceas, muestra un ligero incremento a partir de la dosis de 1 g/L, producidos por el efecto conjunto de los alcoholes C6, α -terpineol, n-propil alcohol, principalmente.

Tabla 14. Sumatorio de los valores de actividad odorante (ΣOAV) agrupados por series odorantes.

Series odorantes	Dosis de polen en vinos de Tintilla de Rota						
	Control	0,1 g/L	0,25 g/L	1 g/L	5 g/L	10 g/L	20 g/L
Afrutado	93,03	142,21	154,61	134,68	146,87	129,35	151,40
Floral	25,25	31,01	45,26	43,24	40,41	26,58	36,55
Graso	8,50	8,67	8,15	8,46	10,89	10,47	10,69
Herbáceo	1,15	1,15	1,17	1,45	1,42	1,26	1,45
Fruto seco	0,05	0,05	0,06	0,05	0,03	0,03	0,04
Terroso, hongos	0,60	0,61	0,52	0,74	0,78	0,64	0,33
Químico	0,10	0,22	0,13	0,15	0,35	0,29	0,39
Especiado	0,94	1,52	2,17	2,09	1,12	0,75	1,23
Fenólico	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02
ΣOAV_T	129,62	185,45	212,09	190,86	201,89	169,38	202,10

En la Figura 29 se puede observar como a pesar de existir un incremento en las series odorantes “negativas” (graso y herbáceo), la influencia que ejercen sobre el total es muy baja. El mayor peso lo ejercen en todos los casos, las series afrutada, floral y especiada, con valores por encima del 90 % en todos los casos y muy superiores en todos los casos con polen (< 94 %). Este efecto indica, que, a pesar del carácter varietal, el polen favorece la producción de compuestos que mejoran la calidad del perfil aromático de los vinos. Con respecto a las dosis y el testigo, las dosis bajas e intermedia de polen, son las que presentan los niveles máximos del ΣOAV (Fruta, flores, especiada), dado que el incremento de aromas grasos y herbáceos, que se producen durante la vinificación con las dosis altas, hacen disminuir la ratio $\Sigma(\text{Fruta, floral, especiada})/\Sigma(\text{graso, herbáceo})$. Estos resultados demuestran que el uso de dosis bajas de polen multifloral de abeja, favorece la producción de aromas afrutados y florales, aumentando la calidad sensorial varietal en vinos tintos.

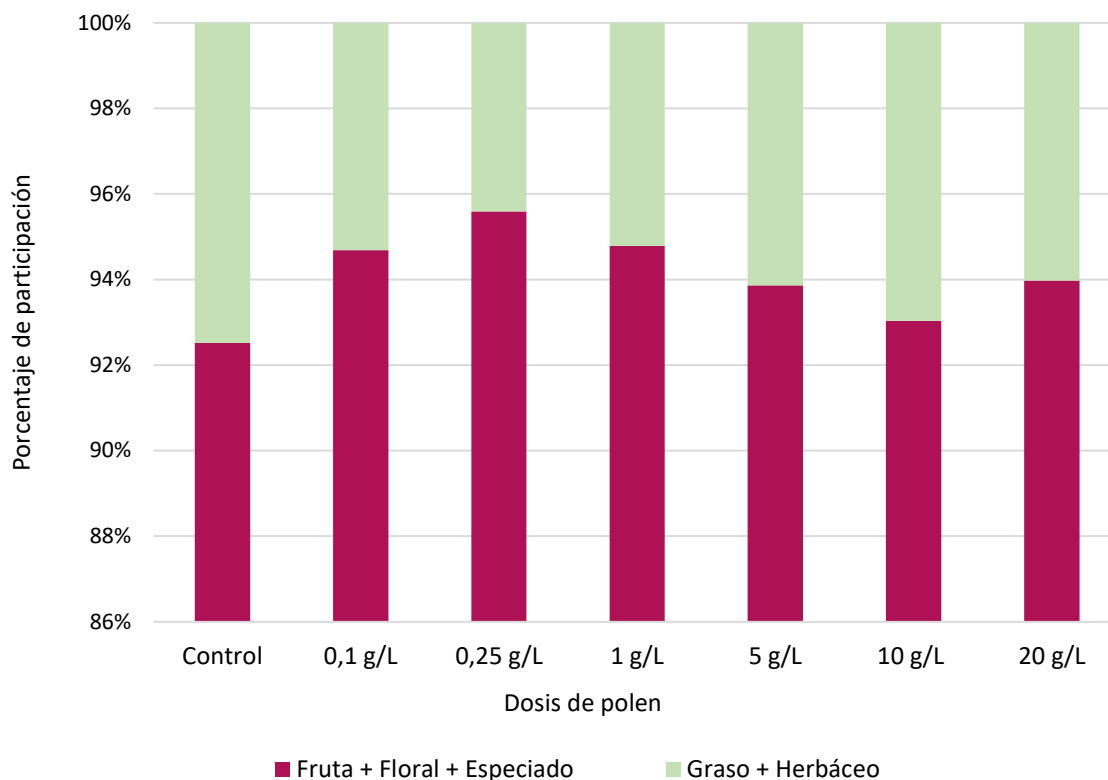


Figura 29. Porcentaje de participación de las series odorantes (afrutada, floral, especiada, grasa y herbácea) en vinos tintos, agrupadas en positivas y negativas.

4.2.8 Evaluación sensorial de los vinos resultantes.

En la Figura 30 se representan los resultados medios obtenidos para los atributos genéricos analizados que mostraron diferencias significativas entre las muestras con polen y el testigo. En todos los casos, las diferencias más significativas encontradas por los catadores con respecto al testigo, son los atributos relacionados con los aromas afrutados, florales, y la sensación de acidez y dulzor en boca. De manera general, las dosis bajas (0,1 y 0,25 g/L), son las mejores puntuadas en cuanto a los atributos olfativos frutal y floral, siendo la mejor valorada la dosis de 0,25 g/L. Sin embargo, se observa que el carácter especiado de los vinos aumenta con las dosis altas de polen de abeja. Este incremento está relacionado con el aumento de fenoles y algunos ésteres, como el vainillato de metilo, pertenecientes a la serie odorante especiada.

De forma global, las dosis 0,25 g/L en primer lugar, seguida por 0,10 g/L son las mejor valoradas de manera significativa por los catadores en relación a los atributos olfativos genéricos, en comparación con el testigo y con las demás dosis. Respecto a la

acidez en boca, todas las dosis obtienen valoraciones más bajas en comparación con el control, salvo la dosis de 0,25 g/L. En cuanto a la sensación de amargor y astringencia en boca, con las dosis altas (de 5 g/L a 20 g/L), disminuyen en comparación con las dosis bajas y el testigo, mientras que para el atributo dulzor en boca aumentan. Este comportamiento se puede asociar al ligero aumento del pH de los vinos, que en boca puede crear la sensación de dulzor (Tabla 11). En relación a las valoraciones totales para los atributos gustativos generales, son las dosis 0,25 g/L y 1 g/L las mejor puntuadas frente a los demás vinos. En este sentido, se podría indicar que la dosis de 0,25 g/L de polen de abeja, es la dosis que obtiene el mejor resultado desde el punto de vista sensorial (olfativo y gustativo) global. No solo se asemeja en comportamiento al testigo en algunos casos, sino que los vinos mejoran sus características organolépticas olfativas, incrementando las notas afrutadas y florales, muy apreciadas por los consumidores en vinos tintos jóvenes (Ferreira et al. 2000).

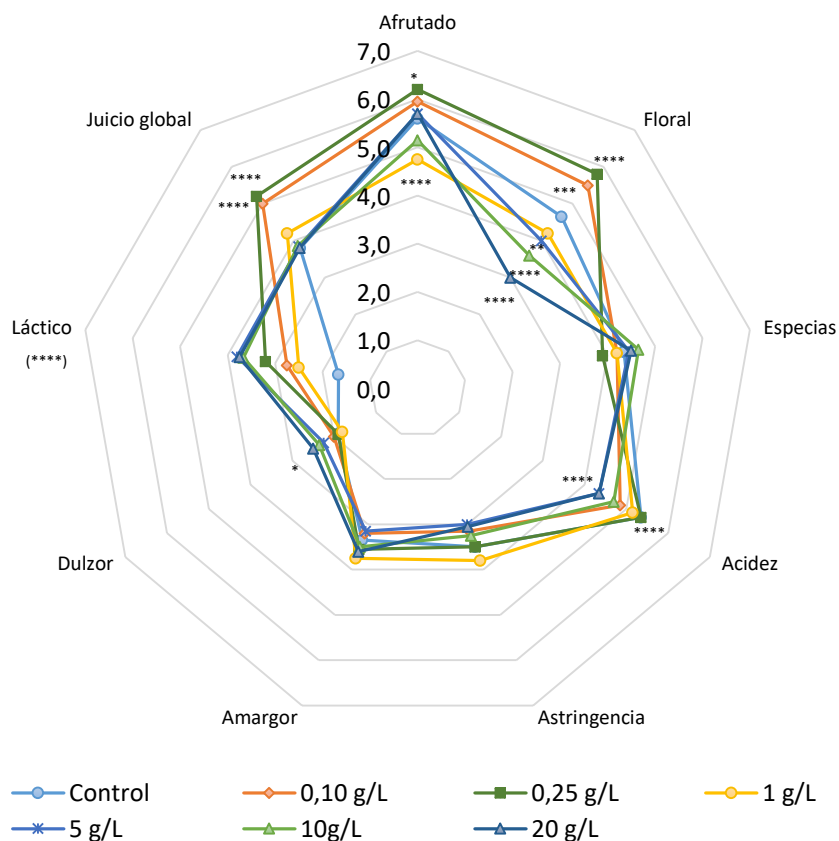


Figura 30. Análisis sensorial de los vinos de Tintilla de Rota, elaborados con diferentes dosis de polen (atributos generales). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$)

Cuando se analizan los atributos olfativos específicos (Figura 31), todos ellos, salvo las notas a flores blancas, muestran diferencias significativas, con respecto al control. Particularmente, podemos indicar, que, en comparación con todas las dosis de polen y el control, las dosis bajas son las mejores puntuadas en los atributos frutas rojas y frutas negras, siendo la más valorada la de 0,25g/L. Sin embargo, la adición de polen reduce ligeramente las notas de frutas blancas en todos los casos, algo que no resulta negativo ya que este atributo no presenta gran interés en los vinos tintos jóvenes. En cuanto a las notas de frutas tropicales, no se observa una tendencia clara con la dosis de polen, al igual que ocurre con las notas cítricas. Sin embargo, para las notas de frutas con hueso y fruta madura o pasificada, las dosis altas de polen son puntuadas significativamente (ANOVA, $p < 0,05$), muy por encima de las dosis bajas y el control. Esta característica denota que las dosis elevadas de polen pueden ejercer ciertas notas de oxidación en los vinos, que sean identificadas por los catadores como fruta madura o pasificada, producidas por algunos ésteres de ácidos grasos generados durante la síntesis o degradación de ciertos ácidos grasos (Li et al. 2008).

Por último, en relación con los aromas a flores (blancas, rojas y azules), no se observa un comportamiento claro asociado con la dosis de polen. Sin embargo, hay que señalar que, para las notas a flores rojas, las dosis bajas e intermedia de polen, obtienen las valoraciones más bajas de forma significativa, en comparación con el control. Mientras que, para las notas de flores azules, son las dosis más altas (10 y 20 g/L), las que presentaron los valores más bajos de forma significativa, frente al control. De igual forma, todas las dosis altas (desde 5 g/L hasta 20 g/L de polen de abeja) son las que muestran mayor intensidad aromática en notas vegetales y microbiológicas. Además, estas dosis presentan una ligera tendencia al aumento de las notas a especias, madera, torrefacto, balsámicas, minerales y animales, en comparación con las dosis bajas, intermedia y el control (Figura 31), teniendo en cuenta que corresponden a valoraciones por debajo de 5 puntos en una escala de 0 a 10 en intensidad aromática. En último lugar, cabe indicar que el atributo químico no presenta una tendencia clara, con puntuaciones bajas, por lo que no se considera un atributo con gran influencia sobre el perfil aromático sensorial de los vinos analizados.

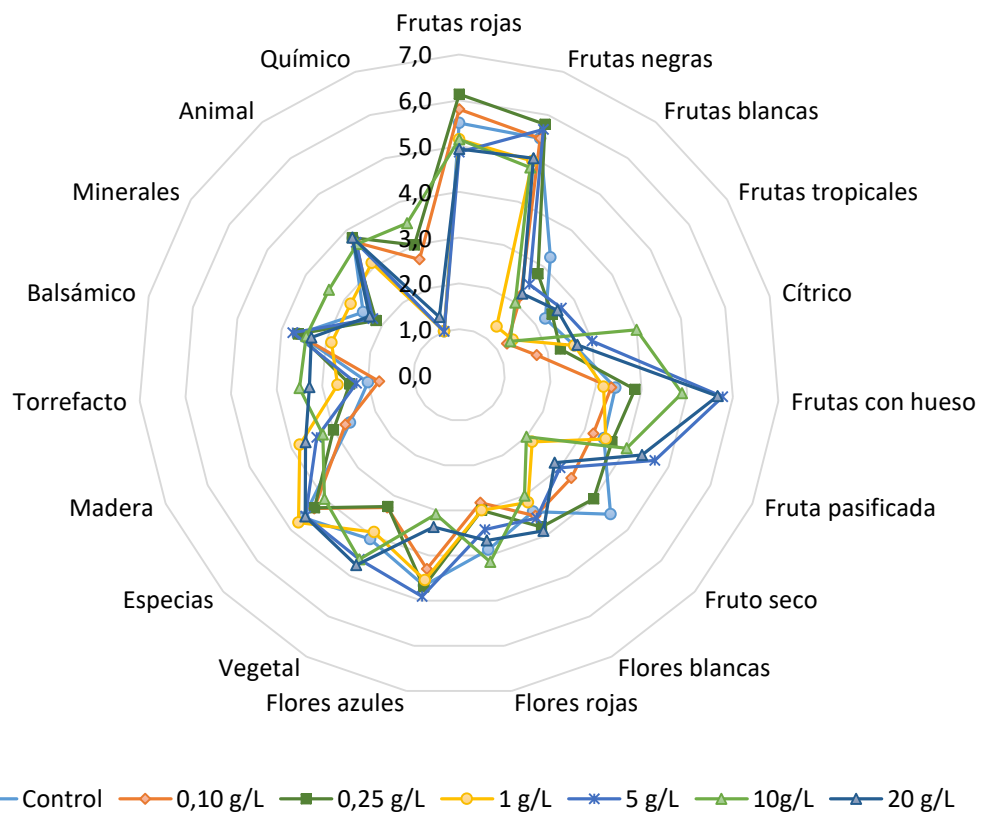


Figura 31. Análisis sensorial de los vinos de Tintilla de Rota, elaborados con diferentes dosis de polen (atributos olfativos específicos).

Validación a escala laboratorio-piloto de los efectos de la adición de polen en la vinificación en blanco y en tinto. Comparación con activadores comerciales

4.3 Validación a escala laboratorio-piloto de los efectos de la adición de polen en la vinificación en blanco y en tinto, en comparación con activadores comerciales.

El siguiente capítulo analiza de forma comparativa los efectos que produce el polen (a la dosis óptima) frente a un activador fermentativo comercial tanto en la vinificación en blanco como en tinto. Para ello, como se ha tratado en los anteriores capítulos, se han estudiado los efectos globales sobre algunos parámetros físico-químicos principales del mosto (NFA y turbidez), la velocidad de fermentación, la biomasa, el NFA, y composición físico-química de los vinos finales, así como su análisis sensorial. En el caso de los experimentos realizados en el ISVV (Francia), solo se han incluido aquellos resultados que fueron obtenidos aplicando los mismos métodos de análisis que los experimentos desarrollados en la Universidad de Cádiz.

4.3.1 Evaluación de los efectos sobre el NFA y la turbidez del mosto

En la Tabla 15 se muestran los resultados comparativos de NFA y turbidez (NTU) entre los mostos blancos (Palomino fino y Riesling) testigo, con polen y activador comercial. Como se puede observar, los contenidos en NFA de los mostos con polen y activador comercial se incrementan de forma significativa con respecto a los vinos testigos. En el caso del Palomino los valores son similares entre polen y comercial, mientras que en los mostos Riesling, los niveles más altos de NFA se obtienen de manera significativa con polen (ANOVA, $p < 0,05$). En los mostos de Palomino fino el NFA se incrementa en torno al 7 % con respecto al testigo, mientras que con el activador comercial este incremento es ligeramente inferior (6,4 %). Para la variedad Riesling, los incrementos son del 10,7 % con el polen y de 8,3 % con el comercial (Figura 32).

En ambos casos, polen y activador comercial, están aportando sustancias coloidales y partículas en suspensión que aumentan los niveles de NTU de los mostos. Estos incrementos son procesos normales asociados al uso de productos enológicos añadidos a los mostos, que durante el proceso de fermentación alcohólica van descendiendo por consumo además de poder ser utilizados por las levaduras como

soportes para mantenerse en flotación durante la fermentación alcohólica (Ribéreau-Gayon et al., 1975; Houtman and Plessis, 1986).

Tabla 15. Parámetros físico-químicos de los mostos de Palomino fino y Riesling.

Variedad	Parámetro	Control	Polen	Comercial
Palomino fino	NFA (mg/L)	140 ± 1	150 ± 1	149 ± 2
	NTU	252,2 ± 10,6	266,7 ± 2,4	292,0 ± 0,5
Riesling	NFA (mg/L)	127 ± 2	141 ± 2	138 ± 1
	NTU	61,4 ± 0,9	88,6 ± 18,5	87,7 ± 2,9

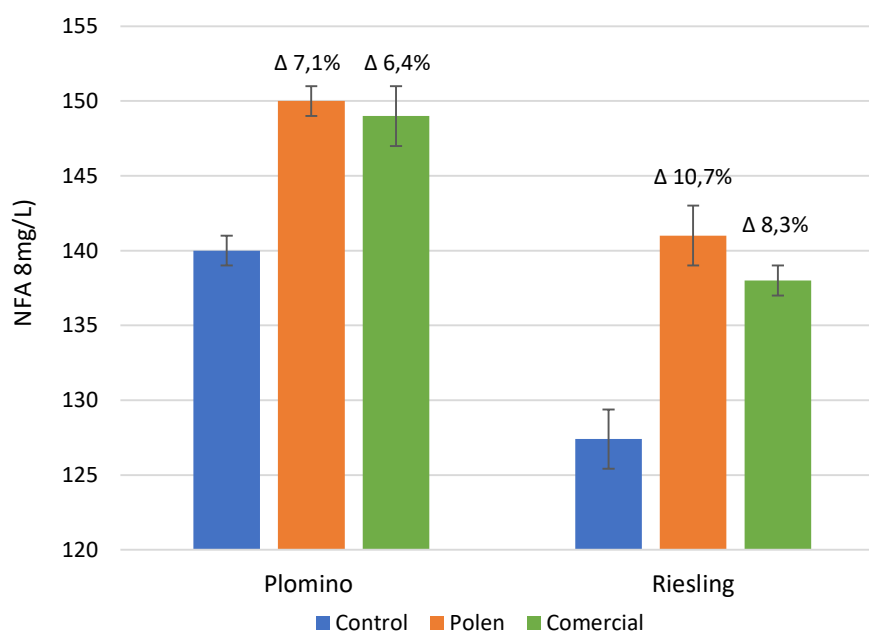


Figura 32. Incrementos en el contenido de NFA de los mostos de uva blanca, Palomino fino y Riesling, con el uso del polen y activador comercial.

En el caso de los mostos de uva tinta, en la Tabla 16 se muestran los valores de NFA, que presentan los mostos de las variedades Tintilla de Rota (España), Cabernet sauvignon (Francia) y Merlot (Francia). En todos los casos, los niveles de NFA alcanzados con polen y activador son significativamente más altos con respecto al testigo. A su vez los valores alcanzados con polen son ligeramente superiores al activador comercial para todas las variedades.

En el caso de Tintilla de Rota, los incrementos de NFA (Δ NFA) con respecto al testigo son de 10,5 % y 8,7 %; en Cabernet sauvignon, 7,6 % y 6,5 %; y en el caso de Merlot, 8,8 % y 7,4 %, para polen y activador comercial, respectivamente (Figura 33). Los mayores incrementos se obtuvieron en los mostos de Tintilla de Rota.

Tabla 16. Contenido en NFA (mg/L) de los mostos de Tintilla de Rota, Cabernet sauvignon y Merlot.

Variedad	Control	Polen	Comercial
Tintilla de Rota	143 ± 2	158 ± 1	155 ± 2
Cabernet s.	185 ± 1	199 ± 1	197 ± 2
Merlot	148 ± 2	161 ± 2	159 ± 1

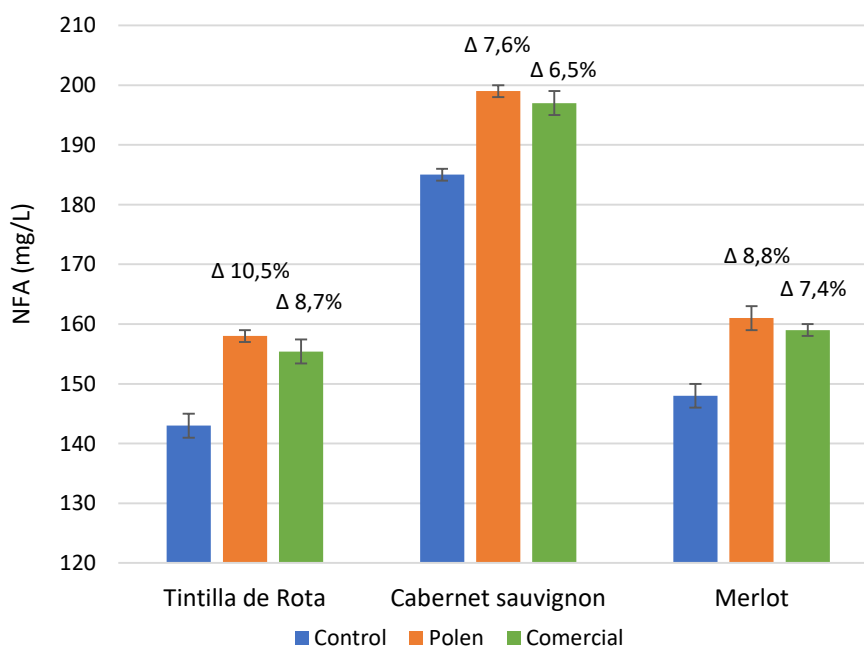


Figura 33. Incrementos en el contenido de NFA de los mostos de uva tinta, Tintilla de Rota, Cabernet sauvignon y Merlot, con el uso del polen y activador comercial.

4.3.2 Influencia sobre la cinética de fermentación alcohólica

Las Figuras 34a y 34b, muestran la evolución de la densidad relativa durante la fermentación alcohólica de los mostos de Palomino fino y Riesling. En ambos casos, no se observan diferencias entre el fermentador control, con polen o activador durante la fase de adaptación de las levaduras en los primeros días (fase de latencia). Sin embargo, todos los mostos de Riesling tienen un período de latencia más largo que los de Palomino fino. Esto se debe a que el mosto de Riesling presenta un NFA inicial (127 mg/L) bastante menor que el mosto de Palomino (140 mg/L), y por ese motivo, las levaduras necesitan más tiempo para adaptarse al medio y poder comenzar la fermentación alcohólica. Sin embargo, una vez las levaduras comienzan la fase exponencial de crecimiento, se ve mucho más claro el efecto activador del polen en el caso del Riesling (Figura 34 b), de manera que a partir del día 3 comienza haber diferencias significativas entre el mosto con polen y el testigo, a partir del día 4 entre el activador comercial y el testigo. En el caso de la Palomino fino, hay que esperar hasta el día 5 para observar diferencias significativas entre los fermentadores suplementados (polen, comercial) y el testigo. A partir de este momento y hasta el final de esta fase (días 10 y 12 en Palomino y Riesling respectivamente), la disminución de la densidad en el tiempo es mayor con el polen para ambas variedades.

En el caso de las variedades tintas (Figura 35), igualmente los testigos y los fermentadores con polen y con activador comercial presentaron comportamientos similares en los primeros días de fase de latencia. Cuando se comparan variedades, de nuevo la que presenta mayor contenido en NFA (Cabernet sauvignon) es la que tiene el menor tiempo de latencia.

Durante el inicio de la fase exponencial o tumultuosa, la Tintilla de Rota (Figura 35c), tiene un comportamiento muy similar en los tres casos. Sin embargo, a partir del día 8, comienza haber una diferencia significativa entre los fermentadores suplementados (polen y activador) y el control. En el caso de la Cabernet sauvignon (Figura 35d) y Merlot (Figura 35e), la evolución es muy parecida en los tres casos. Solo a partir del día 6 en el caso de Cabernet y el día 8 para la Merlot, se alcanzan diferencias significativas entre los niveles del fermentador con polen y el testigo, y a su vez, entre el polen y el activador comercial. El final de fermentación fue muy similar en los tres casos, sin mostrar diferencias acusadas.

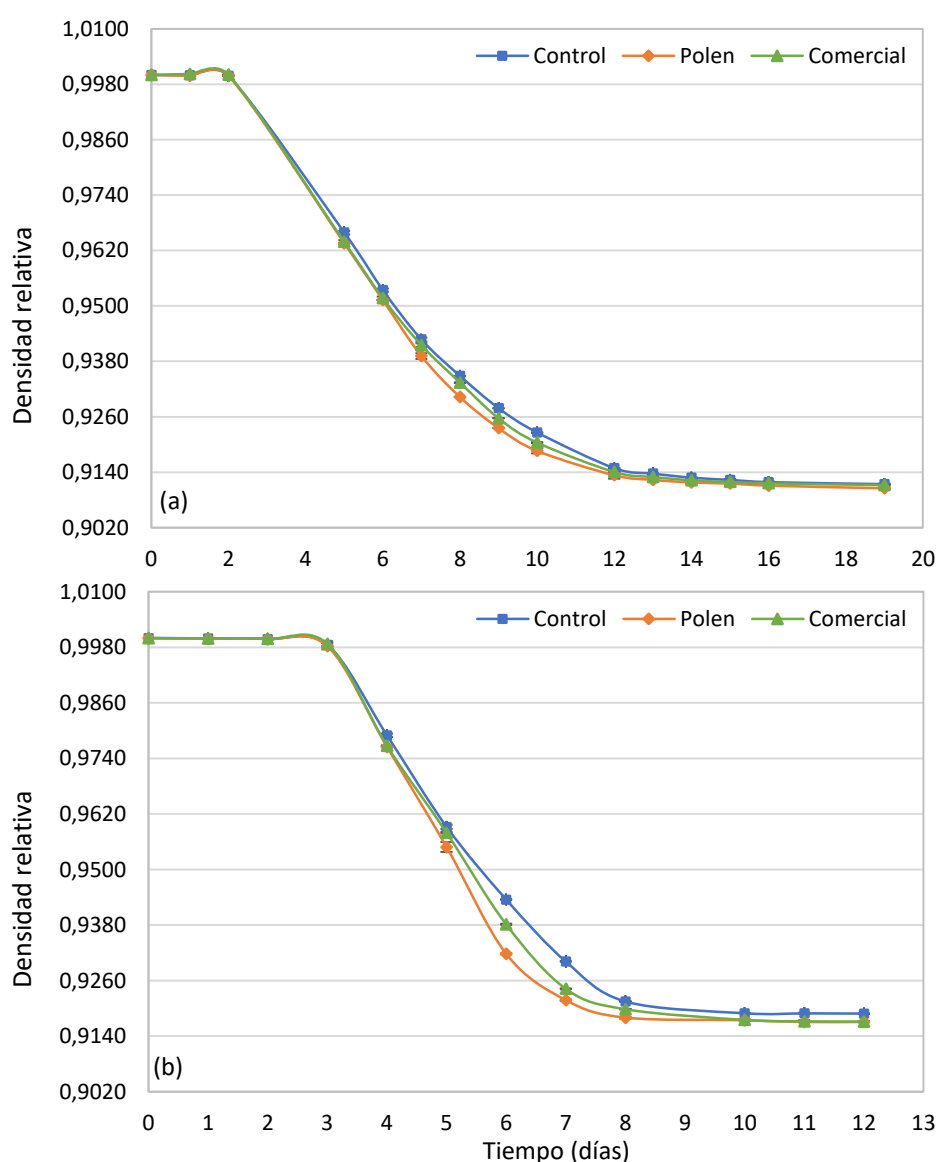


Figura 34. Evolución densidad relativa durante la FA de mostos de Palomino fino (a) y Riesling (b), con el uso de polen frente a un activador comercial.

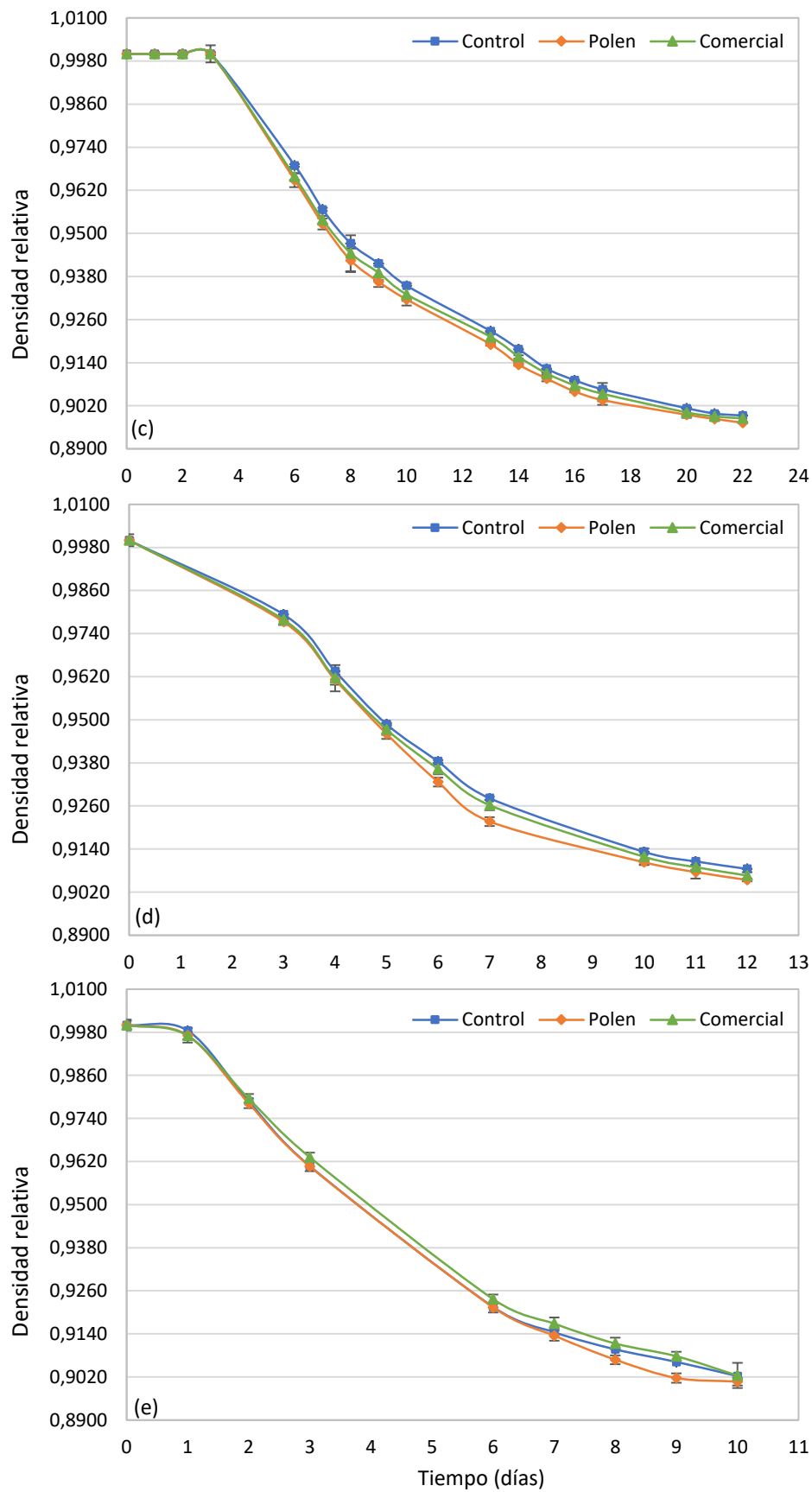


Figura 35. Evolución densidad relativa durante la FA de mostos de Tintilla de Rota (c), Cabernet sauvignon (d) y Merlot (e), con el uso de polen frente a un activador comercial.

Como se puede observar en la Tabla 17, de forma general, la velocidad media durante la fermentación tumultuosa es mayor en todos los casos con el uso de polen, seguido del activador comercial y por último y con una gran diferencia el testigo.

Tabla 17. Velocidad media de consumo (g/mL x día) durante el desarrollo de la fermentación alcohólica en mostos de uva blanca (Palomino fino y Riesling) y tinta (Tintilla de Rota, Cabernet sauvignon y Merlot).

Variedad	Control	Polen	Comercial
Palomino fino	1,08 ± 0,01 ^a	1,16 ± 0,01 ^b	1,11 ± 0,01 ^a
Riesling	1,83 ± 0,01 ^a	2,22 ± 0,02 ^b	2,02 ± 0,01 ^c
Tintilla de Rota	1,06 ± 0,02 ^a	1,15 ± 0,06 ^{b,c}	1,11 ± 0,05 ^c
Cabernet sauvignon	1,36 ± 0,02 ^a	1,49 ± 0,02 ^b	1,39 ± 0,01 ^a
Merlot	1,02 ± 0,01 ^{a,c}	1,08 ± 0,01 ^{b,c}	1,04 ± 0,01 ^c

Diferentes letras en superíndice indican que existen diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$), obtenido mediante ANOVA bidireccional, aplicando la prueba de análisis múltiple de Bonferroni (BSD).

4.3.3 Influencia sobre la cinética de crecimiento de las levaduras durante la fermentación alcohólica

La evolución de la biomasa viable durante el transcurso de la fermentación alcohólica para las variedades Palomino fino, Riesling y Tintilla de Rota, con el uso de polen y un activador comercial, se muestran en la Figura 36. Tal y como se puede observar, en todos los casos, el uso de polen permite alcanzar poblaciones de levaduras más altas durante la fase de crecimiento exponencial. Incluso, se puede observar como los niveles de población de levaduras en los mostos con polen son ligeramente más altos (ANOVA $p < 0,05$) al inicio, durante la fase de latencia. Como ya se ha comentado anteriormente, el polen está aportando nutrientes y factores de crecimiento que ayudan a disminuir el tiempo de adaptación a los mostos (Kotarska et al., 2006; Gutiérrez et al., 2012). Por tanto, el polen favorece el crecimiento de las levaduras en mayor medida que un activador comercial de última generación. En todos los casos con polen, las poblaciones máximas de levaduras alcanzadas son muy superiores al activador comercial, con incrementos del 46,6 % frente a 19,4 %, en Palomino, 58 % y 27,5 %, en

Riesling y 91,5 % y 50,6 %, en Tintilla, para el polen y el activador comercial respectivamente.

Por último, como ya se ha constatado en los apartados anteriores, el polen vuelve a ejercer un papel importante en el final de la fermentación alcohólica. En todos los casos, los vinos con polen presentan, frente al testigo y al activador comercial, una mayor población de levaduras viables en el final de la fermentación (Figura 36). Esto verifica que el polen permite una mayor supervivencia de las levaduras cuando las concentraciones de alcohol son elevadas. Desde el punto de vista enológico, esta propiedad es muy interesante ya que nos podría asegurar la transformación completa de los azúcares en mostos con grados potenciales elevados o con dificultades en el final de fermentación.

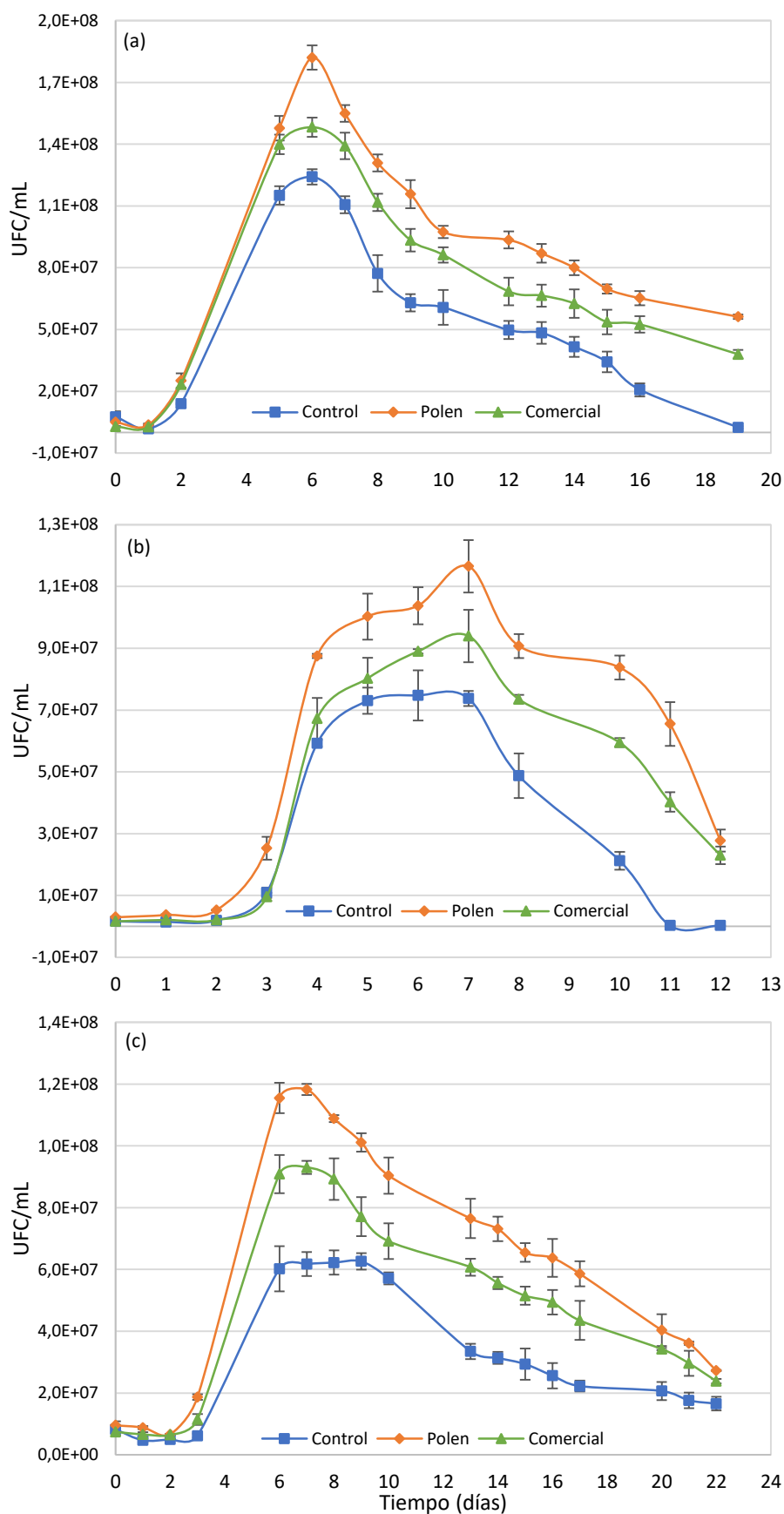


Figura 36. Evolución de la biomasa viable de *Saccharomyces cerevisiae* durante el proceso de fermentación alcohólica de los mostos de Palomino fino (a), Riesling (b) y Tintilla de Rota (c), con el uso de polen frente a un activador comercial.

4.3.4 Influencia sobre la evolución del NFA durante la fermentación alcohólica

La Figura 37 muestra la evolución del NFA durante el desarrollo de la fermentación alcohólica de mostos de Palomino fino, Riesling y Tintilla de Rota testigos, con polen y con activador comercial. Como se puede observar, el comportamiento que presentaron Palomino fino y Riesling fue muy similar al observado con el estudio de diferentes dosis de polen. En Palomino fino, el descenso que se produce en el inicio de la fase exponencial de crecimiento es mayor que en Riesling.

Cabe destacar la evolución de NFA en los mostos de Riesling (Figura 37b). Como se puede observar, durante el período comprendido entre el inicio de la fase de latencia y el inicio de la fase exponencial, se produce un consumo importante de NFA en todos los casos, siendo mucho más acusado el consumo en el testigo y en el activador comercial. En el caso del polen, como ya habíamos observado en el estudio de dosis, el consumo de NFA es bastante menor en este periodo. Este menor consumo de NFA con el polen no se corresponde con los niveles de poblaciones de levaduras alcanzadas durante esta fase, que como vimos (Figura 36b), eran significativamente más altos que en el testigo y el activador comercial. Esto podría indicar, que en los mostos con niveles muy bajos de NFA, el polen esté ejerciendo un papel fundamental como activador fermentativo, aportando otros cofactores de crecimiento además del NFA esenciales para el desarrollo de las levaduras. En ese sentido, cabe pensar que un mosto con contenidos iniciales muy bajos en NFA, presentan generalmente otro tipo de carencias nutricionales, que pueden ser rectificadas de una manera más óptima con el uso del polen. El polen es un buen complemento nutricional en estos casos.

Sin embargo, cuando el mosto presenta inicialmente niveles normales de NFA, como en el caso de la Palomino fino y la Tintilla de Rota, la evolución con el polen es muy parecida al control y al activador comercial. Los consumos de NFA están muy marcados por las poblaciones de levaduras alcanzadas en cada caso (Figuras 36a y 36c).

Por último, cabe destacar de nuevo como para todas las variedades los niveles de NFA aumentan de manera significativa cuando se emplea polen. Esto lo habíamos constatado tanto en la vinificación en blanco como en tinto y se vuelve a verificar en estos ensayos. Estos aumentos en NFA pueden estar promovidos por diversas causas, como ya vimos, el propio polen tiene en su estructura, un remanente de nutrientes que se van liberando de forma progresiva durante la fermentación alcohólica, sobre todo en los finales de fermentación que es cuando más alcohol hay en el medio. Probablemente el alcohol generado durante la fermentación puede actuar solubilizando el NFA y otros nutrientes del polen. También pueden contribuir al NFA, el aporte debido a la lisis celular de las levaduras al final de la fermentación. Todos los compuestos nitrogenados que forman parte de las membranas, como los aminoácidos, se pueden solubilizar al mosto.

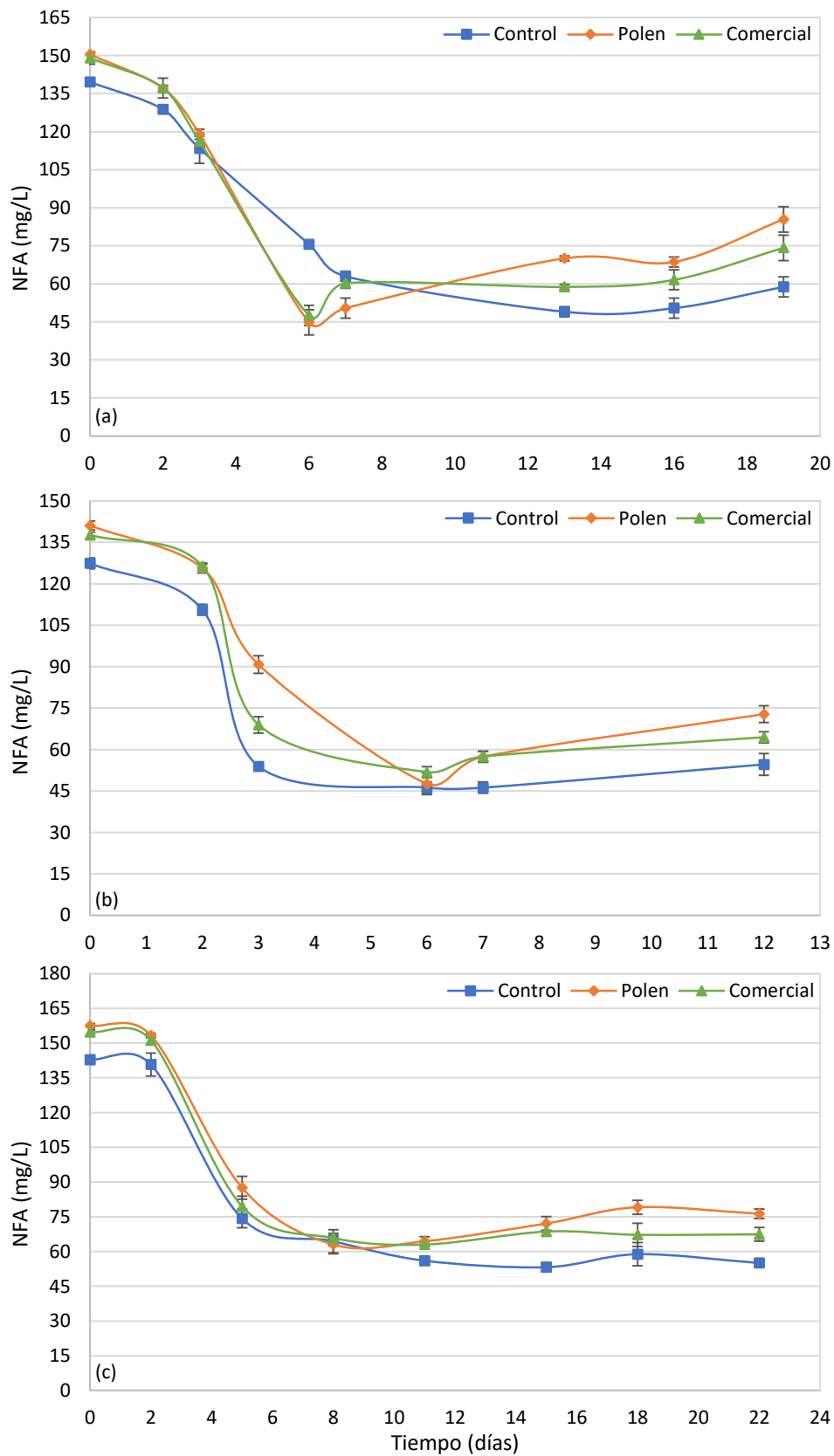


Figura 37. Evolución del NFA durante la fermentación alcohólica de mostos de Palomino fino (a), Riesling (b) y Tintilla de Rota (c), con el uso de polen frente a activador comercial.

4.3.5 Influencia sobre el contenido en ácido málico durante la FML

En la Figura 38 se muestra la evolución del contenido en ácido málico durante la FML de los vinos de Tintilla de Rota (Figura 38a) y los vinos de Cabernet sauvignon y Merlot (Figura 38b). En primer lugar, es necesario indicar, que el contenido en ácido málico inicial depende de muchos factores como la variedad o el grado de maduración, entre otros (Boulton, 1980; Lamikanra et al., 1995; Boulton et al., 2002). En este sentido, la variedad Tintilla de Rota presenta un contenido inicial de ácido málico bajo (< 1 g/L), mientras que en Cabernet sauvignon y Merlot partieron de contenidos superiores (3,68 y 2,70 g/L, respectivamente). Durante el desarrollo de la FML en Tintilla de Rota, podemos observar que la presencia de polen aumenta la velocidad de consumo de málico con respecto al activador comercial y de manera más notable en relación al testigo. Como consecuencia de esto, los niveles de ácido málico alcanzados con el polen son significativamente más bajos, en comparación con el testigo y el activador comercial.

Respecto al desarrollo de la FML en Cabernet sauvignon y Merlot, en ambos casos se observó un comportamiento similar entre el uso del polen y el activador comercial, sobre todo en la Cabernet. Como se puede observar, los vinos con polen y activador comercial presentaron descensos más acusados en el contenido en ácido málico, en comparación con el testigo (Figura 38b). Sin embargo, en el caso de Merlot, el comportamiento es más similar al de la Tintilla de Rota. Durante el desarrollo de la FML, los incrementos de consumo de ácido málico con polen son siempre ligeramente mayores que en el activador comercial. Por lo tanto, se vuelve a verificar que el polen puede actuar en muchos casos mejorando la cinética de la fermentación maloláctica.

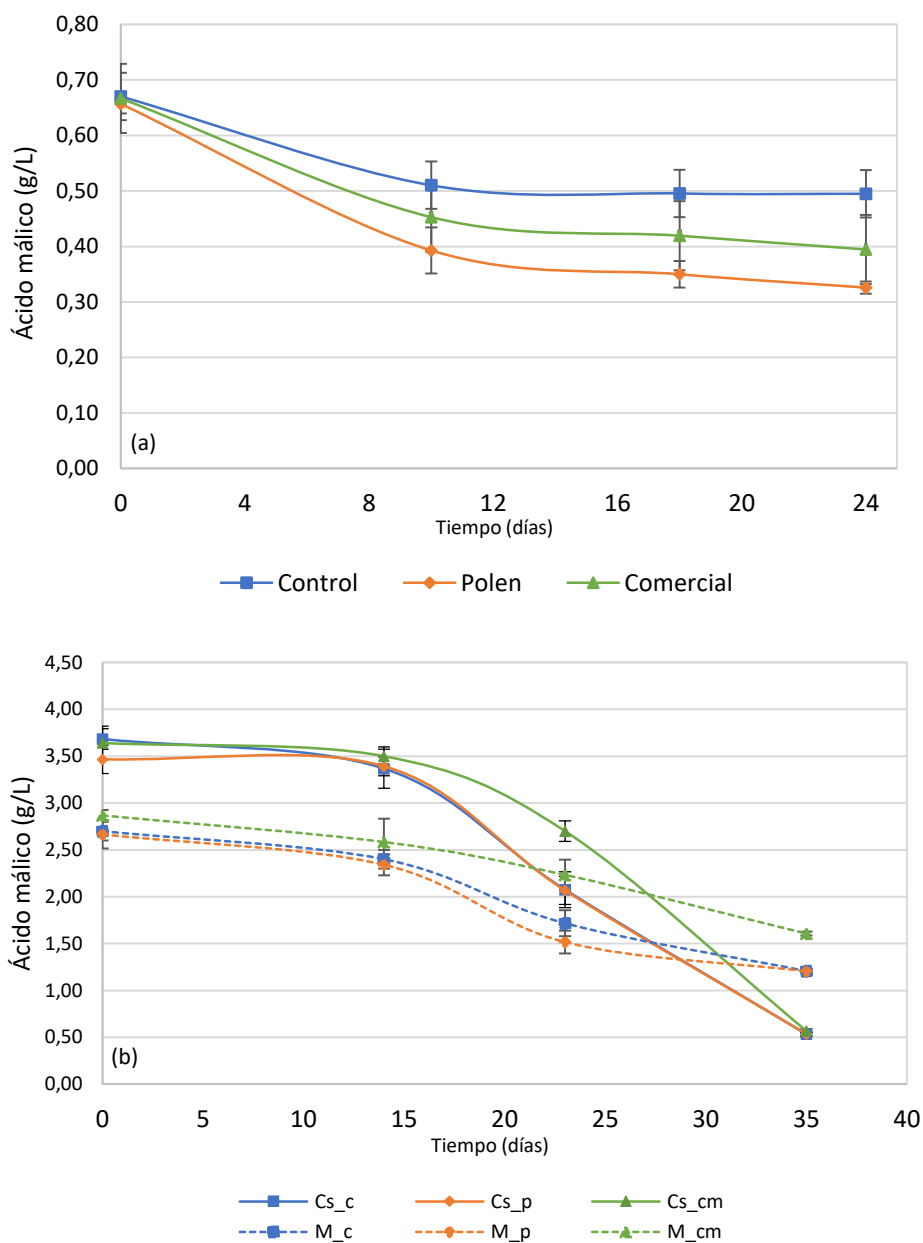


Figura 38. Evolución del contenido en ácido málico durante la FML de los vinos tintos de Tintilla de Rota (a), Cabernet sauvignon (b) y Merlot (b), con el uso de polen frente a un activador comercial.

4.3.6 Evaluación de los efectos sobre las propiedades físico-químicas y los parámetros de color de los vinos finales.

En las Tablas 18 y 19 se muestran los resultados obtenidos para los parámetros físico-químicos y de color de los vinos blancos elaborados con las variedades Palomino fino y Rielsing (testigos, polen y activador comercial). Como era de esperar, el uso del polen no modifica los contenidos en alcohol (% v/v), pH y acidez total de los vinos. Para ambas variedades, tanto el polen como el activador comercial, disminuyen

significativamente la acidez volátil en comparación con el testigo. Como se muestra en ambas tablas, la fermentación alcohólica se desarrolla sin ningún problema, llegándose a valores de azúcar residual (glucosa + fructosa) inferiores a 1 g/L en todos los vinos. Igualmente, los parámetros de color en los vinos de Palomino fino, no se vieron alterados debido al uso de polen. Solo se observan un ligero incremento en la intensidad de color y Abs 420 nm, teniendo en cuenta que en todos los casos los resultados para estos parámetros fueron muy bajos.

En el caso de los vinos tintos, al igual que en blancos, no se observan cambios significativos en el contenido en alcohol, el pH y la acidez total con el uso de polen o activador comercial (Tablas 20, 21 y 22). En todos los casos, la acidez volátil es más baja con polen y activador comercial, a excepción del caso puntual de los vinos de Merlot con activador comercial. Respecto al contenido en azúcar residual, es necesario indicar que, por motivos de calendario, los vinos elaborados con Cabernet sauvignon y Merlot no se dejaron fermentar durante más tiempo, antes de comenzar la FML y por ello su contenido es mayor que en Tintilla de Rota. No obstante, los resultados indican que los niveles estaban por debajo de los 2 g/L. Respecto al contenido de polifenoles (antocianos y taninos) y el IPT, sus valores permanecen constantes en los diferentes tipos de vinificación (control, polen y activador comercial) para las tres variedades. Solamente, se observa un ligero aumento en los valores de IPT en Tintilla con polen, posiblemente debido a su propia composición. Mientras que, en los vinos de Merlot elaborados con polen y activador comercial, se observa un ligero incremento en los taninos totales, posiblemente asociado a pequeñas diferencias en la manipulación de los mostos durante la fermentación alcohólica.

Respecto a los parámetros de color, solo se observa un ligero incremento en la componente amarilla b^* (amarillo-azul) en el caso de los vinos de Tintilla de Rota y Cabernet sauvignon con polen, en comparación con el testigo y el comercial. Mientras que por el contrario en la Merlot con polen se observa un desplazamiento hacia la componente azul. Como se esperaba, el resto de parámetros no se vieron modificados por el polen a dosis bajas ni por el activador comercial.

De forma general, se puede decir que, desde el punto de vista enológico, las pequeñas modificaciones observadas en los vinos no suponen cambios sustanciales sobre sus propiedades fisicoquímicas y, por lo tanto, no afectan negativamente a su calidad.

Tabla 18. Composición físico-química de los vinos de Palomino fino con polen frente a activador comercial.

Parámetros	Control	Polen	Comercial
% Alcohol v/v	12,64 ± 0,24 ^a	12,54 ± 0,13 ^a	12,53 ± 0,17 ^a
pH	3,19 ± 0,02 ^a	3,21 ± 0,01 ^a	3,18 ± 0,05 ^a
Acidez total (g/L)	4,87 ± 0,08 ^a	4,92 ± 0,05 ^a	4,99 ± 0,08 ^a
Acidez volátil (g/L)	0,22 ± 0,01 ^a	0,19 ± 0,01 ^b	0,17 ± 0,01 ^a
Glucosa + Fructosa (g/L)	0,23 ± 0,03 ^a	0,17 ± 0,01 ^b	0,27 ± 0,02 ^c
L*	98,90 ± 0,10 ^a	98,80 ± 0,12 ^a	98,66 ± 0,03 ^a
a*	-1,16 ± 0,04 ^a	-1,23 ± 0,05 ^a	-1,24 ± 0,03 ^a
b*	6,14 ± 0,40 ^a	6,27 ± 0,14 ^a	6,47 ± 0,01 ^a
H*	95,44 ± 7,75 ^a	101,09 ± 0,17 ^a	100,87 ± 0,03 ^a
C*	6,33 ± 0,51 ^a	6,39 ± 0,15 ^a	6,58 ± 0,01 ^a
Intensidad de color (IC)	0,118 ± 0,004 ^a	0,125 ± 0,003 ^{a,b}	0,128 ± 0,001 ^b
Abs. 420	0,096 ± 0,003 ^a	0,102 ± 0,002 ^{a,b}	0,105 ± 0,001 ^b

Diferentes letras en superíndice indican que existen diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$), obtenido mediante ANOVA bidireccional, aplicando la prueba de análisis múltiple de Bonferroni (BSD).

Tabla 19. Composición físico-química de los vinos de Riesling con polen frente a activador comercial.

Parámetros	Control	Polen	Comercial
% Alcohol v/v	10,74 ± 0,04 ^a	10,73 ± 0,12 ^a	10,68 ± 0,04 ^a
pH	3,40 ± 0,01 ^a	3,39 ± 0,01 ^a	3,39 ± 0,01 ^a
Acidez total (g/L)	4,31 ± 0,01 ^a	4,21 ± 0,25 ^a	4,57 ± 0,18 ^a
Acidez volátil (g/L)	0,21 ± 0,01 ^a	0,18 ± 0,02 ^{b,c}	0,17 ± 0,02 ^c
Glucosa + Fructosa (g/L)	0,15 ± 0,02 ^a	0,13 ± 0,01 ^{b,c}	0,13 ± 0,02 ^c
L*	99,90 ± 0,12 ^a	99,46 ± 0,11 ^a	99,48 ± 0,01 ^a
a*	-3,59 ± 0,10 ^a	-3,12 ± 0,01 ^b	-2,39 ± 0,02 ^c
b*	6,06 ± 0,10 ^{a,b}	6,21 ± 0,35 ^a	5,54 ± 0,12 ^b
H*	120,65 ± 1,16 ^a	116,58 ± 2,29 ^a	115,53 ± 3,79 ^a
C*	7,05 ± 0,04 ^a	6,95 ± 0,53 ^a	6,71 ± 0,86 ^a
Intensidad de color	0,073 ± 0,006 ^a	0,088 ± 0,004 ^{b,c}	0,085 ± 0,005 ^c
Abs. 420	0,075 ± 0,003 ^a	0,082 ± 0,003 ^a	0,081 ± 0,007 ^a

Diferentes letras en superíndice indican que existen diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$), obtenido mediante ANOVA bidireccional, aplicando la prueba de análisis múltiple de Bonferroni (BSD).

Tabla 20. Composición físico-química de los vinos de Tintilla de Rota con polen frente a activador comercial.

Parámetros	Control	Polen	Comercial
% Alcohol v/v	14,68 ± 0,24 ^a	14,94 ± 0,14 ^a	14,90 ± 0,24 ^a
pH	3,61 ± 0,05 ^a	3,61 ± 0,04 ^a	3,65 ± 0,03 ^a
Acidez total (g/L)	5,60 ± 0,30 ^a	5,88 ± 0,04 ^a	5,53 ± 0,16 ^a
Acidez volátil (g/L)	0,42 ± 0,04 ^a	0,39 ± 0,01 ^a	0,36 ± 0,04 ^b
Glucosa + Fructosa (g/L)	0,23 ± 0,01 ^a	0,17 ± 0,01 ^b	0,27 ± 0,02 ^c
Antocianos (mg/L)	740,03 ± 10,14 ^a	737,84 ± 9,24 ^a	724,94 ± 11,27 ^a
Taninos (g/L)	2,29 ± 0,04 ^a	2,23 ± 0,07 ^a	2,27 ± 0,08 ^a
IPT	75,70 ± 1,50 ^{a,c}	82,49 ± 1,48 ^{b,c}	79,68 ± 3,06 ^c
L*	76,08 ± 0,32 ^a	76,33 ± 0,03 ^a	76,18 ± 0,22 ^a
a*	11,12 ± 0,48 ^a	11,70 ± 0,30 ^a	10,92 ± 0,29 ^a
b*	3,54 ± 0,17 ^a	3,85 ± 0,26 ^b	3,47 ± 0,13 ^a
Tonalidad (N)	0,997 ± 0,001 ^a	0,996 ± 0,005 ^a	0,992 ± 0,007 ^a
Intensidad Colorante (IC)	0,821 ± 0,011 ^a	0,818 ± 0,011 ^a	0,825 ± 0,006 ^a

Diferentes letras en superíndice indican que existen diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$), obtenido mediante ANOVA bidireccional, aplicando la prueba de análisis múltiple de Bonferroni (BSD).

Tabla 21. Composición físico-química de los vinos de Cabernet sauvignon con polen frente a activador comercial.

Parámetros	Control	Polen	Comercial
% Alcohol v/v	12,42 ± 0,39 ^a	13,31 ± 0,13 ^a	12,86 ± 0,39 ^a
pH	3,98 ± 0,04 ^a	3,96 ± 0,02 ^a	3,96 ± 0,04 ^a
Acidez total (g/L)	5,30 ± 0,20 ^a	5,30 ± 0,20 ^a	5,10 ± 0,20 ^a
Acidez volátil (g/L)	0,30 ± 0,02 ^a	0,16 ± 0,02 ^b	0,16 ± 0,02 ^b
Glucosa + Fructosa (g/L)	1,40 ± 0,30 ^a	1,00 ± 0,10 ^b	1,20 ± 0,20 ^c
Antocianos (mg/L)	832,71 ± 20,82 ^a	864,50 ± 12,71 ^a	907,96 ± 10,10 ^a
Taninos (g/L)	2,11 ± 0,11 ^a	2,33 ± 0,06 ^a	2,36 ± 0,09 ^a
IPT	53,28 ± 1,41 ^a	56,53 ± 1,02 ^a	55,85 ± 0,28 ^a
L*	52,43 ± 1,10 ^a	51,82 ± 3,58 ^a	51,51 ± 1,83 ^a
a*	48,85 ± 1,20 ^a	49,70 ± 1,34 ^a	52,11 ± 1,74 ^a
b*	-2,15 ± 0,14 ^a	-2,05 ± 0,12 ^a	-2,71 ± 0,12 ^b
Tonalidad (N)	0,757 ± 0,010 ^a	0,708 ± 0,020 ^a	0,679 ± 0,020 ^a
Intensidad Colorante (IC)	1,304 ± 0,030 ^a	1,319 ± 0,020 ^a	1,356 ± 0,012 ^a

Diferentes letras en superíndice indican que existen diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$), obtenido mediante ANOVA bidireccional, aplicando la prueba de análisis múltiple de Bonferroni (BSD).

Tabla 22. Composición físico-química de los vinos de Merlot con polen frente a activador comercial.

Parámetros	Control	Polen	Comercial
% Alcohol v/v	14,18 ± 0,12 ^a	14,09 ± 0,24 ^a	14,35 ± 0,19 ^a
pH	3,67 ± 0,05 ^a	3,71 ± 0,04 ^a	3,71 ± 0,06 ^a
Acidez total (g/L)	5,90 ± 0,20 ^a	5,80 ± 0,20 ^a	5,90 ± 0,40 ^a
Acidez volátil (g/L)	0,13 ± 0,01 ^a	0,10 ± 0,01 ^b	0,14 ± 0,02 ^a
Glucosa + Fructosa (g/L)	1,90 ± 0,02 ^a	1,70 ± 0,04 ^b	1,30 ± 0,17 ^c
Antocianos (mg/L)	731,91 ± 4,33 ^a	733,25 ± 21,04 ^a	747,83 ± 25,40 ^a
Taninos (g/L)	1,84 ± 0,14 ^a	1,94 ± 0,11 ^a	2,27 ± 0,16 ^b
IPT	53,30 ± 1,47 ^a	53,48 ± 1,05 ^a	54,75 ± 1,98 ^a
L*	65,25 ± 0,78 ^a	65,99 ± 2,47 ^a	64,17 ± 0,51 ^a
a*	35,28 ± 2,59 ^a	34,14 ± 2,72 ^a	35,23 ± 1,21 ^a
b*	-0,29 ± 0,64 ^a	-0,42 ± 0,55 ^b	-0,58 ± 0,39 ^c
Tonalidad (N)	0,629 ± 0,010 ^a	0,632 ± 0,020 ^a	0,624 ± 0,016 ^a
Intensidad Colorante (IC)	1,275 ± 0,126 ^a	1,259 ± 0,035 ^a	1,308 ± 0,090 ^a

Diferentes letras en superíndice indican que existen diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$), obtenido mediante ANOVA bidireccional, aplicando la prueba de análisis múltiple de Bonferroni (BSD).

4.3.7 Evaluación de los efectos sobre los compuestos volátiles del vino y sus correspondientes VAO.

4.3.7.1 Influencia de la dosis de polen sobre los compuestos volátiles

En las Tablas 23, 24 y 25 se muestra el efecto de la adición de polen y el activador comercial, sobre el perfil de las familias de los compuestos volátiles de los vinos de Palomino, Riesling y Tintilla de Rota respectivamente. De forma global, se puede observar que el uso de polen conlleva un aumento significativo en el contenido total de compuestos volátiles, con un incremento respecto al testigo del 3, 4, y 12 % en los vinos de Palomino, Riesling y Tintilla de Rota. Sin embargo, con el uso del activador comercial, se produce un descenso acusado en la producción de compuestos volátiles en los vinos de Palomino fino y Riesling del orden de un 11 y 22 % (Tablas 23 y 24). Mientras que con la Tintilla de Rota los valores se mantienen en los mismos niveles que el testigo. Hagamos a continuación un análisis por familia de compuestos.

Como se puede observar, los niveles alcohólicos superiores tanto en los vinos blancos como en el tinto aumentan con el uso del polen, en comparación con el testigo y el activador comercial. La razón se debe, como habíamos visto en los estudios de las dosis, al incremento de los alcohólicos isoamílicos en el caso del Palomino fino y por el 2-propanol y los alcohólicos isoamílicos en la Riesling (Anexo. Tablas 34 y 35). En el caso de la Tintilla los alcohólicos superiores se incrementaron significativamente en proporciones similares a las observadas en el estudio con diferentes dosis (Tabla 12), salvo en el caso del isobutanol, que presentó la menor concentración (Anexo. Tabla 36).

Como era de esperar, las variaciones en el contenido en metanol, se corresponden con lo observado en el estudio de las dosis. En el caso del Palomino fino, el metanol se incrementa ligeramente (0,15 %) con respecto al testigo, mientras que con el activador se produce un descenso en su producción. En los vinos de Riesling, tanto con el polen como con el activador comercial, se observa un descenso significativo en la concentración de metanol. En el caso de la Tintilla de Rota, el metanol disminuye tanto en el caso del polen como con el activador comercial, con respecto al testigo, siendo más acusado y significativo este descenso en el caso del polen.

El contenido en ácidos volátiles desciende en los vinos con polen, tanto en Palomino, Riesling como en Tintilla de Rota, debido a la riqueza del polen en ácidos grasos (Tabla 25). Sin embargo, el comportamiento de los vinos con activador comercial es diferente para las dos variedades blancas. En Palomino se observa un descenso, mientras que en Riesling se incrementa de forma significativa (Anexo. Tablas 34 y 35). En el caso de la Tintilla, la disminución en el contenido en ácidos se debe principalmente a a los ácidos hexanoico, octanoico y decanoico (Anexo. Tabla 36). Esta disminución general con el uso del polen favorece el perfil aromático de los vinos, ya que la mayor parte de los compuestos de esta familia, presentan aromas dentro de las series grasas y rancias, pudiendo afectar negativamente a la calidad aromática de los vinos.

El comportamiento de los alcoholes C6 se corresponde a lo observado en los estudios con barridos de dosis con polen. En Palomino fino, la producción de los alcoholes C6 disminuyen con respecto al testigo en un 47,08 % en el caso del polen y un 25,85 % con el activador comercial, debido principalmente al 1-hexanol (Anexo. Tabla 34). Mientras que, por el contrario, en Riesling, esta familia de compuestos se incrementa en un 47,30 % y 21,07 % con el polen y el activador comercial, en relación al testigo (Anexo. Tabla 34). En el caso de la Tintilla, los niveles de alcoholes C6 disminuyen significativamente con el uso del polen, aunque en este caso el activador comercial se produce un mayor descenso con respecto al testigo.

Por otra parte, los alcoholes disminuyen significativamente con respecto al control, tanto en los vinos con polen como con el activador comercial, siendo más acusado el descenso con este último. Los principales compuestos responsables de esta disminución en los vinos con polen son fundamentalmente el 1-pentanol y 1H-Indole-3-ethanol para todas las variedades (Tablas 23, 24 y 25). Mientras que con el activador comercial son el 1-pentanol en Palomino fino y el alcohol feniletílico en los vinos de Riesling (Anexo. Tablas 34 y 35). En el caso de la Tintilla de Rota, la disminución en los alcoholes se debe a 1-pentanol y 1H-Indole-3-ethanol (Anexo. Tabla 36).

Respecto al contenido en terpenos, se observa claramente que sus niveles aumentan significativamente en todos los vinos con el uso de polen, lo que corrobora y verifica la capacidad del polen para ceder esta familia de compuestos al vino.

En cuanto a los esteres, como se puede observar, todos los vinos de Palomino, Riesling y Tintilla de Rota, experimentan un incremento significativo de sus contenidos en ésteres, llegando a multiplicar diez veces los valores obtenidos en los vinos testigos de cada variedad. Para Palomino y Riesling el polen produce más esteres que el activador comercial, mientras que en Riesling los valores se asemejan entre ellos. Por tanto, los resultados verifican el hecho de que polen contribuye de manera significativa a la síntesis y formación de esteres, contribuyendo a intensificar las series aromáticas afrutadas y florales de los vinos.

En el caso de los aldehídos, cabía esperar un incremento en los vinos blancos, como ocurrió en el estudio con las diferentes dosis. Sin embargo, solo se observa este incremento en el caso de los vinos de Riesling, mientras que en Palomino disminuye tanto con el polen como con el activador comercial. En todo caso, los niveles en aldehídos alcanzados para los vinos de ambas variedades son muy bajos. En el caso de la Tintilla de Rota, al igual que ocurrió en los vinos blancos de Palomino fino (Tabla 23), los aldehídos descendieron significativamente en todos los vinos, con polen y con activador comercial, en comparación con el testigo, principalmente por descensos acusados en acetaldehído (Anexo. Tabla 36). Sin embargo, se incrementan los niveles de bencenoacetaldehído, nonanal y 3-metilbutanal, con respecto a los vinos testigo.

En cuanto al contenido en fenoles, solo detectados en la Tintilla de Rota, presenta un comportamiento contrario entre los vinos con polen y con el activador comercial. Tal como se esperaba, el polen incrementa en más de un 26 % los niveles de fenoles del testigo y el activador comercial. Estos compuestos pueden potenciar el carácter especiado de los vinos. Dentro de las familias de compuestos minoritarias, detectados también en la Tintilla de Rota, representados por los tioles, acetales y norisoprenoides, se observa que tanto el polen como el activador comercial potencia su formación sobre todo de los tioles y norisoprenoides.

Tabla 23. Familia de compuestos volátiles vinos de Palomino fino, elaborados con polen y activador comercial.

Familia volátiles	Control	Polen	Comercial
Alcoholes superiores	725617 ± 15892 ^a	782743 ± 16705 ^b	672459 ± 7564 ^a
Metanol	38823 ± 1480 ^a	38881 ± 1690 ^a	38432 ± 720 ^a
Acidos	6072 ± 359 ^a	3213 ± 55 ^b	4442 ± 87 ^c
Alcoholes C-6	824 ± 72 ^a	717 ± 7 ^b	749 ± 14 ^b
Alcoholes	6943 ± 448 ^a	4098 ± 219 ^{b,c}	3708 ± 35 ^c
Terpenoides	106 ± 4 ^a	137 ± 9 ^b	107 ± 6 ^a
Ésteres	1247 ± 147 ^a	13666 ± 133 ^b	10039 ± 421 ^c
Aldehídos	62590 ± 3141 ^a	24305 ± 981 ^b	15394 ± 201 ^c
Total	842220 ± 21543^a	867759 ± 19800^a	745330 ± 9047^b

Diferentes letras en superíndice indican que existen diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$), obtenido mediante ANOVA bidireccional, aplicando la prueba de análisis múltiple de Bonferroni (BSD).

Tabla 24. Familia de compuestos volátiles vinos de Riesling, elaborados con polen y activador comercial.

Familia volátiles	Control	Polen	Comercial
Alcoholes superiores	642050 ± 12290 ^a	655000 ± 31635 ^a	476288 ± 17913 ^b
Metanol	19624 ± 920 ^a	15774 ± 410 ^{b,c}	15498 ± 760 ^c
Acidos	4581 ± 273 ^a	3366 ± 238 ^b	5166 ± 432 ^c
Alcoholes C-6	474 ± 14 ^a	698 ± 14 ^b	574 ± 8 ^c
Alcoholes	6445 ± 280 ^a	2792 ± 161 ^{b,c}	2691 ± 91 ^c
Terpenoides	107 ± 2 ^a	193 ± 7 ^b	145 ± 8 ^c
Ésteres	1646 ± 624 ^a	15921 ± 477 ^{b,c}	16199 ± 263 ^c
Aldehídos	25703 ± 1360 ^a	39538 ± 1411 ^b	27998 ± 1282 ^a
Total	700630 ± 15763^a	733281 ± 34353^a	544558 ± 20758^b

Diferentes letras en superíndice indican que existen diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$), obtenido mediante ANOVA bidireccional, aplicando la prueba de análisis múltiple de Bonferroni (BSD).

Tabla 25. Familia de compuestos volátiles vinos de Tintilla de Rota, elaborados con polen y activador comercial.

Familia volátiles	Control	Polen	Comercial
Alcoholes superiores	565123,9 ± 17152,3 ^a	680357,1 ± 21601,7 ^b	599640,2 ± 19862,8 ^a
Metanol	63489,4 ± 3570,0 ^a	55928,6 ± 1160,0 ^b	61709,1 ± 1139,8 ^a
Acidos	3298,4 ± 137,6 ^a	2260,6 ± 184,7 ^b	2561,8 ± 77,0 ^c
Alcoholes C-6	445,5 ± 4,3 ^a	425,3 ± 37,5 ^a	375,0 ± 18,5 ^b
Alcoholes	5371,2 ± 164,1 ^a	5129,2 ± 220,2 ^a	4625,2 ± 116,2 ^b
Fenoles	149,9 ± 4,0 ^a	189,1 ± 8,3 ^b	147,4 ± 10,8 ^a
Terpenoides	129,1 ± 8,2 ^a	345,6 ± 8,7 ^b	230,6 ± 13,0 ^c
Ésteres	2692,6 ± 1469,7 ^a	31079,5 ± 747,4 ^{b,c}	29043,3 ± 705,2 ^c
Aldehídos	63810,4 ± 2336,5 ^a	14716,6 ± 462,1 ^{b,c}	12369,2 ± 522,7 ^c
Tioles	18,1 ± 1,6 ^a	121,7 ± 1,9 ^b	104,3 ± 3,3 ^c
Acetales	1,9 ± 0,1 ^a	2,0 ± 0,1 ^{a,b}	2,1 ± 0,2 ^b
Norisoprenoides	5,9 ± 0,1 ^a	12,2 ± 1,1 ^b	15,1 ± 1,0 ^c
Lactonas	101,6 ± 0,2 ^a	154,2 ± 0,1 ^{b,c}	154,8 ± 0,2 ^c
Total	704638 ± 24849^a	790722 ± 24434^b	710978 ± 22471^a

Diferentes letras en superíndice indican que existen diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$), obtenido mediante ANOVA bidireccional, aplicando la prueba de análisis múltiple de Bonferroni (BSD).

4.3.7.2 Análisis de Componentes Principales de compuestos volátiles (ACP)

En la Tabla 26 se muestran las cargas para los factores extraídos en el Análisis de los Componentes Principales (ACP), aplicado sobre el conjunto de datos correspondientes a las familias de los compuestos volátiles analizados en los vinos blancos y tintos: alcoholes superiores, metanol, ácidos, alcoholes C6, alcoholes, fenoles, terpenoides, ésteres, aldehídos, acetales, norisoprenoides y lactonas. El análisis extrae 3 factores que explican más del 88% de la varianza total de los datos. En el primer factor (F1), está correlacionado positivamente con la mayoría de compuestos volátiles minoritarios (tioles, metanol, acetales, norisoprenoides, lactonas y fenoles) característicos de los vinos de Tintilla de Rota y negativamente con los alcoholes C6. Los terpenos se encuentran también incluidos positivamente en F1, pero con una carga bastante más inferior. Es probable que este efecto sea debido a la influencia que tiene los hollejos sobre esta familia de compuestos en la vinificación de la Tintilla. Como se puede observar en la Figura 39a, todos los vinos blancos presentan valores de F1 negativos, siendo los más bajos para los vinos con activador comercial y polen. Por el

contrario, todos los vinos tintos, presentan valores positivos (>1), destacando el polen con los niveles más altos, lo que corrobora su acción potenciadora sobre estos compuestos minoritarios que tipifican el carácter varietal de la Tintilla de Rota.

El segundo factor (F2), está correlacionado positivamente con los compuestos volátiles más responsables del perfil aromático de los vinos (ésteres y terpenos) y negativamente con aldehídos y alcoholes. F2 agrupa por tanto la familia de compuestos aromáticos que están más influenciados por la presencia de polen. Podríamos definir a este factor como “Factor Polen”, ya que los resultados obtenidos indican que el uso de polen favorece la producción de ésteres, principalmente, y la cesión de terpenos, mientras que se disminuye la formación de alcoholes y aldehídos. En este factor, se vuelve a reflejar el efecto observado a dosis bajas en los estudios con diferentes dosis en Palomino fino, Riesling y Tintilla de Rota. El polen está muy relacionado con el aumento de compuestos responsables de las notas aromáticas de frutas y flores, características que van a ser determinantes durante el análisis sensorial de los vinos. El otro efecto observado en F2, es que vuelve a presentar cierta correlación con los terpenos y derivados, debido fundamentalmente al efecto sinérgico del polen y los hollejos sobre esta familia de compuestos volátiles. En la Figuras 39a y 39b, queda patente el efecto potenciador del aroma que presenta el polen durante la vinificación en blanco y en tinto. En este caso, los vinos con polen y activador comercial, presentan en todos los casos valores positivos en F2, sobre todo en el caso del polen. Esto indica, que el uso del polen en la vinificación refuerza, por un lado, la formación y por otro, la extracción, de compuestos responsables de los aromas en los vinos.

El tercer factor (F3), correlaciona y agrupa los alcoholes superiores principalente, que son los compuestos volátiles mayoritarios en los vinos. El polen tiene un efecto muy claro sobre el comportamiento de esta familia de compuestos, tanto en vinos blancos como en vinos tintos, favoreciendo la producción de alcoholes superiores. En la Figura 39b, se representan los dos factores aromáticos (F2 y F3) donde el polen está ejerciendo un cierto efecto. Como se puede observar, todos los vinos con polen, presentan los niveles de F3 más altos en sus respectivas series, en comparación con el testigo y con el activador comercial.

Tabla 26. Cargas de las componentes principales de los compuestos volátiles en los vinos de Tintilla de Rota dosificados con polen y testigo.

Compuestos volátiles	F1	F2	F3
Alcoholes superiores	-,097	,009	,986
Metanol	,875	-,155	,195
Acidos	-,669	-,535	-,081
Alcoholes C-6	-,754	-,144	,476
Alcoholes	,356	-,704	,387
Terpenos y derivados	,668	,614	,068
Ésteres	,497	,834	-,024
Aldehídos	-,086	-,832	-,052
Tioles	,873	,418	,059
Acetales	,980	,061	-,148
Norisoprenoides	,938	,274	-,062
Lactonas	,978	,178	-,089
Fenoles	,977	,083	-,108
<i>Varianza explicada (%)</i>	<i>54,88</i>	<i>22,19</i>	<i>11,16</i>

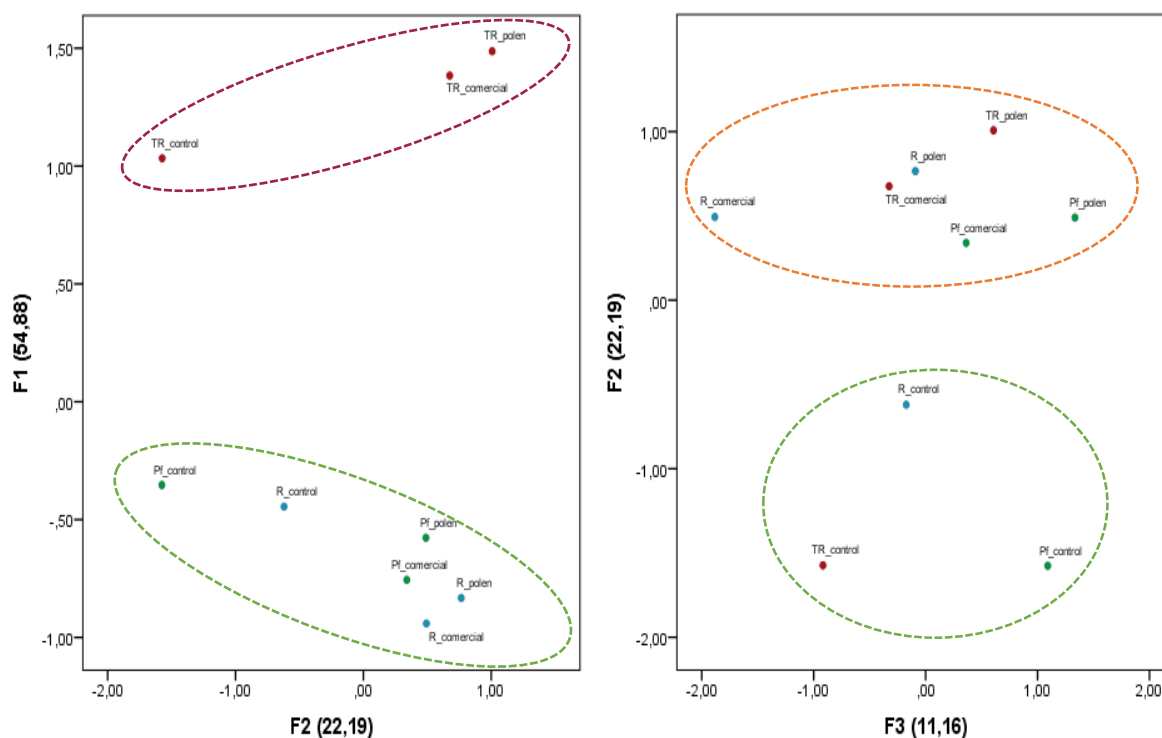


Figura 39. Análisis de componentes principales en vinos de Palomino fino, Riesling y Tintilla de Rota, fermentados con polen (p) frente a un activador comercial (cm) y control (c).

4.3.7.3 Descripción del Valor de la Actividad Odorante (VAO)

En las Tablas 27, 28 y 29 se muestran los valores del sumatorio de los VAO de cada serie aromática, así como el sumatorio de todas las series ΣOAV_{τ} , en las que se incluyen todos los compuestos volátiles que presentan actividad odorante y participan en el perfil sensorial de los vinos de Palomino fino, Riesling y Tintilla de Rota, respectivamente. En el sumatorio de los VAO se agrupan las diferentes series aromáticas en la que se asocian los diferentes compuestos volátiles con su umbral de percepción según la bibliografía.

De forma general, en todos los casos, los vinos con polen presentan los valores más altos de ΣOAV_{τ} , con diferencias significativas son significativamente superiores en los vinos con polen con respecto al testigo y al activador comercial (Tablas 27, 28 y 29). Esto se debe a que el polen presenta para todas las variedades de vinos estudiados los niveles más altos de las series odorantes afrutada y floral en comparación con el testigo y el activador comercial.

Para los vinos de Riesling y Tintilla de Rota, el activador comercial también potencia o intensifica la serie afrutada y floral, aunque siempre en menor medida que el polen (Tablas 28 y 29). La excepción lo constituye el Palomino donde los valores de estas series son muy parecidos al testigo.

En las Figuras 40 y 41 se muestran el porcentaje de incremento de las series odorantes “positivas” (afrutado + floral) frente a las series odorantes “negativas” (grasa + herbáceo + fruto seco). En todos los casos, el mayor peso del perfil aromático de los vinos, lo ejercen las series odorantes “positivas”, cuyos valores se situaron por encima del 93-95 % en los vinos con polen, seguidas por el activador comercial, con valores superiores al 83-93 % y por último el testigo con un 81-90% (Figuras 40, 41 y 42).

Tabla 27. Sumatorio de los valores de actividad odorante (ΣOAV) de los vinos de Palomino fino agrupados por series odorantes.

Series odorantes	Control	Polen	Comercial
Afrutado	85,74	154,02	85,69
Floral	17,63	24,61	16,91
Grasa	17,09	11,28	14,01
Herbáceo	1,06	1,03	1,05
Fruto seco	6,24	2,43	1,54
Terroso, hongos	0,30	0,28	0,29
Química	0,09	0,09	0,10
Especiado	0,03	0,05	0,04
ΣOAV_T	128,18	193,79	119,62

Tabla 28. Sumatorio de los valores de actividad odorante (ΣOAV) de los vinos de Riesling agrupados por series odorantes.

Series odorantes	Control	Polen	Comercial
Afrutado	138,28	239,97	149,42
Floral	8,56	25,42	23,23
Grasa	11,83	9,59	13,57
Herbáceo	0,58	0,99	0,81
Fruto seco	2,56	3,93	2,78
Terroso, hongos	0,15	0,31	0,19
Química	0,08	0,12	0,13
Especiado	0,01	0,02	0,05
ΣOAV_T	162,05	280,36	190,17

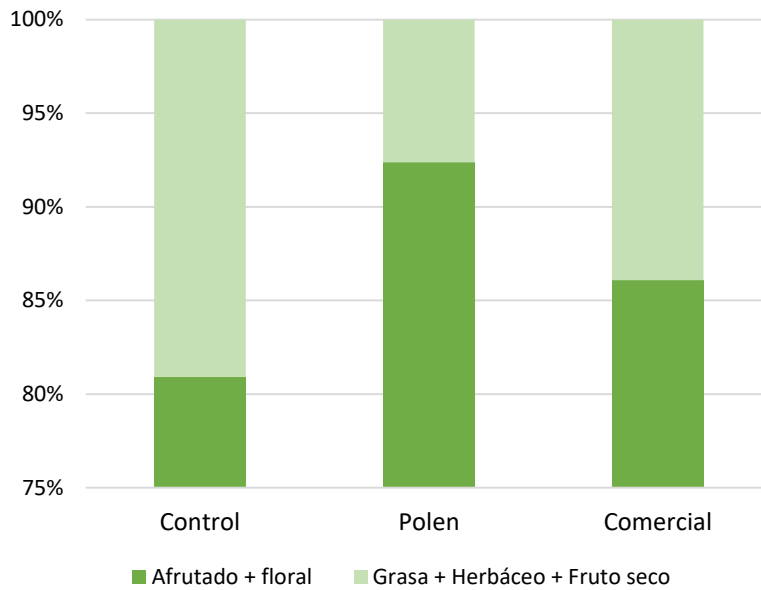


Figura 40. Porcentaje de participación de las series odorantes (afrutada, floral, grasa, herbácea y fruto seco) en los vinos blancos de Palomino fino.

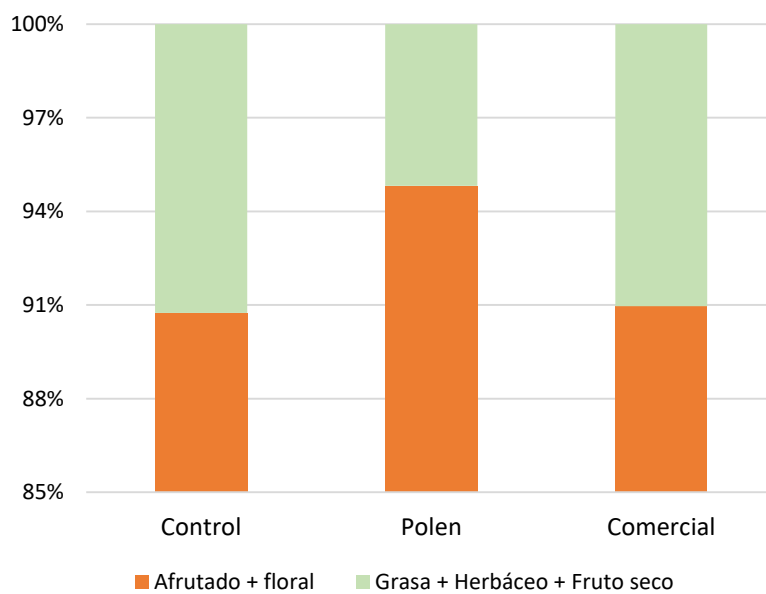


Figura 41. Porcentaje de participación de las series odorantes (afrutada, floral, grasa, herbácea y fruto seco) en los vinos blancos de Riesling.

Tabla 29. Sumatorio de los valores de actividad odorante (Σ OAV) de los vinos de Tintilla de Rota agrupados por series odorantes.

Series odorantes	Control	Polen	Comercial
Afrutado	125,11	173,85	133,14
Floral	17,61	37,74	36,23
Grasa	11,00	8,76	9,36
Herbáceo	0,54	0,64	0,54
Fruto seco	6,38	1,45	1,22
Terroso, hongos	0,27	0,26	0,19
Química	0,08	0,13	0,13
Especiado	1,06	1,88	1,53
Fenólico	0,01	0,01	0,01
ΣOAV_T	162,05	224,71	182,35

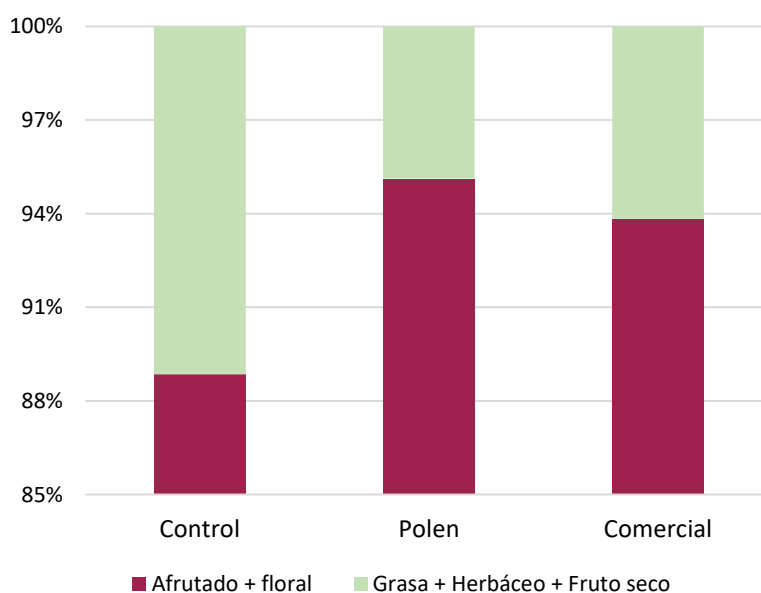


Figura 42. Porcentaje de participación de las series odorantes (afrutada, floral, grasa, herbácea y fruto seco) en los vinos tintos de Tintilla de Rota.

Por tanto, de forma general podemos decir que el polen consigue potenciar la formación de compuestos volátiles con poder odorante positivo (fruta y flores), frente a los compuestos volátiles con aromas defectuosos (grasos).

4.3.8 Análisis sensorial descriptivo

A continuación, se realizó un análisis sensorial a todos los vinos, para describir los atributos organolépticos que describen cada vino de forma detallada. Para ello, se utilizó una ficha de cata específica para los vinos blancos (Anexo. Tabla 38) y otra para los vinos tintos (Anexo. Tabla 39). En los vinos elaborados en Francia se utilizó los descriptores genéricos para vinos tintos jóvenes, de tal forma que para realizar la comparativa, en cada caso se ha diferenciado entre los atributos de cata con carácter general y en Palomino fino, Riesling y Tintilla de Rota, además del carácter general se obtuvo información y valoración de los atributos olfativos específicos. Todos los vinos blancos fueron analizados por 29 jueces, todos ellos personas con amplia experiencia en el análisis sensorial de vinos.

4.3.8.1 Atributos generales en vinos blancos

En las Figuras 43 y 44, se representan los diagramas de araña correspondientes al perfil sensorial de los atributos generales para los vinos blancos de Palomino fino y Riesling respectivamente (carácter frutal, floral, especiado, en nariz; dulzor, acidez, amargor, astringencia, salinidad, cuerpo y persistencia, en boca). Como se puede observar, en ambos casos, los vinos con polen alcanzaron de forma significativa una mayor puntuación en los caracteres frutal y floral, frente al testigo y al activador comercial, siendo el testigo el que obtuvo las puntuaciones más bajas. Estas valoraciones verifican los resultados del VAO y probablemente sean debido, como se ha apuntado anteriormente, a que el polen potencia de manera específica la síntesis de esteres durante la fermentación alcohólica.

En los vinos de Palomino, las puntuaciones sobre el carácter floral no muestran diferencias significativas entre los vinos testigo y los vinos con activador comercial (Figura 43). Sin embargo, en Riesling los vinos testigos presentan las mejores puntuaciones, en comparación con el activador comercial (Figura 44).

Con respecto al atributo sensación dulce en boca, los vinos testigo y con polen, presentan puntuaciones inferiores en comparación con el activador comercial. Mientras que en Riesling, control y polen muestran puntuaciones ligeramente superiores frente al activador comercial. En cuanto a la acidez, todos los vinos muestran niveles de acidez moderada y solo los vinos con activador comercial y polen son los que presentaron puntuaciones ligeramente superiores al testigo. Ninguno de los vinos destaca por su carácter amargo, sin embargo, en Palomino fino, el testigo obtiene puntuaciones significativamente superiores al polen y activador comercial; mientras que en Riesling el comportamiento es opuesto (Figura 44). La sensación de astringencia de los vinos es puntuada muy baja de forma general, destacando únicamente y con puntuaciones mayores los vinos de Riesling con activador comercial. En cuanto al carácter salino, en todos los casos los resultados muestran valores bajos y ninguno de los vinos destacó de forma significativa.

Respecto a la sensación de textura en boca, cabe destacar que los vinos que presentan más cuerpo fueron control y polen, en Palomino; y los vinos con polen, en Riesling, siendo siempre el activador comercial el que menos puntuación obtuvo en todos los casos. Además de ello, son esos mismos vinos los que presentan significativamente mayor persistencia en los vinos de Palomino, mientras que los Riesling son mejor valorados con polen y activador comercial (Figuras 43 y 44).

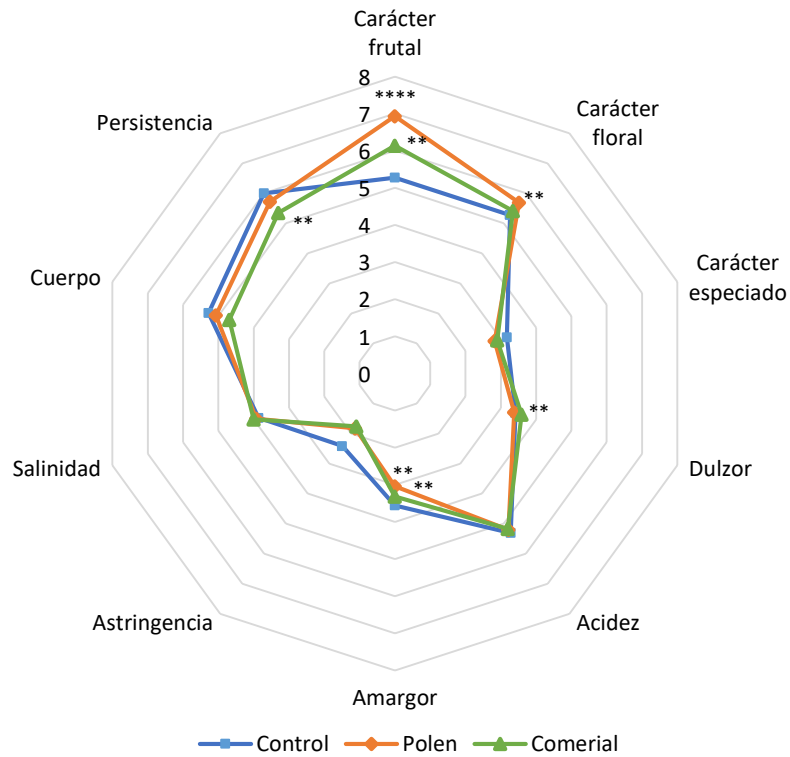


Figura 43. Análisis sensorial de los vinos de Palomino fino fermentados con polen y activador comercial (atributos generales). (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$)

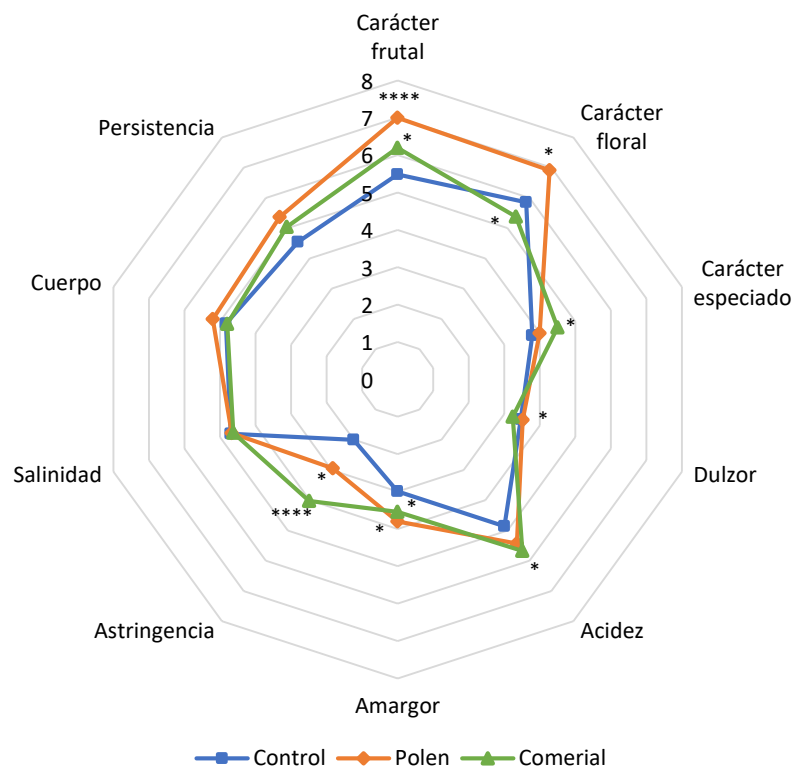


Figura 44. Análisis sensorial de los vinos de Riesling fermentados con polen y activador comercial (atributos generales). (* $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$)

4.3.8.2 Atributos específicos en vinos blancos

Haciendo un análisis pormenorizado sobre atributos más específicos de la fase olfativa entre los vinos blancos, de forma general, Riesling presenta un perfil sensorial mucho más complejo y rico que los vinos de Palomino fino (Figuras 45 y 46). Mientras que en los vinos de Palomino se intensifican significativamente las notas a frutas blancas (manzana y pera), en Riesling además de las frutas blancas, se incrementan las notas a frutas tropicales (plátano, melón, piña, maracuyá) y cítricas (mandarina y lima), con respecto al activador comercial y al testigo. Los vinos con activador comercial y polen de Palomino, presentan mayor intensidad en frutas con hueso y menor en frutos secos, en comparación con el polen, a pesar de que este último atributo obtuvo muy baja puntuación en todos los casos. En el caso de Riesling, solo se observa un ligero incremento en las notas a frutos secos en los vinos con polen.

Como ya se esperaba, en los vinos de Palomino con polen y activador, se obtienen las mayores puntuaciones en el atributo intensidad de flores blancas (azahar, jazmín), mientras que el resto de atributos son evaluados con puntuaciones muy bajas por los catadores (Figura 45). En el caso de los vinos de Riesling, la intensidad en flores blancas está más marcada que en Palomino, coincidiendo con los incrementos observados en esta serie odorante en el estudio de los VAO. Los vinos de Riesling elaborados con el activador comercial, muestran incrementos en las notas blasámicas, a levaduras y químico, incrementos no observados en los vinos con polen. Este comportamiento indica que a pesar de conseguirse un perfil sensorial más complejo con la variedad Riesling, la intensidad en la que se encuentran estos atributos minoritarios parece estar integrada de forma más equilibrada. Por último, a pesar de que no hubo diferencias en la graduación alcohólica de los vinos (Tablas 4 y 5), los vinos de Riesling presentan mayor calidez en boca con el polen, posiblemente relacionado con el ligero incremento en cuerpo y persistencia observado.

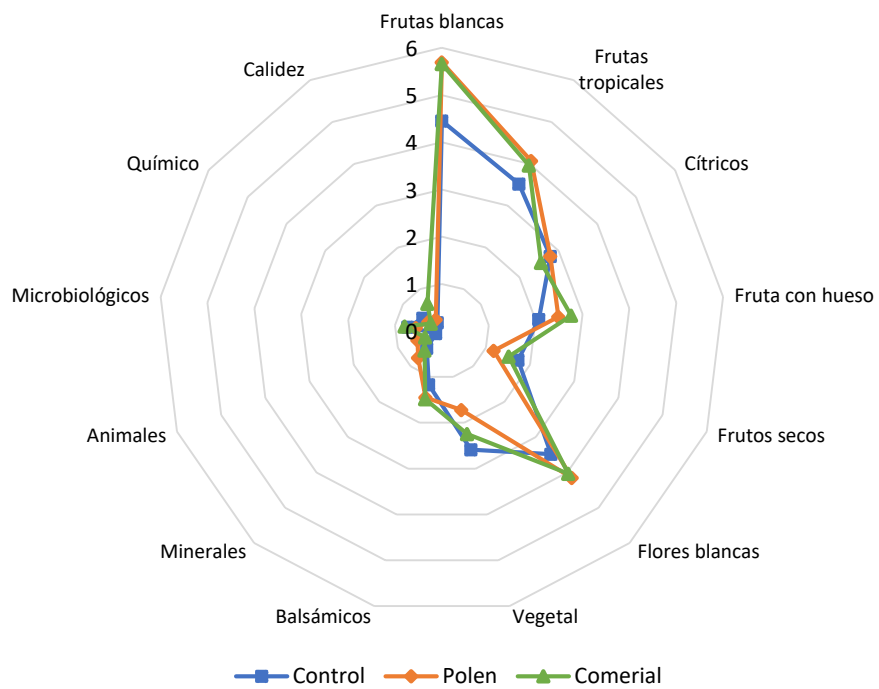


Figura 45. Análisis sensorial de los vinos de Palomino fino fermentados con polen y activador comercial (atributos olfativos específicos).

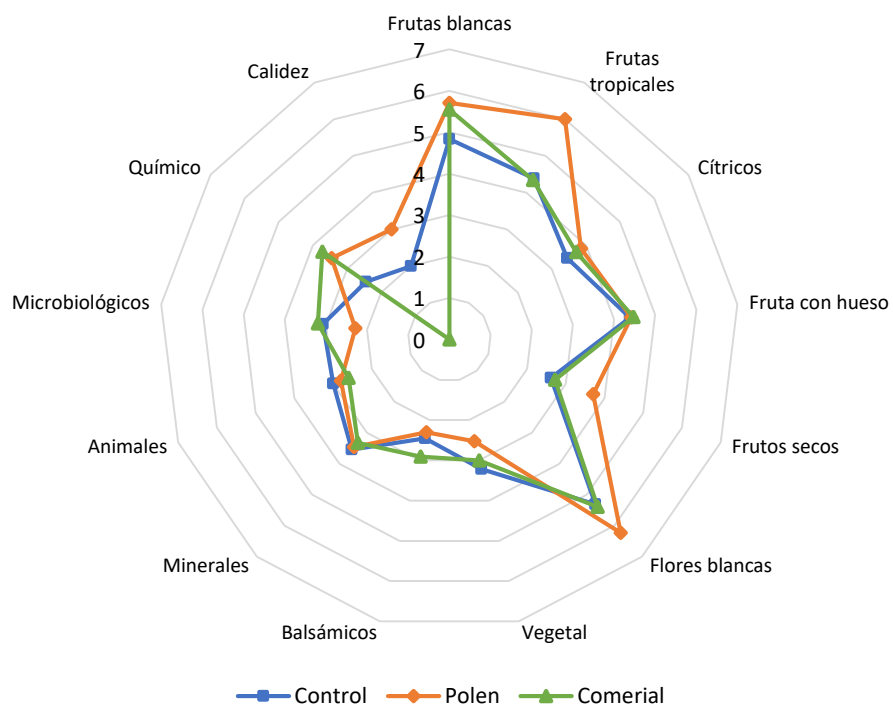


Figura 46. Análisis sensorial de los vinos de Riesling fermentados con polen y activador comercial (atributos olfativos específicos).

4.3.8.3 *Atributos generales en vinos tintos*

De forma general, los vinos tintos de Tintilla de Rota, Cabernet sauvignon y Merlot, elaborados con polen presentan puntuaciones significativamente superiores en los atributos relacionados con el carácter afrutado y floral con respecto al testigo y al activador comercial (Figuras 47, 48 y 49). No se observa variaciones en la intensidad del dulzor en ninguno de los casos. Sin embargo, en el caso de Tintilla se observa una mayor puntuación en la intensidad de la acidez en los vinos con polen y activador comercial, mientras que, en Cabernet y Merlot este aumento solo se observa en los vinos con activador comercial (Figuras 48 y 49). Las sensaciones de amargor y astringencia presentan de forma conjunta, un comportamiento muy diferente en los vinos. Mientras que, en la Tintilla y Merlot, los vinos con polen fueron los que obtuvieron menor puntuación; en Cabernet, el vino elaborado con el activador comercial fue el que presentó menor amargor y astringencia. En el caso de Tintilla, al igual que sucedió con los vinos de Riesling, los vinos con polen y activador comercial fueron vinos con mayor cuerpo y persistencia.

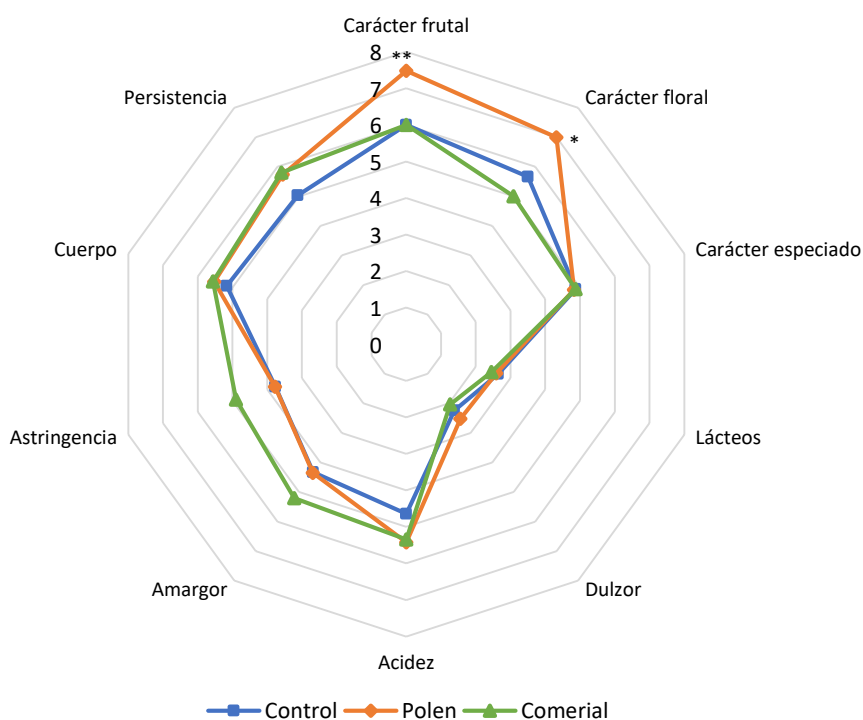


Figura 47. Análisis sensorial de los vinos de Tintilla de Rota fermentados con polen y activador comercial (atributos generales). (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

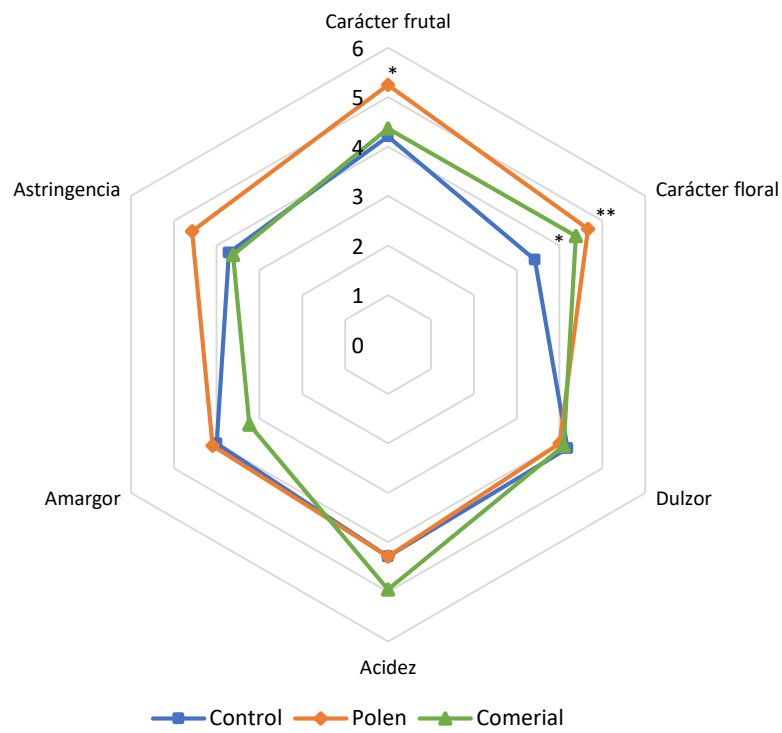


Figura 48. Análisis sensorial de los vinos de Cabernet sauvignon fermentados con polen y activador comercial (atributos generales). (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

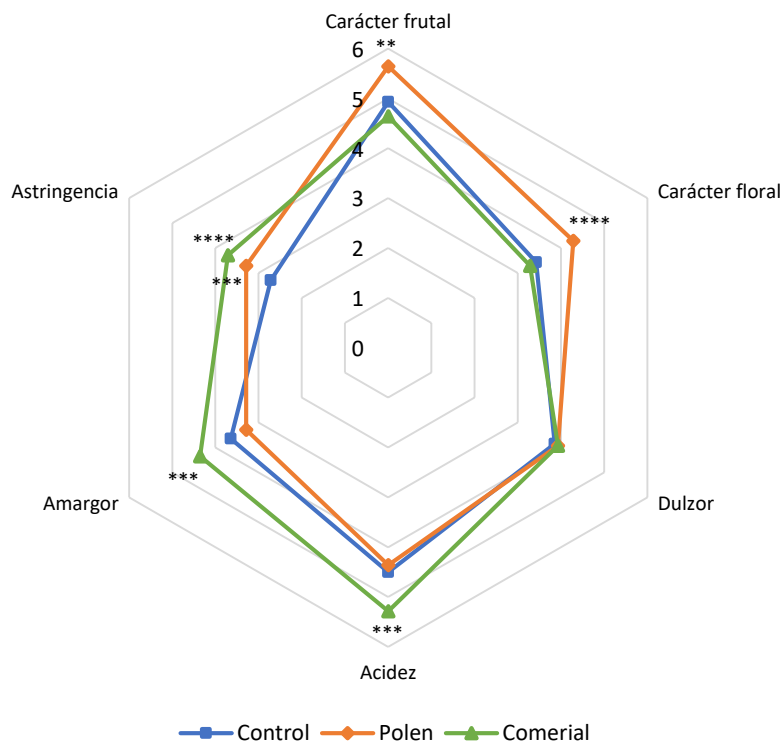


Figura 49. Análisis sensorial de los vinos de Merlot fermentados con polen y activador comercial (atributos generales). (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$)

4.3.8.4 *Atributos específicos en vinos tintos*

Analizando los atributos olfativos específicos en los vinos tintos de Tintilla de Rota (Figura 50), todos los vinos con polen presentaron de forma significativa mayor riqueza y diversidad en el perfil afrutado de los vinos (moras, frambuesas, cerezas, manzana, además de notas a melón, mango, maracuyá, mandarina y lima) (ANOVA $p < 0,05$), en comparación con los vinos testigo y con activador comercial. Mientras que no se observaron diferencias sustanciales en los aromas a frutas con hueso, frutos maduros y frutos secos. En relación con los atributos florales, los vinos con polen fueron los mejor puntuados en sus notas a flores azules (violetas y lilas) y rojas (rosas), y en menor medida en flores blancas, donde destacó el testigo, aunque en ambos casos fueron mejor puntuados que el activador comercial. El resto de atributos no mostraron diferencias significativas entre los vinos.

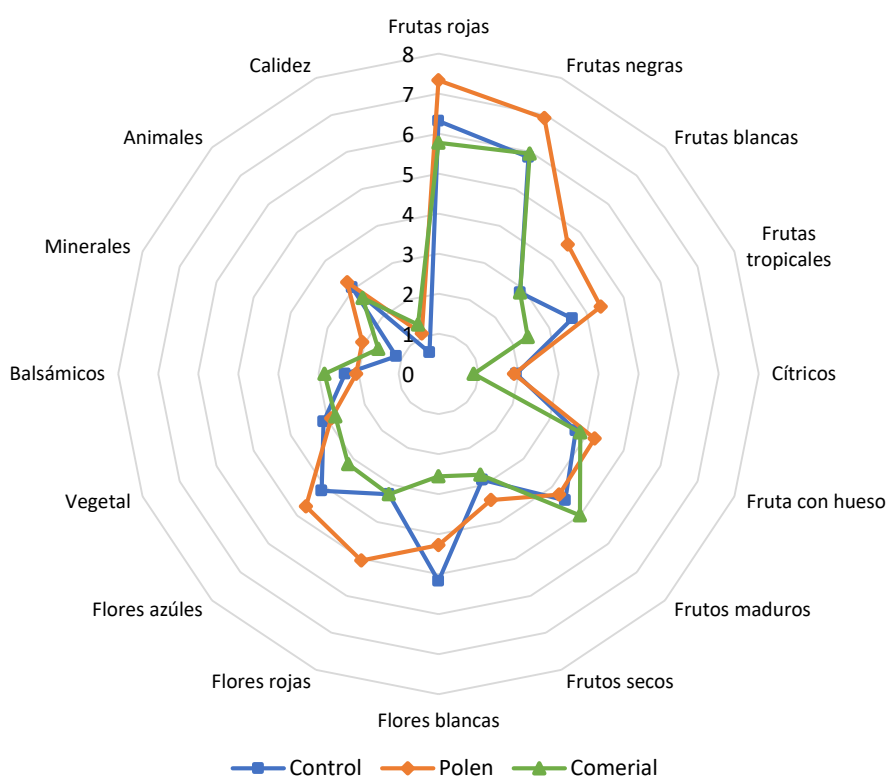


Figura 50. Análisis sensorial de los vinos de Tintilla de Rota fermentados con polen y activador comercial (atributos olfativos específicos).

4.3.9 Test de ordenación y prueba triangular

Para reducir el posible carácter subjetivo que normalmente se suele asociar al análisis sensorial de los vinos, una vez caracterizados por atributos (olfativos, gustativos y textura), los vinos fueron sometidos al test de ordenación (ISO 8587:2006 AENOR, 2010) y a la prueba triangular (ISO 4120:2007 AENOR, 2008). Ambos métodos son muy utilizados en los diferentes campos de la industria alimentaria, sobre todo en el estudio de nuevos productos antes de su lanzamiento al mercado.

El test de ordenación, es método de evaluación sensorial que nos va a permitir ordenar una serie de muestras en función de un criterio establecido. En este caso, a los catadores se les indicó que ordenaran las muestras según la preferencia hedónica, de manera que se pueda conocer si existen diferencias entre los diferentes vinos. Una vez ordenados los vinos, siguiendo las indicaciones de la norma, se les asignó una puntuación creciente según el orden de preferencia y se calcularon las sumas de las ordenaciones de las muestras para cada catador, rechazándose la hipótesis nula (H_0) cuando exista ausencia de diferencias entre las muestras. Para ello, se aplicó el valor del test de Page, para comparación respecto a un orden conocido. Observando los resultados de la tabla 4 de la norma, se rechazará H_0 , si $F_{\text{test}} > F$ de la tabla, considerando el número de jueces, el número de productos y el riesgo asumido. Por lo tanto, se podrá concluir que hay diferencias consistentes entre las ordenaciones de los productos.

Los resultados del test de ordenación para los vinos blancos y tintos elaborados con el uso de polen frente a un activador comercial se muestran en la Tabla 30. Atendiendo a los valores de la tabla, se concluye que hay diferencias consistentes entre las ordenaciones de los productos:

- En los vinos de Palomino fino, se prefirieron significativamente los vinos con polen y el testigo, frente al activador comercial.
- En los vinos de Riesling, se prefirieron significativamente los vinos con polen sobre todas las demás, seguidas de lejos por el activador comercial y en último lugar, por los vinos testigo.

- En los vinos de Tintilla, se obtuvieron resultados similares a los de Riesling, se prefirieron nuevamente los vinos con polen de forma significativa, seguidos por el activador comercial y en última posición los vinos testigo.
- En los vinos elaborados con Cabernet sauvignon, nuevamente se prefirieron de forma significativa, aquellos elaborados con polen frente al testigo y el activador comercial.
- En último lugar, los resultados obtenidos con los vinos de Merlot, mostraron una preferencia hacia los vinos con polen, muy cerca de haber llegado a obtener significancia estadística.

Tabla 30. Resultados del test de ordenación obtenido en los vinos blancos y tintos obtenidos en el estudio comparativo con polen y activador comercial.

Variedad	Control	Polen	Comercial	Catadores	F test	Significancia (α)
Palomino fino	42	66	66	29	13,24	0,01
Riesling	49	72	53	29	10,41	0,01
Tintilla de Rota	41	75	58	29	19,93	0,01
Cabernet sauvignon	37	46	31	19	6,00	0,05
Merlot	59	66	49	29	5,03	--

Estos resultados se muestran de forma esquematizada en la Figura 51, donde están representados los porcentajes de puntuación obtenidos en cada caso (testigo, polen y activador comercial) con respecto a la puntuación total.

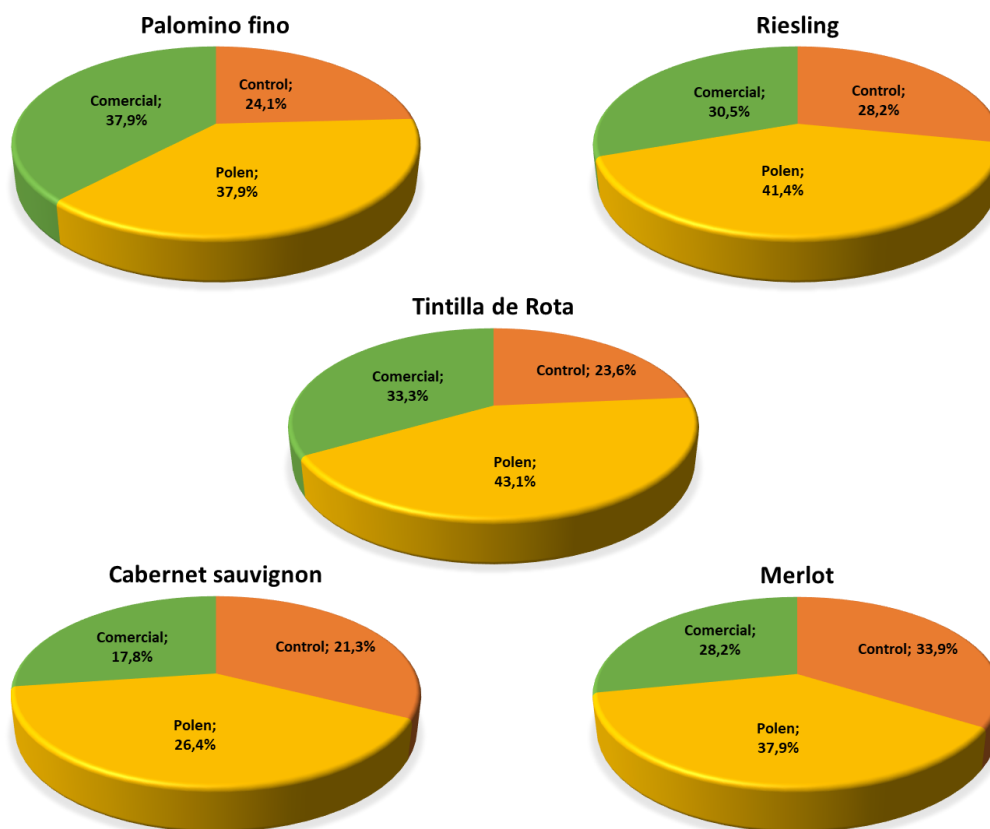


Figura 51. Puntuación (%) obtenida con cada tipo de elaboración (testigo, polen y activador comercial) con respecto a la puntuación total.

En la prueba triangular, se presentan de forma simultánea tres muestras, donde siempre dos de ellas son idénticas y una diferente. El panelista o catador, debe indicar en cada caso cuál de las muestras es la diferente. Esta prueba nos va a permitir conocer si existe alguna diferencia perceptible entre tres vinos, sin necesidad de especificar la posible naturaleza de esas diferencias (Anzaldúa Morales, 1994). En este sentido, se establece la hipótesis de que la probabilidad de escoger la muestra diferente cuando no existe diferencia entre las muestras es de $1/3$ ($H_0: P_t=1/3$). En esta modalidad, las muestras fueron presentadas a los catadores siguiendo las secuencias: AAB, AAC, BCC, ABB, ACC y BCC, de tal manera que todas las muestras fueron presentadas en igual número y de forma aleatoria.

Atendiendo a las indicaciones de la norma (ISO 4120:2007 AENOR, 2008), si el número de respuestas correctas son mayores o iguales al número establecido en la tabla (correspondiendo al número de jueces y al nivel de riesgo elegido en la prueba), se concluirá que existen diferencias perceptibles entre las muestras.

Los resultados de la prueba triangular para los valores obtenidos de alfa riesgo (α) y el número de catadores para cada variedad de vinos, se muestran en la Tabla 31, y el porcentaje de catadores que identificaron los vinos diferentes en cada caso se muestran en la Figura 51. Los valores de la tabla mostraron diferencias significativas en los siguientes casos:

- En los vinos de Palomino fino, los vinos con el activador comercial fueron muy diferentes respecto al testigo ($\alpha = 0,2$) y al vino con polen ($\alpha = 0,01$). Mientras que entre testigo y polen no se obtuvieron diferencias significativas.
- En los vinos de Riesling, se obtuvieron diferencias significativas en todas las comparaciones.
- En los vinos de Tintilla, nuevamente, al igual que en Riesling, todos los vinos mostraron diferencias entre sí.
- En los vinos elaborados con Cabernet sauvignon y Merlot, mostraron resultados similares. En cada caso, los vinos con polen y con el activador comercial, mostraron diferencias significativas que permitieron poder diferenciarlos entre sí. Mientras que no se pudo obtener una diferenciación tan clara entre los vinos con polen y con el activador comercial, en ambas variedades.

Tabla 31. Resultados de la prueba triangular obtenidos en los vinos blancos y tintos obtenidos en el estudio comparativo con polen y activador comercial.

Variedad	Control vs Polen	Control vs Comercial	Polen vs Comercial	Catadores
Palomino fino	--	0,2	0,01	28
Riesling	0,2	0,01	0,2	27
Tintilla de Rota	0,1	0,2	0,2	26
Merlot	0,001	0,05	--	29
Cabernet sauvignon	0,2	0,01	--	17

La Figura 52 muestra el porcentaje de catadores capaces de identificar los vinos diferentes en la prueba triangular. En el caso de los vinos blancos, el mayor porcentaje de catadores fueron capaces de identificar las diferencias entre los vinos, al enfrentar los vinos con polen frente al activador comercial, en el caso de Palomino y control frente a comercial, en Riesling.

Los resultados de aplicar la prueba triangular a los vinos tintos elaborados con Tintilla de Rota, mostraron de forma general que todos los vinos presentaron un comportamiento similar. Siendo el enfrentamiento del control con el polen, el que obtuvo un porcentaje ligeramente superior al resto. En los vinos elaborados con Merlot, las mayores diferencias fueron encontradas de nuevo, entre el control y el polen, mientras que en los vinos de Cabernet sauvignon, los resultados fueron muy parecidos a los vinos de Riesling.

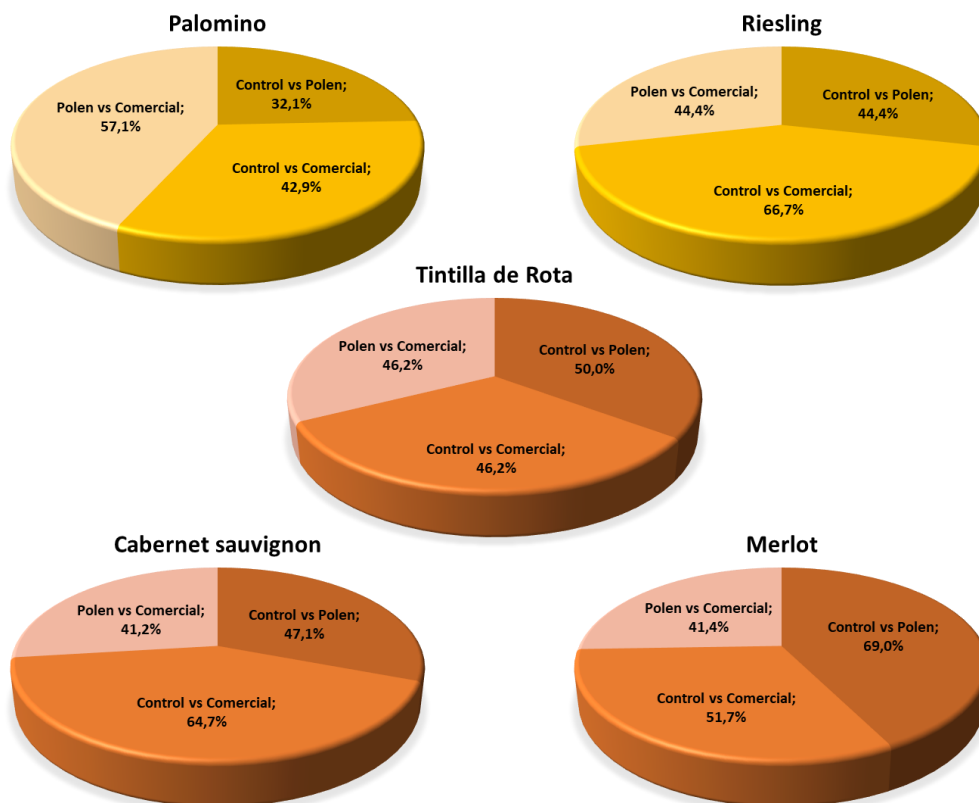


Figura 52. Porcentaje de catadores que identificaron correctamente el vino (testigo, polen y activador comercial) durante la prueba del test triangular.

Al analizar de forma conjunta los resultados obtenidos de las dos pruebas, junto con la información detallada obtenida del análisis sensorial, se puede llegar a concluir que:

- Los elevados porcentajes de catadores capaces de identificar los vinos diferentes durante las sesiones de pruebas triangulares, indicaron que efectivamente existen diferencias significativas entre los vinos elaborados con polen, activador comercial y control.

- Los resultados del test de ordenación, mostraron que, en la mayor parte de los casos, los vinos preferidos de forma significativa fueron los elaborados con polen, tanto en blancos como en tintos.

Por último, teniendo en cuenta los resultados de los análisis sensoriales descriptivos, se puede determinar que esas diferencias organolépticas entre los vinos, son producidas por mejoras en la intensidad aromática de los atributos sensoriales correspondientes a los aromas afrutados y florales. Características por las cuales, los vinos vinificados con polen de abeja fueron los mejor valorados por los catadores.

Consideraciones económicas en el coste del polen frente a productos comerciales

4.4 Consideraciones económicas en el coste del polen frente a productos comerciales

4.4.1 Evolución del precio del polen

De forma anual, el Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medioambiente, lleva un control sobre la producción de los productos agroalimentarios producidos en España. En nuestro caso, nos vamos a centrar en conocer como ha evolucionado el precio del polen en el sector. En la Figura 53, se muestra la evolución económica del polen en los dos formatos en que se comercializa, a granel y envasado, desde la campaña 2006/07 hasta la última campaña registrada 2016/17 (MAPAMA, 2017).

Observando la Figura 53, se puede ver como durante la campaña 2012/13 los precios para el polen a granel y envasado experimentaron una subida de los precios, en comparación con las campañas anteriores. En esta campaña, los precios se revalorizaron un 58,70 % en el formato a granel y un 18,87 % en el envasado, con respecto al precio medio de las cinco campañas anteriores.

Durante la campaña siguiente (2013/14), los incrementos de las ventas permitieron volver a registrar subidas, más que significativas en los precios del polen, entre un 9,80 % y un 3,80 %, para polen envasado y a granel respectivamente. A partir de aquí, los precios alcanzados, se mantuvieron mas o menos estables durante la campaña siguiente (2014/15), donde el kilo de polen experimentó leves variaciones (1,72 % y 0,15 %, a granel y envasado, respextivamente).

A partir de mayo de la campaña siguiente (2015/16), esta subida en los precios se ve interrumpida y se experimentan los primeros descensos, recogándose caídas del orden de -0,98 % en el precio del polen a granel y del -0,32 % en el del polen envasado. Las cotizaciones alcanzadas por el precio del polen, lleva si variar de manera significativa las últimas tres campañas, con precios algo superiores a 14,0 €/Kg de polen envasado y alrededor de los 11,0 €/Kg de polen a granel.

Analizando los datos recogidos de la campaña anteriores (2016/2017) se volvieron a registrar descensos en el precio del polen, con variaciones del -5,31 % en el polen a granel y del -1,82 % en el polen envasado. Por lo tanto, los precios finales alcanzados durante la campaña anterior registrada, fueron de 10,47 €/Kg para el polen a granel y 13,73 €/Kg para el envasado.

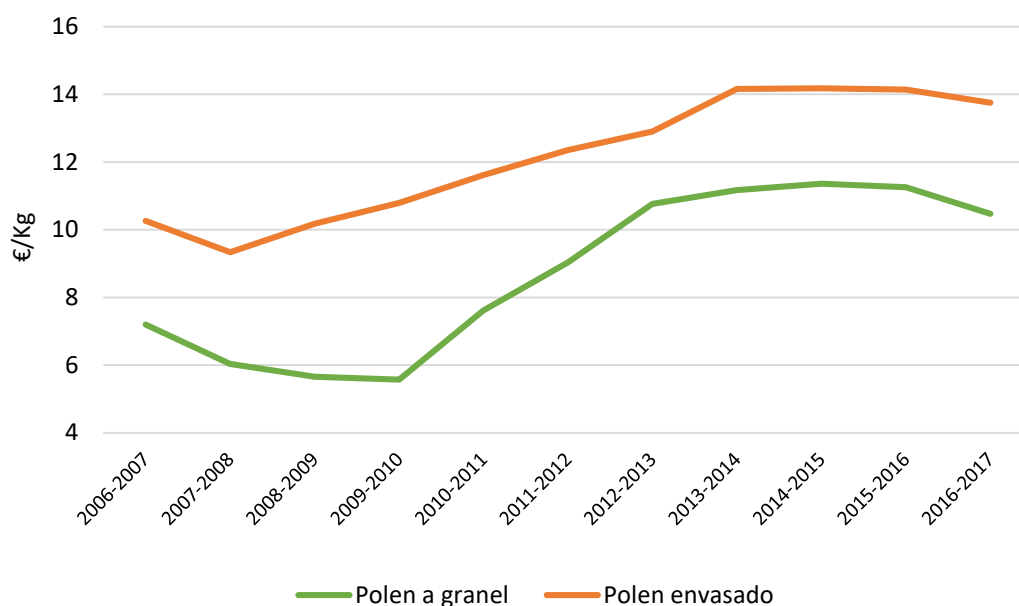


Figura 53. Evolución del precio del polen entre las campañas 2006/07 y 2016/17. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (2017).

4.4.2 Estudio económico comparativo con nutrientes comerciales

El análisis comparativo de costes ha sido realizado entre el coste/kilo del polen (envasado y a granel) indicado por el MAPAMA (2017), frente al coste de ocho Nutrientes Comerciales (NC) de diferentes casas, uno de ellos específicos para la fermentación maloláctica (FML). En la Tabla 32 se muestran la composición base y el uso enológico de cada uno de ellos.

Tabla 32. Nutrientes comerciales, su formulación e interés enológico para FA y FML.

Nutriente	Formulación base
NC1	Levaduras inactivadas, cortezas de levaduras y celulosa microcristalina
NC2	Preparación de levaduras inactivadas
NC3	Levaduras inactivadas (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>), fosfato diamónico y tiamina (B1)
NC4	Preparación específica de autolisados de levaduras
NC5	Levaduras inactivadas, fosfato diamónico y tiamina (B1)
NC6	Paredes celulares de levadura seleccionada de la especie <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NC7	Levaduras inactivadas, fosfato diamónico. Sin tiamina (vitamina B1)

En el mercado existen diferentes tipos de productos enológicos, destinados a su uso en diferentes etapas de la vinificación (al inicio, durante la etapa de fermentación tumultuosa, al final de la fermentación alcohólica, etc), y, por lo tanto, una gran diversidad de precios. Sin embargo, la mayoría presenta una composición a base de los mismos componentes (levaduras inactivadas, cortezas de levaduras, celulosa, fosfato diamónico y tiamina).

A pesar de que algunas casas comerciales, elaboran productos indicados como ecológicos o naturales, están formulados a partir de concentrados obtenidos de forma industrializada. Durante la cadena de producción del polen de abeja, como ya se describió, no existe ninguna etapa que utilice compuestos químicos o procesos industriales agresivos con el medio ambiente, lo que podría situar al polen de abeja en la corriente *Green Technology*, saludable con el medioambiente, frente a otros productos enológicos.

Para conocer su posicionamiento en el mercado de los nutrientes enológicos, se ha comparado frente a diferentes nutrientes de origen comercial (NC1-NC7) (Tabla 32). En la Figura 54 se muestran los costes de cada producto comercial, junto con el valor del polen a granel y envasado (€/Kg), frente al coste por dosis (0,25 g/L), tanto en polen como en activador comercial.

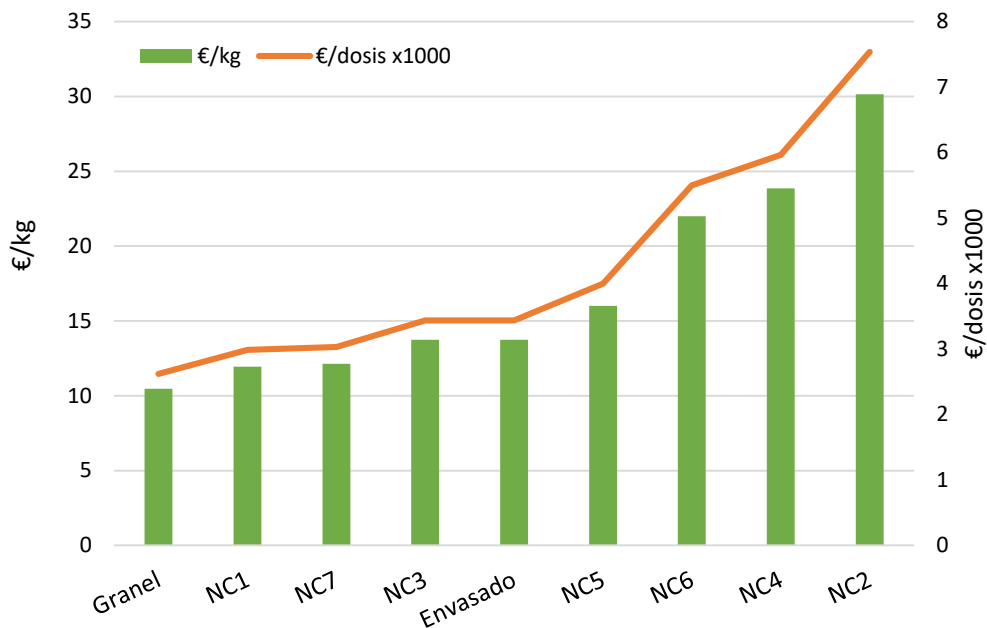


Figura 54. Costes nutrientes comerciales y polen (€/Kg) frente al coste por dosis (€/dosis)

El menor coste los presentó el polen a granel, como era de esperar, a pesar del laborioso trabajo y dedicación necesaria para su producción. En relación con el resto de productos, se observaron dos grupos, uno donde se encontraron los productos más económicos, formado por NC1, NC7, NC3, polen envasado y NC5, y otro grupo formado por los productos de mayor coste (NC6, NC4 y NC2). Dentro del grupo económico, el producto que presentó un valor más alto fue NC5, mientras que NC1 y NC7, presentaron valores similares. El polen envasado, presentó valores intermedios, coincidiendo en coste con NC3, por lo que podemos decir que el polen envasado presenta un coste de mercado medianamente bajo, en comparación con otros productos comerciales, siendo el coste más interesante el del polen a granel.

Cuando se analizaron los costes en función de la dosis empleada, se observó la misma tendencia en todos los casos. En primer lugar, estudiando las diferencias de costes respecto al polen a granel, se observaron incrementos en todos los casos (14 – 188 %). Los productos más económicos, mostraron incrementos más bajos, entre 14 % y 31,3 %. Sin embargo, en este caso, NC5 presentó un incremento de más del doble con respecto al polen a granel.

En los productos de mayor coste, los incrementos eran mucho mayores, como cabía esperar (110,1 % y 188 %). Estos resultados seguirían situando al polen envasado en una posición interesante, pese a que el polen con mayor rentabilidad en su uso como activador enológico, sería el polen a granel.

Cuando se compararon los costes con respecto al precio por dosis de polen envasado, se observaron tres comportamientos diferentes. Por un lado, el polen a granel, NC1 y NC7 presentaron los costes/dosis más bajas, entre un 11,8 % y un 23,9 %. Por otro, el polen envasado presentó el mismo coste que NC3, por lo que su coste/dosis permaneció invariable, mientras que el incremento más bajo se observó en NC5 (16,4 %). Y por último estarían el grupo de productos con mayor coste de mercado, que fueron los que mayor incremento presentaron con respecto al polen envasado. Mientras que NC6 y NC4, incrementaron sus costes un 60% y un 73,5 %, respectivamente, NC2 fue el producto con mayor incremento por dosis con un 119,3 %.

Estos resultados, vuelven a poner en valor el uso del polen como activador fermentativo, y situarlo en la industria enológica en una posición claramente rentable, tanto en su formato a granel como envasado.

4.5 BIBLIOGRAFÍA

- Almeida-Muradian, L. B., Pamplona, L. C., Coimbra, S., and Barth, O. M. (2005). Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(1), 105–111.
- Amores-Arrocha, A., Roldán, A., Jiménez-Cantizano, A., Caro, I., and Palacios, V. (2018). Evaluation of the use of multiflora bee pollen on the volatile compounds and sensorial profile of Palomino fino and Riesling white young wines. *Food Research International*, 105(November 2017), 197–209.
- Anzaldúa Morales, A. (1994). *La Evaluación Sensorial de los Alimentos en teoría y la práctica.* (Acribia, Ed.). Zaragoza, España.
- Arias-Gil, M., Garde-Cerdán, T., and Ancín-Azpilicueta, C. (2007). Influence of addition of ammonium and different amino acid concentrations on nitrogen metabolism in spontaneous must fermentation. *Food Chemistry*, 103(4), 1312–1318.
- Barbosa, C., Falco, V., Mendes-Faia, A., and Mendes-Ferreira, A. (2009). Nitrogen addition influences formation of aroma compounds, volatile acidity and ethanol in nitrogen deficient media fermented by *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 108(2), 99–104.
- Bayonove, C. (1998). *L'arôme variétal: le potentiel aromatique du raisin.* Paris: Lavoisier Tec et Doc.: In: C. Flanzky (Ed.), *Oenologie: fondements scientifiques et technologiques.*
- Bell, S.-J., and Henschke, P. (2005). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(3), 242–295.
- Bely, M., Sablayrolles, J. M., and Barre, P. (1990b). Description of alcoholic fermentation kinetics: its variability and significance. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41(4), 319–324.
- Bely, M., Sablayrolles, J.-M., and Barre, P. (1990a). Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in enological conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 70(4), 246–252.
- Bogdanov, S. (2017). *Pollen: Production, Nutrition and Health: A Review*, 1–36.
- Briche, E., Beltrando, G., Somot, S., and Quéno, H. (2014). Critical analysis of simulated daily temperature data from the ARPEGE-climate model: application to climate change in the Champagne wine-producing region. *Climatic Change*, 123(2), 241–254.
- Boulton, R. (1980). The general relationship between potassium, sodium and pH in grape juice and wine, 31(2), 2–6.
- Boulton, R. B., Llaguno Marchena, C., and Díaz Serrano, J. M. (2002). *Teoría y práctica de la elaboración del vino.*
- Buttery, R. G. (2010). Volatile Aroma/Flavor Components of Raisins (Dried Grapes). *Handbook of Fruit and Vegetable Flavors.*

- Campos, M. G. R., Bogdanov, S., de Almeida-Muradian, L. B., Szczesna, T., Mancebo, Y., Frigerio, C., and Ferreira, F. (2008). Pollen composition and standardisation of analytical methods. *Journal of Apicultural Research*, 47(2), 154–161.
- Campos, M. G., Cunha, A., and Markham, K. R. (1997). *Bee-Pollen. Bee Products*. Springer, Boston, MA.
- Chang, E. H., Jung, S. M., and Hur, Y. Y. (2014). Changes in the aromatic composition of grape cv. Cheongsoo wine depending on the degree of grape ripening. *Food Science and Biotechnology*, 23(6), 1761–1771.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J. N., and Lavigne, V. (1993). Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 62(2), 191–202.
- Cheng, G., Liu, Y., Yue, T., and Zhang, Z. (2015). Comparison between aroma compounds in wines from four *Vitis vinifera* grape varieties grown in different shoot positions, 35(2), 237–246.
- Cheyrier, V., Schneider, R., Salmon, J., and Fulcrand, H. (2010). Chemistry of Wine. *Comprehensive Natural Products II*, 1119–1172.
- Conrad, R. (2017). BEE POLLEN- AN OVERVIEW. *The Magazine of American Beekeeping*.
- Crouzet, J., and Flanzky, C. (1998). Les Enzymes En Oenologie. In *Oenologie, Fondements Scientifiques et Technologiques*. Paris: Ed.; Tec and Doc Lavoisier.
- Da Silva, G. R., da Natividade, T. B., Camara, C. A., da Silva, E. M. S., dos Santos, F. de A. R., and Silva, T. M. S. (2014). Identification of Sugar, Amino Acids and Minerals from the Pollen of Jandaíra Stingless Bees (*Melipona subnitida*). *Food and Nutrition Sciences*, 05(11), 1015–1021.
- De Revel, G., Martin, N., Pripis-Nicolau, L., Lonvaud-Funel, A., and Bertrand, A. (1999). Contribution to the knowledge of malolactic fermentation influence on wine aroma. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 47, 4003–4008.
- Davis, C. R., D. Wibowo, R. Eschenbruch, T. H. Lee, and G. H. Fleet. 1985. "Practical Implications of Malolactic Fermentation: A Review." *American Journal of Enology and Viticulture* 36(4):290–301.
- Delaquis, P., Cliff, M., King, M., Girard, B., Hall, J., and Reynolds, A. (2000). Effect of two commercial malolactic cultures on the chemical and sensory properties of Chancellor wines vinified with different yeasts and fermentation temperatures. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51, 42–48.
- De-melo, A. A. M., Estevinho, L. M., Delerue-matos, C., Moreira, M. M., and Alex, C. D. (2018). Phenolic profile by HPLC-MS, biological potential, and nutritional value of a promising food: Monofloral bee pollen. *Journal of Food Biochemistry*, (March).
- Di Stefano, R. (1991). Proposition d'une méthode de préparation de l'échantillon pour la détermination des terpènes libres et glycosides des raisins et des vins. *Bulletin OIV*.
- Dittrich, H. H. (1987). *Mikrobiologie des Weines*. Handbuch Der Lebensmitteltechnologie.

- Dombek, K. M., and Ingram, L. O. (1986). Magnesium Limitation and Its Role in Apparent Toxicity of Ethanol during Yeast Fermentation. *Microbiology*, 52(5), 975–981.
- Duarte, W. F., Dias, D. R., Oliveira, J. M., Teixeira, J. A., de Almeida e Silva, J. B., and Schwan, R. F. (2010). Characterization of different fruit wines made from cacao, cupuassu, gabioba, jaboticaba and umbu. *LWT - Food Science and Technology*, 43(10), 1564–1572.
- Dugelay, I., Gunata, Z., Sapis, J. C., Baumes, R., and Bayonove, C. (1993). Role of cinnamoyl esterase activities from enzyme preparations on the formation of volatile phenols during winemaking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(11), 2092–2096.
- Eglinton, J., Griesser, M., Henschke, P. A., Kwiatkowski, M. J., Parker, M., and Herderich, M. (2004). Yeast-mediated formation of pigmented polymers in red wine. *Proceedings Red Wine Color: Revealing the Mysteries*. In ACS Symposium Series 886 (pp. 7–21).
- Fairbairn, S., McKinnon, A., Musarurwa, H. T., Ferreira, A. C., and Bauer, F. F. (2017). The impact of single amino acids on growth and volatile aroma production by *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Frontiers in Microbiology*, 8(DEC).
- Ferreira, V., R. Lopez, and J. F. Cacho. 2000. "Quantitative Determination of the Odorants of Young Red Wines from Different Grape Varieties." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80(11):1659–67.
- Gambaro, A., Boido, E., Zlotejablko, A., Medina, K., Lloret, A., Dellacassa, E., and Carrau, F. (2001). Effect of malolactic fermentation on the aroma properties of Tannat wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7, 27–32.
- Garde-Cerdán, T., and Ancín-Azpilicueta, C. (2008). Effect of the addition of different quantities of amino acids to nitrogen-deficient must on the formation of esters, alcohols, and acids during wine alcoholic fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, 41(3), 501–510.
- Genovese, A., Gambuti, A., Piombino, P., and Moio, L. (2007). Sensory properties and aroma compounds of sweet Fiano wine. *Food Chemistry*, 103(4), 1228–1236.
- Gonzalez-paramas, A. M., Garcia-villanova, R. J., and Gonza, A. M. (2006). HPLC-fluorimetric method for analysis of amino acids in products of the hive (honey and bee-pollen), (January 2018)
- Gonzalez-Viñas, M. A., Perez-Coello, M. S., Salvador, M. D., Cabezudo, M. D., and Martin-Alvarez, P. J. (1996). Changes in gas-chromatographic volatiles of young Airen wines during bottle storage. *Food Chemistry*, 56(4), 399–403.
- Gutiérrez, A., Chiva, R., Sancho, M., Beltran, G., Arroyo-López, F. N., and Guillamon, J. M. (2012). Nitrogen requirements of commercial wine yeast strains during fermentation of a synthetic grape must. *Food Microbiology*, 31(1), 25–32.
- Hernández-Orte, P., Ibarz, M. J., Cacho, J., and Ferreira, V. (2005). Effect of the addition of ammonium and amino acids to musts of Airen variety on aromatic composition and sensory properties of the obtained wine. *Food Chemistry*, 89(2), 163–174.

- Houtman, A. C., and Du Plessis, C.S., 2017. Nutritional deficiencies of clarified white grape juices and their correction in relation to fermentation. *South African J. Enol. Vitic.* 7, 39–46.
- Human, H., and Nicolson, S. W. (2006). Nutritional content of fresh, bee-collected and stored pollen of *Aloe greatheadii* var. *davyana* (Asphodelaceae). *Phytochemistry*, 67(14), 1486–1492.
- ISO 3591 (1997). International standards for sensory analysis. Apparatus. Wines. Tasting glass. Genève, Switzerland: International Organization for Standardization.
- ISO 4120:2007 AENOR. (2008). Sensory analysis. Methodology. Triangle test (ISO 4120:2004).
- ISO 8587:2006 AENOR. (2010). Sensory analysis. Methodology. Ranking. ISO 8587:2006.
- Jackson, R. S. (2009). *Wine Tasting: A Professional Handbook*. (ACRIBIA, Ed.).
- Jerkovic, I. (2018). Gas Chromatography and Mass Spectrometry in Honey Fingerprinting: The Occurrence of 3,4-dihydro-3-oxoedulan and (E)-4-(r-1',t-2',c-4'-trihydroxy-3',6',6'-trimethylcyclohexyl)-but-3-en-2-one. In *International Journal of Chemical and Molecular Engineering* (Vol. 12, p. 81526).
- Komosinska-Vassev, K., Olczyk, P., Kaźmierczak, J., Mencner, L., and Olczyk, K. (2015). Bee pollen: Chemical composition and therapeutic application. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.
- Kotarska, K., Czupryński, B., and Kłosowski, G. (2006). Effect of various activators on the course of alcoholic fermentation. *Journal of Food Engineering*, 77(4), 965–971.
- Laha, R., and Ralte, and L. (2015). Study on honeybee (*Apis cerana*) forage plants in Mizoram, Northeast India. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 5(1), 197–204.
- Lamikanra, O., Inyang, I. D., and Leong, S. (1995). Distribution and effect of grape maturity on organic acid content of red muscadine grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(12), 3026–3028.
- Laurent, M.-H., Henick-Kling, T., and Acree, T. E. (1994). Changes in the aroma and odor of Chardonnay wine due to malolactic fermentation. *Viticultural and Enological Science*, 49, 3–10.
- Lee, P. R., Toh, M., Yu, B., Curran, P., and Liu, S. Q. (2013). Manipulation of volatile compound transformation in durian wine by nitrogen supplementation. *International Journal of Food Science and Technology*, 48(3), 650–662.
- Li, S., Bindon, K., Bastian, S. E. P., Jiranek, V., and Wilkinson, K. L. (2017). Use of Winemaking Supplements to Modify the Composition and Sensory Properties of Shiraz Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(7), 1353–1364.
- Li, H., Tao, Y. S., Wang, H., and Zhang, L. (2008). Impact odorants of Chardonnay dry white wine from Changli County (China). *European Food Research and Technology*, 227(1), 287–292.

- Lonvaud-Funel, A., Joyeux, A., and Desens, C. (1988). Inhibition of malolactic fermentation of wines by products of yeast metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 44(2), 183–191.
- Lukić, I., Radeka, S., Grozaj, N., Staver, M., and Peršurić, D. (2016). Changes in physico-chemical and volatile aroma compound composition of Gewürztraminer wine as a result of late and ice harvest. *Food Chemistry*, 196, 1048–1057.
- Maarse, H., Visscher, C. A., Willemsens, L. C., Nijssen, L. M., and Boelens, M. H. (1992). *Volatile Compounds in Foods. Qualitative and Quantitative Data (Vol. 1)*. Zeist: TNO-CIVO Food Analysis Institute, The Netherlands.
- MAPAMA. (2017). Subdirección general de estadística. Apícola. Ministerio de agricultura y pesca, alimentación y medioambiente. Madrid.
- Mayén Riego, M. (2005). *Compuestos fenólicos y del aroma diferenciadores de vinos generosos tipo fino y oloroso: Periodistas Asociados de Ciudad Real S.L.*
- Niimi, J., Danner, L., Li, L., Bossan, H., and Bastian, S. E. P. (2017). Wine consumers' subjective responses to wine mouthfeel and understanding of wine body. *Food Research International*, 99(May), 115–122.
- Ough, C., Davenport, M., and Joseph, K. (1989). Effects of Certain Vitamins on Growth and Fermentation Rate of Several Commercial Active Dry Wine Yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 40(3), 208–213.
- Peinado, R. A., Moreno, J., Bueno, J. E., Moreno, J. A., and Mauricio, J. C. (2004). Comparative study of aromatic compounds in two young white wines subjected to pre-fermentative cryomaceration. *Food Chemistry*, 84(4), 585–590.
- Pereira, A. P., Dias, T., Andrade, J., Ramalhosa, E., and Estevinho, L. M. (2009). Mead production: Selection and characterization assays of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food and Chemical Toxicology*, 47(8), 2057–2063.
- Perestrelo, R., Fernandes, A., Albuquerque, F. F., Marques, J. C., and Câmara, J. S. (2006). Analytical characterization of the aroma of Tinta Negra Mole red wine: Identification of the main odorants compounds. *Analytica Chimica Acta*, 563(1–2 SPEC. ISS.), 154–164.
- Quirós, M., Martínez-Moreno, R., Albiol, J., Morales, P., Vázquez-Lima, F., Barreiro-Vázquez, Antonio Ferrer, P., and Gonzalez, R. (2013). Metabolic Flux Analysis during the Exponential Growth Phase of *Saccharomyces cerevisiae* in Wine Fermentations. *PLoS ONE*, 8(8), 1–14.
- Rapp, A. (1998). Volatile flavour of wine: correlation between instrumental analysis and sensory perception. *Die Nahrung*, 42(6), 351–363.
- Reboredo-Rodríguez, P., González-Barreiro, C., Rial-Otero, R., Cancho-Grande, B., and Simal-Gándara, J. (2015). Effects of Sugar Concentration Processes in Grapes and Wine Aging on Aroma Compounds of Sweet Wines—A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(8), 1051–1071.

-
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., and Dubourdieu, D. (2012). *raité d'oenologie-Tome 2-6e éd. -Chimie du vin. Stabilisation et traitements.*
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donéche, B., and Lonvaud, A. (2003). *Tratado de enologia: Microbiología del vino. Vinificaciones.* Buenos Aires.
- Ribéreau-Gayon, P., Lafon-Lafourcade, S., and Bertrand, A. (1975). *Debourage des mouts de vendange blanche. Connaissance de la vigne et du vin.*
- Roldán, A., Van Muiswinkel, G. C. J., Lasanta, C., Palacios, V., and Caro, I. (2011). Influence of pollen addition on mead elaboration: Physicochemical and sensory characteristics. *Food Chemistry*, 126(2), 574–582.
- Ruiz, M. J., Zea, L., Moyano, L., and Medina, M. (2009). Aroma active compounds during the drying of grapes cv. Pedro Ximenez destined to the production of sweet Sherry wine. *European Food Research and Technology*, 230(3), 429–435.
- Sacchelli, S., Fabbrizzi, S., and Menghini, S. (2016). Climate change effects and adaptation strategies in the wine sector: a quantitative literature review. *Wine Economics and Policy*, 5(2), 114–126.
- Sánchez-Palomo, E., Trujillo, M., García Ruíz, A., and González Viñas, M. A. (2017). Aroma profile of malbec red wines from La Mancha region: Chemical and sensory characterization. *Food Research International*, 100(March), 201–208.
- Silva, T. M. S., Camara, C. A., da Silva Lins, A. C., Maria Barbosa-Filho, J., da Silva, E. M. S., Freitas, B. M., and de Assis Ribeiro dos Santos, F. (2006). Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6–7), 507–511.
- Silva, T. M. S., Camara, C. A., Lins, A. C. S., Agra, M. de F., Silva, E. M. S., Reis, I. T., and Freitas, B. M. (2009). Chemical composition, botanical evaluation and screening of radical scavenging activity of collected pollen by the stingless bees *Melipona rufiventris* (Uruçu-amarela). *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 81(2), 173–178.
- Slegers, A., Angers, P., Ouellet, É., Truchon, T., and Pedneault, K. (2015). Volatile compounds from grape skin, juice and wine from five interspecific hybrid grape cultivars grown in Québec (Canada) for wine production. *Molecules*, 20(6), 10980–11016.
- Stanley, G. A., Douglas, N. G., Every, E. J., Tzanatos, T., and Pamment, N. B. (1993). Inhibition and stimulation of yeast growth by acetaldehyde. *Biotechnology Letters*, 15(15), 1199–1204.
- Styger, G., Prior, B., and Bauer, F. F. (2011). Wine flavor and aroma. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(9), 1145–1159.
- Suárez-Lepe, J. A. (1997). *Levaduras vínicas. Funcionalidad y uso en bodega.* (Ediciones, pp. 110–111).
- Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. A., and Pretorius, I. (2005). (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 139–173.

-
- Szczesna, T. (2006). Long-Chain Fatty Acids Composition of Honeybee-Collected Pollen. *Journal of Apicultural Science*, 50(2), 65–79.
- Togores, J. H. (2011). *Tratado de enología I*. (Mundi-Pren).
- Trinh, T. T. T., Woon, W. Y., Yu, B., Curran, P., and Liu, S. Q. (2010). Effect of L-isoleucine and L-phenylalanine addition on aroma compound formation during longan juice fermentation by a co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Williopsis saturnus*. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 31(2), 116–124.
- Vidrih, R., and Hribar, J. (2007). Studies on the sensory properties of mead and the formation of aroma compounds related to the type of honey. *Acta Alimentaria*, 36(2), 151–162.
- Vilanova, M., Zamuz, S., Vilariño, F., and Sieiro, C. (2007). Effect of terroir on the volatiles of *Vitis vinifera* cv. Albariño. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(7), 1252–1256.
- Webb, L. B., Whetton, P. H., and Barlow, E. W. R. (2007). Modelled impact of future climate change on the phenology of winegrapes in Australia. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 13(3), 165–175.
- Xu, X., Sun, L., Dong, J., and Zhang, H. (2009). Breaking the cells of rape bee pollen and consecutive extraction of functional oil with supercritical carbon dioxide. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10(1), 42–46.
- Yilmaztekin, M., Erten, H., and Cabaroglu, T. (2009). Enhanced production of isoamyl acetate from beet molasses with addition of fusel oil by *Williopsis saturnus* var. *saturnus*. *Food Chemistry*, 112(2), 290–294.
- Zea, L., Moyano, L., Moreno, J., Cortes, B., and Medina, M. (2001). Discrimination of the aroma fraction of Sherry wines obtained by oxidative and biological ageing. *Food Chemistry*, 75(1), 79–84.
- Zeeman, W., Snyman, J. P., and van Wyk, C. J. (1982). The influence of yeast strain and malolactic fermentation on some volatile bouquet substances and on quality of table wines. In *Grape and Wine Centennial Symposium*, University of California, Davis.

CONCLUSIONES

5.1. CONCLUSIONES

1. El polen es una fuente directa y de reserva de nitrógeno fácilmente asimilable, que puede servir para enriquecer los mostos de uva blanca y tinta, antes y durante la fermentación alcohólica.
2. Desde el punto de vista cinético, el polen disminuye los tiempos de latencia, aumentando la velocidad de crecimiento y las poblaciones máximas de levaduras, así como su supervivencia en la fase final de la fermentación alcohólica.
3. La aplicación de polen a dosis bajas (0,1 y 0,25 g/L) no altera la composición físico-química ni los parámetros de color de los vinos blancos y tintos. Sin embargo, cuando se aplica a dosis elevadas (5, 10 y 20 g/L) en vinos blancos, se produce un aumento significativo en la intensidad colorante (IC), la absorbancia a 420 nm y la componente b* de los parámetros cromáticos CIELab, que pueden afectar a su calidad sensorial final.
4. La adición de polen en los mostos de uva blanca y tinta, produce un aumento de la concentración de los compuestos volátiles totales de los vinos finales, destacando sobre todo las familias de los alcoholes superiores, los ésteres y los terpenos, y específicamente en el caso de tintos, las familias de los fenoles, tioles y norisoprenoides.
5. La aplicación de polen a dosis bajas (0,1 y 0,25 g/L) aumentan los niveles totales de los VAO y las series aromáticas correspondientes al carácter afrutado y floral de los vinos blancos como en tintos, mientras que las dosis elevadas aumentan las series aromáticas grasa y herbácea.
6. El análisis sensorial descriptivo determina que las dosis bajas de polen (0,1 y 0,25 g/L) son las que obtienen las mayores puntuaciones en la valoración global y en

los atributos sensoriales responsables de los aromas afrutados y florales tanto en vinos blancos como en tintos.

7. Los estudios de validación y comparación del polen con un activador fermentativo comercial demuestran que:
 - El uso de polen a una dosis entre 0,2 y 0,25 g/L, produce en comparación con el activador comercial, una mejora en la cinética fermentativa y en el crecimiento de las levaduras durante la fase exponencial, permitiendo un mayor grado de supervivencia en el final de fermentación.
 - El uso de polen a una dosis entre 0,2 y 0,25 g/L produce, en comparación con el activador comercial, un aumento en la formación de compuestos volátiles, fundamentalmente alcoholes superiores, ésteres y terpenos, que se traduce en un incremento de los VAO de las series aromáticas afrutadas y florales.
 - Los resultados del análisis sensorial descriptivo junto con la aplicación de la prueba triangular y el test de ordenación muestran que, en la mayor parte de los casos, los vinos con mejores características sensoriales y con mayor preferencia han sido los elaborados con polen de abeja en comparación con el activador fermentativo.
8. Por todo ello, consideramos que el polen de abeja puede ser una alternativa viable, natural y económica, con capacidad para actuar como activador o nutriente de las levaduras durante la fermentación alcohólica, y para mejorar el perfil aromático afrutado y floral de los vinos jóvenes blancos y tintos.

5.2. CONCLUSIONS

1. Bee pollen is a direct and reserve source of nitrogen easily assimilated by yeasts, which can serve to enrich the must of white and red grapes, before and during alcoholic fermentation.
2. From the kinetic point of view, bee pollen decreases latency times, increasing the growth rate and the maximum yeasts populations, as well as their survival in the final stage of alcoholic fermentation.
3. Bee pollen application at low doses (0.1 and 0.25 g/L) does not alter the physicochemical composition or the color parameters of white and red wines. However, when high doses (5, 10 and 20 g/L) are used in white wines, there is a significant increase in colour intensity (CI), absorbance at 420 nm and component b* of CIELab chromatic parameters, which can affect its final sensory quality.
4. Bee pollen addition in the white and red grape musts, produces an increase in the total volatile compounds concentration of final wines, highlighting higher alcohols, esters and terpenes families, and specifically, phenols, thiols and norisoprenoids, in red wines.
5. Bee pollen application at low doses (0.1 and 0.25 g/L) increase total OAV levels and the aromatic series corresponding to fruity and floral characters of the white wines as in reds, while the high doses increase fatty and grassy odorant series.
6. The descriptive sensory analysis shows that low doses of bee pollen (0.1 and 0.25 g/L) are the best-scored doses in the overall assessment, and also in the attributes corresponding to the fruity and floral aromas, both in white wines as in red wines.

7. Validation and comparison studies of bee pollen with a commercial fermentative activator show that:

- Bee pollen use at a dose between 0.2 and 0.25 g/L, compared to a commercial activator, produces an improvement in fermentative kinetics and in the growth of yeast populations during the exponential phase, allowing greater degree of survival at the end of alcoholic fermentation.
- Bee pollen used at a dose between 0.2 and 0.25 g/L, compared to a commercial activator, increase volatile compounds formation, mainly higher alcohols, esters and terpenes, which translates into an increase in the OAV of fruity and floral odorant series.
- Descriptive sensory analysis results together with the information obtained by applying triangular test and ordination test show that, in most cases, wines with better sensory characteristics and with greater preference have been those made with bee pollen in comparison with the commercial activator.

8. Therefore, we consider that bee pollen can be a viable, natural and economic alternative, with the capacity to act as an activator or nutrient for yeasts during alcoholic fermentation, and to improve fruity and floral aromatic profile of young white and red wines.

ANEXOS

Tabla 33. Umbral de percepción del olor (OPT), descriptores de olor y serie odorante de los compuestos volátiles encontrados en los vinos

Compuestos volátiles	Umbral ^a	Descriptor del aroma	Serie aromática
Alcoholes superiores^b			
alcohol n-propílico	50	Fresco, afrutado	Herbáceo
Isobutanol	30	Afrutado, parecido al vino	Afrutado
Alcohol isoamílico ^c	30	Fruta madura, dulce/químico ^d	Fruta
Ácidos			
Ácido butanoico	173	Queso	Graso
Ácido 3-metil-butanoico	33	Queso	Graso
Ácido hexoxánico	420	Queso, rancio	Graso
Ácido heptanoico	1000	Graso, seco	Graso
Ácido octanoico	500	Aceite vegetal, rancio, áspero	Graso
ácido n-decanoico	1000	Graso, desagradable	Graso
Ácido benzoico	1000	Químico	Químico
Ácido bencenoacético	2500	Miel, polen	Floral
Alcoholes C-6			
1-hexanol	1100	Herbácea, hierba, madera	Herbáceo
3-hexen-1-ol-(E)	400	Fresco	Herbáceo
3-hexen-1-ol-(Z)	400	Hierba recién cortada	Herbáceo
Alcoholes			
1-pentanol	676000	Herbáceo	Herbáceo
4-metil-1-pentanol	50000	Nueces	Fruta seca
3-metil-1-pentanol	1000	Suelo, hongo	Terroso, hongo
3-etoxi-1-propanol	50000	Afrutado	Afrutado
1-octanol	120	Cítricos intensos, rosas	Afrutado
Alcohol bencílico	900	Aroma de mora	Afrutado
Alcohol feniletílico	10000	Rosas, miel, lila, floral, polen	Floral
1-butanol	150000	Medicinal	Fenólico
Fenoles			
4-etilfenol	440	Corral, medicinal, fenólico	Fenólico
4-vinilguaicol	40	Pimienta negra, clavo, madera	Especiado
Acetovainillina	1000	Vainilla dulce, clavo	Especiado
Terpenos y derivados			
Óxido de linalool	6	Fresco, dulce, floral	Floral
Linalool	15	Flores, violetas y naranjas	Floral
a-terpineol	250	Verde, floral, fresco	Herbáceo
(R)-(+)-β-Citronellol	100	Rosal, clavo de olor, rosa, fresco	Floral
Ésteres			
Acetato de etilo	12	Piña	Afrutado
Butirato de etilo	20	Fruta pasada, manzana	Afrutado
Isovalerato de etilo	3	Fruta fresca, naranja, bayas, mora	Afrutado
Acetato de isoamilo	30	Plátano	Afrutado
Hexanoato de etilo	5	Manzana verde, afrutada	Afrutado
Acetato de hexilo	670	Pera, agradable frutado	Afrutado
Octanoato de etilo	5	Piña, pera, floral, dulce	Afrutado
Nonanoato de etilo	1300	Rosa, afrutado	Floral
Ethyl 2-hydroxy-4-methylpentanoate	51	Arándano, aroma de aceite de valeriana	Afrutado
Decanoato de etilo	200	Dulce, afrutado, fruta seca	Afrutado
Succinato de dietilo	1200	Afrutado, melón	Afrutado
Fenilacetato de etilo	75	Miel	Floral
Acetato de fenitilo	250	Agradable, florido, rosas	Floral
Malato de dietilo	10	Afrutado	Afrutado
Vainillato de metilo	3000	Vainilla	Especiado
Lactato de etilo	154636	Graso	Graso
Dodecanoato de etilo	800	Floral, con notas afrutadas	Floral
Ácido hexadecanoico, éster etílico	1500	Afrutado, dulce	Afrutado

Aldehídos			
Acetaldehído ^b	10	Almendra amarga	Fruta seca
Benzeneacetaldehído	5	Floral, rosa	Floral
Nonanal	1	Naranjas, rosas	Afrutado
3-metil-butanal	4,6	Malteado, acervezado	Afrutado
Tioles			
3-metil-1-propanol	1000	Patata cocida	Terroso
Lactonas			
Dihidro-5-pentil-2(3H)-furanona	1500	Afrutado, dulce	Afrutado

^aEl cálculo del VAO se realizó dividiendo la concentración de los compuestos por su concentración umbral ($\mu\text{g/L}$, mg/L) descrita en la bibliografía (Duarte et al., 2010; Lukić et al., 2016; Perestrelo et al., 2006; Slegers et al., 2015; Chang et al., 2014; Cheng et al., 2015; Li et al., 2017; Mayén Riego 2005; Sánchez-Palomo et al., 2017; Zea et al., 2001). ^bValores umbral (mg/L). ^cOlor químico concentraciones superior a 400 mg/L (Vidrih and Hribar, 2007)

Tabla 34. Concentración de los compuestos volátiles ($\mu\text{g/L}$) en vinos blancos de Palomino fino (control, polen y activador comercial).

Parámetros	Control	Polen	Comercial
Alcoholes superiores			
2-propanol	419790,9 \pm 7150,0 ^a	400774,7 \pm 14870,0 ^a	404816,4 \pm 2700,0 ^a
alcohol n-propílico	7851,7 \pm 80,0 ^a	4734,1 \pm 100,0 ^b	4864,3 \pm 60,0 ^b
Isobutanol	29588,9 \pm 1040,0 ^a	29268,0 \pm 820,0 ^a	32853,1 \pm 770,0 ^b
Alcohol isoamílico	268385,1 \pm 7622,0 ^a	347966,3 \pm 915,2 ^b	229924,9 \pm 4033,7 ^c
Total	725616,6 \pm 15892,0	782743,0 \pm 16705,2	672458,7 \pm 7563,7
% Alcoholes superiores	86,16%	90,20%	90,22%
Metanol			
Total	38822,5 \pm 1480,0 ^a	38881,3 \pm 1690,0 ^a	38432,2 \pm 720,0 ^a
% Metanol	4,61%	4,48%	5,16%
Ácidos			
Ácido butanoico	32,8 \pm 0,7 ^a	30,2 \pm 0,1 ^a	31,0 \pm 0,3 ^a
Ácido 3-metil-butanoico	200,0 \pm 0,3 ^a	199,8 \pm 1,8 ^a	220,5 \pm 1,0 ^b
Ácido hexanoico	1811,4 \pm 176,4 ^a	627,2 \pm 3,0 ^b	964,9 \pm 18,3 ^c
Ácido heptanoico	37,6 \pm 1,5 ^a	38,4 \pm 2,1 ^a	75,2 \pm 3,4 ^b
Ácido 2-hexenoico	37,2 \pm 0,4 ^a	42,0 \pm 0,8 ^b	45,2 \pm 0,6 ^b
Ácido octanoico	2790,4 \pm 131,3 ^a	1427,5 \pm 4,3 ^b	1899,9 \pm 33,6 ^c
Ácido nonanoico	15,3 \pm 1,2 ^a	6,3 \pm 0,3 ^b	5,0 \pm 0,1 ^b
Ácido n-decanoico	794,9 \pm 14,0 ^a	638,0 \pm 35,8 ^b	926,1 \pm 7,5 ^c
Ácido 9-decenoico	248,6 \pm 32,3 ^a	108,1 \pm 1,4 ^b	164,1 \pm 8,9 ^c
Ácido benzoico	94,1 \pm 1,0 ^a	80,6 \pm 4,7 ^b	101,2 \pm 12,6 ^a
Ácido bencenoacético	9,8 \pm 0,3 ^a	15,0 \pm 0,7 ^b	8,4 \pm 0,6 ^c
Total	6072,0 \pm 359,4	3213,1 \pm 54,9	4441,5 \pm 86,8
% Ácidos	0,72%	0,37%	0,60%
Alcoholes C-6			
1-Hexanol	752,0 \pm 7,8 ^a	590,2 \pm 4,3 ^a	613,3 \pm 9,0 ^a
(E) -3-hexen-1-ol	15,2 \pm 0,3 ^a	21,1 \pm 1,5 ^a	16,2 \pm 1,0 ^a
(Z) -3-hexen-1-ol	56,2 \pm 64,2 ^a	105,4 \pm 1,7 ^b	119,4 \pm 3,6 ^b
Total	823,5 \pm 72,3	716,6 \pm 7,4	748,9 \pm 13,5
% Alcoholes C-6	0,10%	0,08%	0,10%
Alcoholes			
3-penten-2-ol	10,0 \pm 0,5 ^a	18,1 \pm 0,2 ^b	15,2 \pm 2,0 ^c
1-pentanol	2185,7 \pm 7,0 ^a	1474,5 \pm 102,0 ^b	1170,5 \pm 12,4 ^c
3-etil-2-pentanol	8,2 \pm 0,1 ^a	10,2 \pm 0,2 ^b	7,2 \pm 0,2 ^c
4-metil-1-pentanol	10,9 \pm 0,6 ^a	15,7 \pm 0,1 ^b	16,7 \pm 0,1 ^b
3-metil-1-pentanol	92,8 \pm 5,6 ^a	114,7 \pm 0,3 ^b	117,6 \pm 5,6 ^b
3-etoxi-1-propanol	87,7 \pm 0,7 ^a	79,5 \pm 0,7 ^{a,b}	76,8 \pm 0,4 ^b
1-octanol	17,1 \pm 1,9 ^a	43,2 \pm 1,0 ^b	43,0 \pm 2,5 ^b
1-nonanol	8,9 \pm 0,1 ^a	11,2 \pm 1,5 ^b	12,0 \pm 0,7 ^b
Alcohol bencílico	44,8 \pm 1,2 ^a	78,9 \pm 1,6 ^b	41,6 \pm 1,0 ^a
Alcohol feniletílico	1236,5 \pm 316,7 ^a	2119,0 \pm 111,5 ^b	2102,9 \pm 6,0 ^b
1H-indol-3-etanol	3240,6 \pm 113,5 ^a	132,9 \pm 0,1 ^b	105,0 \pm 3,9 ^b
Total	6943,3 \pm 447,9	4098,0 \pm 219,2	3708,5 \pm 34,9
% Alcoholes	0,82%	0,47%	0,50%
Terpenes			
Óxido de linalool	7,0 \pm 0,2 ^a	10,9 \pm 0,9 ^b	10,1 \pm 0,1 ^b
Linalool	8,1 \pm 0,2 ^a	15,1 \pm 0,9 ^b	10,8 \pm 0,5 ^c
α -terpineol	11,0 \pm 0,3 ^a	15,8 \pm 0,5 ^b	14,0 \pm 0,7 ^c

(R)-(+)-β-citronelol	9,4 ± 0,7 ^a	13,8 ± 0,8 ^b	10,1 ± 0,1 ^a
2,6-dimethyl-3,7-octadiene, -2,6-diol	29,3 ± 2,5 ^a	32,3 ± 1,5 ^a	22,3 ± 1,3 ^b
8-hydroxylinalool	40,9 ± 0,1 ^a	48,9 ± 4,2 ^b	39,4 ± 3,0 ^a
Total	105,6 ± 3,9	136,8 ± 8,8	106,6 ± 5,7
% Terpenos	0,013%	0,016%	0,014%
Ésteres			
Acetato de etilo	11164,9 ± 90,0 ^a	11469,9 ± 20,0 ^a	8783,8 ± 350,0 ^b
Butirato de etilo	5,8 ± 0,7 ^a	56,1 ± 2,1 ^b	36,3 ± 1,3 ^c
Isovalerato de etilo	7,1 ± 0,4 ^a	19,1 ± 0,0 ^b	8,3 ± 0,1 ^a
Acetato de isoamilo	65,6 ± 0,8 ^a	79,3 ± 1,2 ^b	52,9 ± 0,8 ^c
Hexanoato de etilo	114,9 ± 5,1 ^a	173,7 ± 3,0 ^b	119,8 ± 14,0 ^a
Acetato de hexilo	2,8 ± 0,2 ^a	4,3 ± 0,9 ^b	1,8 ± 0,2 ^c
2-hydrody-3-metil butanoato de etilo	2,9 ± 0,1 ^a	10,7 ± 0,6 ^b	8,9 ± 0,1 ^c
Octanoato de etilo	215,5 ± 18,4 ^a	436,9 ± 37,5 ^b	207,4 ± 6,6 ^a
Nonanoato de etilo	8,3 ± 0,8 ^a	15,7 ± 0,2 ^b	12,6 ± 0,6 ^c
2-hidroxy-4- metilpentanoato de etilo	14,7 ± 2,9 ^a	26,5 ± 0,1 ^b	22,0 ± 1,8 ^c
Lactado de isoamilo	14,6 ± 0,6 ^a	23,6 ± 0,4 ^b	15,9 ± 0,1 ^a
Decanoato de etilo	46,6 ± 1,1 ^a	57,5 ± 2,1 ^b	48,0 ± 0,2 ^a
Succinato de dietilo	572,6 ± 18,4 ^a	954,7 ± 57,7 ^b	460,4 ± 31,8 ^c
9-decenoato de etilo	61,2 ± 1,5 ^a	80,0 ± 1,6 ^b	61,4 ± 1,6 ^a
Fenilacetato de etilo	1,2 ± 0,1 ^a	3,4 ± 0,2 ^b	2,3 ± 0,2 ^c
Acetato de fenetilo	54,3 ± 5,0 ^a	108,8 ± 1,3 ^b	97,5 ± 3,4 ^c
Malato de dietilo	28,3 ± 0,8 ^a	47,7 ± 1,6 ^b	29,6 ± 3,5 ^a
3-hidroxytridecanoato de etilo	28,7 ± 0,1 ^a	91,5 ± 2,8 ^b	66,1 ± 4,6 ^c
Vainillato de metilo	1,7 ± 0,1 ^a	6,2 ± 0,0 ^b	4,3 ± 0,3 ^c
Total	1246,6 ± 146,9	13665,6 ± 133,5	10039,3 ± 421,2
% Ésteres	0,15%	1,58%	1,35%
Aldehídos			
Acetaldehído	62513,36 ± 3140,0 ^a	24201,6 ± 980,0 ^b	15325,5 ± 200,0 ^c
Benzeneacetaldehído	77,0 ± 0,7 ^a	103,3 ± 1,4 ^b	68,9 ± 1,4 ^c
Total	62590,3 ± 3140,7	24304,9 ± 981,4	15394,4 ± 201,4
% Aldehídos	7,43%	2,80%	2,07%

Diferentes letras en superíndice indican que existen diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$), obtenido mediante ANOVA bidireccional, aplicando la prueba de análisis múltiple de Bonferroni (BSD).

Tabla 35. Concentración de los compuestos volátiles ($\mu\text{g/L}$) en vinos blancos de Riesling (control, polen y activador comercial).

Parámetros	Control	Polen	Comercial
Alcoholes superiores			
2-propanol	475417,7 \pm 5480,0 ^a	489359,4 \pm 23570,0 ^a	297882,7 \pm 14560,0 ^b
Alcohol n-propílico	2090,0 \pm 50,0 ^a	1580,0 \pm 60,0 ^b	2090,0 \pm 60,0 ^a
Isobutanol	13315,3 \pm 223,3 ^a	11882,7 \pm 580,0 ^b	13171,6 \pm 236,7 ^a
Alcohol isoamílico	151227,3 \pm 6537,1 ^a	152178,0 \pm 7425,3 ^{a,b}	163143,3 \pm 3056,3 ^b
Total	642050,2 \pm 12290,4	655000,2 \pm 31635,3	476287,6 \pm 17913,0
% Alcoholes superiores	91,64%	89,32%	87,46%
Metanol			
Total	19623,5 \pm 920,0 ^a	15773,9 \pm 410,0 ^b	15497,5 \pm 760,0 ^b
% Metanol	2,80%	2,15%	2,85%
Ácidos			
Ácido butanoico	9,6 \pm 0,1 ^a	20,7 \pm 0,7 ^b	26,0 \pm 0,7 ^c
Ácido 3-metil-butanoico	94,3 \pm 4,3 ^a	113,1 \pm 0,9 ^b	127,0 \pm 3,6 ^b
Ácido hexanoico	1397,3 \pm 99,7 ^a	1407,5 \pm 222,8 ^a	1460,2 \pm 181,3 ^a
Ácido heptanoico	22,3 \pm 2,3 ^a	22,7 \pm 2,8 ^a	36,2 \pm 6,0 ^b
Ácido 2-hexenoico	33,6 \pm 0,7 ^a	55,7 \pm 0,3 ^b	56,8 \pm 0,3 ^b
Ácido octanoico	2746,1 \pm 153,7 ^a	1242,1 \pm 1,1 ^b	2928,1 \pm 233,2 ^a
Ácido nonanoico	7,2 \pm 0,3 ^a	15,7 \pm 0,1 ^b	19,7 \pm 0,8 ^c
Ácido n-decanoico	96,1 \pm 2,4 ^a	197,2 \pm 1,5 ^b	194,1 \pm 1,1 ^b
Ácido 9-decenoico	89,1 \pm 6,7 ^a	152,9 \pm 7,2 ^b	175,5 \pm 4,6 ^c
Ácido benzoico	77,7 \pm 2,3 ^a	122,0 \pm 0,3 ^b	125,8 \pm 0,1 ^b
Ácido bencenoacético	8,1 \pm 0,2 ^a	16,0 \pm 0,7 ^b	17,1 \pm 0,4 ^b
Total	4581,4 \pm 272,6	3365,5 \pm 238,4	5166,5 \pm 432,0
% Ácidos	0,65%	0,46%	0,95%
Alcoholes C-6			
1-Hexanol	432,1 \pm 10,6 ^a	554,3 \pm 10,8 ^b	459,5 \pm 3,6 ^c
(E) -3-hexen-1-ol	15,0 \pm 0,6 ^a	37,6 \pm 0,7 ^b	29,2 \pm 0,7 ^c
(Z) -3-hexen-1-ol	26,7 \pm 2,8 ^a	106,1 \pm 2,5 ^b	85,0 \pm 4,0 ^c
Total	473,8 \pm 14,0	697,9 \pm 14,0	573,6 \pm 8,4
% Alcoholes C-6	0,07%	0,10%	0,11%
Alcoholes			
3-penten-2-ol	13,5 \pm 1,4 ^a	23,9 \pm 0,7 ^b	27,9 \pm 2,4 ^c
1-pentanol	1190,6 \pm 81,9 ^a	1094,6 \pm 36,0 ^b	1245,0 \pm 57,6 ^a
3-etil-2-pentanol	6,3 \pm 0,1 ^a	22,4 \pm 0,4 ^b	24,3 \pm 1,7 ^c
4-metil-1-pentanol	13,7 \pm 0,8 ^a	33,3 \pm 2,2 ^b	43,0 \pm 1,6 ^c
3-metil-1-pentanol	62,6 \pm 4,2 ^a	156,4 \pm 2,0 ^b	89,3 \pm 8,8 ^c
3-etoxi-1-propanol	8,5 \pm 0,1 ^a	9,6 \pm 0,2 ^b	10,7 \pm 0,8 ^c
1-octanol	36,9 \pm 1,4 ^a	42,5 \pm 0,0 ^b	30,8 \pm 1,0 ^c
1-nonanol	8,9 \pm 0,3 ^a	27,0 \pm 0,3 ^b	24,6 \pm 0,1 ^c
Alcohol bencílico	54,2 \pm 0,6 ^a	64,8 \pm 1,9 ^b	43,5 \pm 1,5 ^c
Alcohol feniletílico	4432,3 \pm 189,3 ^a	1200,7 \pm 114,5 ^b	1047,5 \pm 14,1 ^b
1H-indol-3-etanol	617,2 \pm 0,3 ^a	116,6 \pm 2,4 ^b	104,2 \pm 1,4 ^b
Total	6444,6 \pm 280,3	2791,7 \pm 160,5	2690,6 \pm 91,0
% Alcoholes	0,92%	0,38%	0,49%
Terpenes			
Óxido de linalool	9,0 \pm 0,2 ^a	16,3 \pm 0,8 ^b	11,7 \pm 0,7 ^c
Linalool	4,5 \pm 0,3 ^a	15,1 \pm 1,5 ^b	11,1 \pm 0,2 ^c
α -terpineol	12,2 \pm 0,7 ^a	26,8 \pm 0,1 ^b	17,2 \pm 0,7 ^c

(R)-(+)- β -citronelol	4,5 \pm 0,2 ^a	16,5 \pm 1,1 ^b	16,0 \pm 0,3 ^b
2,6-dimethyl-3,7-octadiene, -2,6-diol	70,4 \pm 0,1 ^a	94,6 \pm 1,7 ^b	66,3 \pm 4,5 ^a
8-hydroxylinalool	6,7 \pm 0,4 ^a	24,2 \pm 1,6 ^b	22,5 \pm 2,0 ^b
Total	107,4 \pm 1,9	193,4 \pm 6,8	144,8 \pm 8,4
% Terpenos	0,02%	0,03%	0,03%
Ésteres			
Acetato de etilo	17797,2 \pm 590,0 ^a	12172,1 \pm 314,1 ^b	13628,0 \pm 80,0 ^c
Butirato de etilo	7,3 \pm 0,1 ^a	25,8 \pm 0,2 ^b	21,3 \pm 1,2 ^c
Isovalerato de etilo	2,1 \pm 0,1 ^a	10,9 \pm 0,5 ^b	9,7 \pm 0,4 ^c
Acetato de isoamilo	111,2 \pm 11,4 ^a	589,9 \pm 4,5 ^b	560,6 \pm 53,0 ^b
Hexanoato de etilo	51,0 \pm 0,6 ^a	244,2 \pm 3,1 ^b	159,5 \pm 11,5 ^c
Acetato de hexilo	2,7 \pm 0,2 ^a	13,6 \pm 0,8 ^b	13,2 \pm 0,3 ^b
2-hydrody-3-metil butanoate de etilo	4,2 \pm 0,4 ^a	16,1 \pm 0,4 ^b	12,6 \pm 1,0 ^c
Octanoato de etilo	565,6 \pm 13,4 ^a	757,3 \pm 55,7 ^b	410,1 \pm 5,4 ^c
Nonanoato de etilo	9,0 \pm 0,2 ^a	17,0 \pm 0,6 ^b	14,0 \pm 0,2 ^c
2-hidroxy-4-metilpentanoato de etilo	19,8 \pm 1,6 ^a	60,0 \pm 4,4 ^b	58,9 \pm 5,7 ^b
Isoamyl lactate	21,2 \pm 0,7 ^a	43,0 \pm 1,2 ^b	21,7 \pm 2,1 ^a
Decanoato de etilo	55,0 \pm 2,6 ^a	124,9 \pm 10,9 ^b	121,6 \pm 3,5 ^b
Succinato de dietilo	663,0 \pm 0,1 ^a	1435,3 \pm 63,4 ^b	871,8 \pm 83,3 ^c
9-decenoato de etilo	13,1 \pm 0,3 ^a	32,3 \pm 0,1 ^b	29,3 \pm 0,8 ^c
Fenilacetato de etilo	2,0 \pm 0,2 ^a	4,1 \pm 0,1 ^b	2,4 \pm 0,2 ^c
Acetato de fenetilo	58,7 \pm 1,0 ^a	242,7 \pm 14,4 ^b	170,6 \pm 8,7 ^c
Malato de dietilo	30,8 \pm 0,7 ^a	60,7 \pm 0,6 ^b	40,4 \pm 0,8 ^c
3-hidroxytridecanoato de etilo	10,5 \pm 0,1 ^a	24,1 \pm 1,2 ^b	16,7 \pm 1,4 ^c
Vainillato de metilo	18,6 \pm 0,3 ^a	46,8 \pm 0,6 ^b	36,3 \pm 4,2 ^c
Total	1645,8 \pm 624,0	15920,5 \pm 476,8	16198,7 \pm 263,5
% Ésteres	0,23%	2,17%	2,97%
Aldehídos			
Acetaldehído	25673,4 \pm 1360,0 ^a	39435,7 \pm 1410,0 ^b	27900,3 \pm 1280,0 ^a
Benzeneacetaldehído	30,0 \pm 0,1 ^a	101,8 \pm 1,0 ^b	97,8 \pm 1,6 ^b
Total	25703,4 \pm 1360,1	39537,5 \pm 1411,0	27998,1 \pm 1281,6
% Aldehídos	3,67%	5,39%	5,14%

Diferentes letras en superíndice indican que existen diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$), obtenido mediante ANOVA bidireccional, aplicando la prueba de análisis múltiple de Bonferroni (BSD).

Tabla 36. Concentración de los compuestos volátiles ($\mu\text{g/L}$) en vinos blancos de Tintilla de Rota (control, polen y activador comercial).

Parámetros	Control	Polen	Comercial
<u>Alcoholes superiores</u>			
2 - Propanol	293773,7 \pm 13302,9 ^a	379849,2 \pm 14140,0 ^b	302480,2 \pm 8707,4 ^a
N-propilo	1306,8 \pm 20,0 ^a	4529,0 \pm 20,0 ^b	3141,0 \pm 60,0 ^c
Isobutanol	23210,1 \pm 500,0 ^a	19253,6 \pm 760,0 ^b	20531,5 \pm 820,0 ^b
Alcohol isoamílico	246833,3 \pm 3329,3 ^a	276725,2 \pm 6681,7 ^b	273487,4 \pm 10275,4 ^b
Total	565123,9 \pm 17152,3	680357,1 \pm 21601,7	599640,2 \pm 19862,8
% Alcoholes superiores	80,20%	86,04%	84,34%
Metanol	63489,4 \pm 3570,0 ^a	55928,6 \pm 1160,0 ^b	61709,1 \pm 1139,8 ^a
Total	63489,4 \pm 3570,0	55928,6 \pm 1160,0	61709,1 \pm 1139,8
% Metanol	9,01%	7,07%	8,68%
<u>Ácidos</u>			
Ácido butanoico	29,4 \pm 0,7 ^a	30,7 \pm 0,7 ^a	33,8 \pm 0,4 ^b
Ácido 3-metil-butanoico	190,4 \pm 2,6 ^a	177,2 \pm 2,4 ^a	181,2 \pm 1,4 ^a
Ácido hexanoico	572,4 \pm 24,4 ^a	446,0 \pm 59,8 ^b	370,9 \pm 18,2 ^c
Ácido heptanoico	26,0 \pm 0,9 ^a	23,3 \pm 0,7 ^b	27,2 \pm 0,9 ^a
Ácido 2-Hexenoico	34,1 \pm 1,2 ^a	38,4 \pm 0,7 ^b	40,1 \pm 0,1 ^b
Ácido octanoico	1476,8 \pm 93,5 ^a	883,8 \pm 68,8 ^b	1185,9 \pm 19,7 ^c
Ácido nonanoico	88,5 \pm 0,1 ^a	87,4 \pm 2,5 ^a	88,3 \pm 2,5 ^a
Ácido n-Decanoico	726,9 \pm 7,4 ^a	362,2 \pm 32,0 ^b	403,7 \pm 15,4 ^b
Ácido 9-Decenoico	36,2 \pm 1,9 ^a	41,4 \pm 0,7 ^b	43,3 \pm 2,7 ^b
Ácido benzoico	71,6 \pm 1,4 ^a	130,5 \pm 14,1 ^b	134,6 \pm 15,2 ^b
Ácido bencenoacético	46,1 \pm 3,6 ^a	39,6 \pm 2,3 ^b	52,8 \pm 0,6 ^c
Total	3298,4 \pm 137,6	2260,6 \pm 184,7	2561,8 \pm 77,0
% Ácidos	0,47%	0,29%	0,36%
<u>Alcoholes C-6</u>			
1-Hexanol	405,8 \pm 3,1 ^a	367,5 \pm 34,7 ^a	325,6 \pm 16,5 ^b
(E)-3-Hexen-1-ol	15,9 \pm 0,4 ^a	31,1 \pm 1,6 ^b	27,0 \pm 0,7 ^c
(Z)-3-Hexen-1-ol	23,9 \pm 0,8 ^a	26,7 \pm 1,2 ^b	22,4 \pm 1,4 ^a
Total	445,5 \pm 4,3	425,3 \pm 37,5	375,0 \pm 18,5
% Alcoholes C-6	0,06%	0,05%	0,05%
<u>Alcoholes</u>			
3-Penten-2-ol	14,1 \pm 1,1 ^a	27,9 \pm 0,4 ^b	32,3 \pm 1,8 ^c
1-Pentanol	1492,9 \pm 119,4 ^a	1338,7 \pm 28,2 ^b	1378,0 \pm 35,7 ^{a,b}
3-Etil-2-pentanol	11,9 \pm 2,1 ^a	13,1 \pm 1,0 ^a	18,4 \pm 1,4 ^b
4-metil-1-pentanol	15,6 \pm 0,5 ^a	15,8 \pm 0,2 ^a	21,5 \pm 0,5 ^b
3-metil-1-pentanol	266,1 \pm 23,0 ^a	130,3 \pm 2,4 ^b	83,6 \pm 2,9 ^c
3-etoxi-1-Propanol	87,0 \pm 0,9 ^a	123,3 \pm 2,5 ^b	111,4 \pm 1,9 ^c
1-Octanol	24,4 \pm 1,7 ^a	25,1 \pm 0,5 ^a	28,8 \pm 0,9 ^b
1-Nonanol	3,7 \pm 0,2 ^a	2,2 \pm 0,2 ^b	1,9 \pm 0,1 ^b
Alcohol bencílico	80,7 \pm 0,8 ^a	140,4 \pm 7,5 ^b	103,5 \pm 11,6 ^c
Alcohol feniletílico	2440,2 \pm 6,0 ^a	2597,6 \pm 133,5 ^a	2128,8 \pm 6,6 ^b
1H-indol-3-etanol	854,8 \pm 4,2 ^a	662,0 \pm 40,6 ^b	673,8 \pm 50,8 ^b
1-Butanol	32,7 \pm 3,0 ^a	18,5 \pm 0,9 ^b	10,4 \pm 0,4 ^c
3-metil-2-Buten-1-ol	47,0 \pm 1,1 ^a	34,3 \pm 2,2 ^b	32,7 \pm 1,7 ^b
Total	5371,2 \pm 164,1	5129,2 \pm 220,2	4625,2 \pm 116,2
% Alcoholes	0,76%	0,65%	0,65%

Fenoles

2,6-di-terc-butyl-4-etilfenol	17,9 ± 0,1 ^a	30,6 ± 1,2 ^b	27,3 ± 3,3 ^c
4-Etilfenol	5,8 ± 0,1 ^a	6,4 ± 0,1 ^a	5,8 ± 0,1 ^a
4-Vinylgualiacol	36,8 ± 1,7 ^a	64,2 ± 1,5 ^b	53,1 ± 0,6 ^c
Acetovanillina	89,3 ± 2,1 ^a	87,9 ± 5,5 ^a	61,2 ± 6,9 ^b
Total	149,9 ± 4,0	189,1 ± 8,3	147,4 ± 10,8
% Fenoles	0,02%	0,02%	0,02%

Terpenos y derivados

Óxido de linalool	23,3 ± 1,6 ^a	65,4 ± 0,5 ^b	60,3 ± 4,4 ^b
Linalol	7,9 ± 0,6 ^a	14,3 ± 0,1 ^b	15,1 ± 1,3 ^b
α-Terpieol	8,9 ± 0,4 ^a	15,3 ± 0,9 ^b	12,8 ± 0,2 ^c
(R)-(+)-β-Citronellol	8,2 ± 0,1 ^a	10,8 ± 0,1 ^b	10,3 ± 0,7 ^b
2,6-dimetil-3,7-Octadiene-2,6-diol,	30,5 ± 2,0 ^a	45,6 ± 1,5 ^b	39,9 ± 3,5 ^c
8-Hydroxylinalool	50,4 ± 3,5 ^a	194,1 ± 5,6 ^b	92,2 ± 3,0 ^c
Total	129,1 ± 8,2	345,6 ± 8,7	230,6 ± 13,0
% Terpenos y derivados	0,02%	0,04%	0,03%

Ésteres

Acetato de etilo	34390,6 ± 1370,0 ^a	25802,0 ± 590,0 ^b	24869,0 ± 530,0 ^b
Butirato de etilo	24,5 ± 1,3 ^a	72,8 ± 1,3 ^b	54,5 ± 4,0 ^c
Isovalerato de etilo	27,4 ± 0,5 ^a	30,2 ± 1,9 ^b	15,7 ± 0,4 ^c
Acetato de isoamilo	67,1 ± 3,3 ^a	76,2 ± 1,1 ^b	30,7 ± 1,0 ^c
Hexanoato de etilo	79,5 ± 2,4 ^a	157,9 ± 12,9 ^b	115,6 ± 4,2 ^c
Acetato de hexilo	35,4 ± 1,8 ^a	76,6 ± 0,9 ^b	62,7 ± 1,0 ^c
Ácido butanoico, 2-hidroxi-3-metil, etil éster	5,7 ± 0,3 ^a	16,8 ± 0,3 ^b	13,9 ± 0,8 ^c
Octanoato de etilo	333,1 ± 12,2 ^a	415,0 ± 32,5 ^b	317,2 ± 22,0 ^a
Nonanoato de etilo	10,1 ± 0,1 ^a	11,5 ± 0,4 ^b	10,4 ± 0,1 ^a
Ethyl 2-hydroxy-4-methylpentanoate	32,4 ± 2,3 ^a	43,0 ± 3,5 ^b	49,3 ± 0,1 ^c
Lactato de isoamilo	48,0 ± 2,1 ^a	239,9 ± 4,4 ^b	208,0 ± 4,7 ^c
Decanoato de etilo	214,7 ± 5,6 ^a	278,6 ± 6,3 ^b	273,9 ± 16,3 ^b
Succinato de dietilo	404,0 ± 17,0 ^a	971,2 ± 40,7 ^b	944,7 ± 66,2 ^b
Ethyl 9-decenoate	58,7 ± 0,6 ^a	63,9 ± 3,8 ^b	58,8 ± 0,2 ^a
Fenilacetato de etilo	1,15 ± 0,04 ^a	2,18 ± 0,04 ^b	2,35 ± 0,16 ^c
Acetato de fenetilo	35,8 ± 1,4 ^a	140,4 ± 8,3 ^b	138,0 ± 5,7 ^b
Malato de dietilo	22,4 ± 0,7 ^a	34,7 ± 1,6 ^b	30,0 ± 0,3 ^c
Vainillato de metilo	147,7 ± 12,2 ^a	583,1 ± 8,8 ^b	404,3 ± 0,4 ^c
Lactato de etilo	121,6 ± 1,6 ^a	153,5 ± 1,3 ^b	151,0 ± 3,7 ^b
Ácido butanoico, 3-hidroxi, éster etílico	56,1 ± 0,3 ^a	89,3 ± 6,3 ^b	73,3 ± 4,8 ^c
Ethyl (Z) -4-decenoate	56,8 ± 2,1 ^a	220,3 ± 2,4 ^b	128,3 ± 7,4 ^c
Dodecanoato de etilo	57,1 ± 1,0 ^a	65,2 ± 0,1 ^b	61,3 ± 4,3 ^{a,b}
Tetradecanoato de metilo	36,2 ± 0,8 ^a	84,4 ± 6,4 ^b	66,8 ± 1,6 ^c
Ácido Succinoico, 2-hidroxi-3-metil, dietil éster	88,7 ± 1,6 ^a	130,9 ± 1,9 ^b	122,2 ± 2,9 ^b
Hexadecanoato de metilo	77,2 ± 2,0 ^a	154,3 ± 1,0 ^b	122,8 ± 6,8 ^c
Ácido hexadecanoico, éster etílico	370,1 ± 25,1 ^a	754,2 ± 5,8 ^b	354,9 ± 10,5 ^a
Ácido propanoico, éster 2-metil-, propílico	79,7 ± 0,6 ^a	166,0 ± 0,5 ^b	143,3 ± 4,8 ^c
Ethyl 8-nonenoato	201,6 ± 0,7 ^a	245,4 ± 2,9 ^b	220,4 ± 1,1 ^c
Total	2692,6 ± 1469,7	31079,5 ± 747,4	29043,3 ± 705,2
% Ésteres	0,38%	3,93%	4,08%

<u>Aldehídos</u>			
Acetaldehído	63723,2 ± 2330,0 ^a	14546,3 ± 458,5 ^b	12209,5 ± 520,0 ^b
Benzeneacetaldehído	63,6 ± 4,7 ^a	123,8 ± 2,2 ^b	120,6 ± 0,9 ^b
Nonanal	10,0 ± 0,2 ^a	16,5 ± 1,2 ^b	12,8 ± 0,6 ^c
3-metil-butanal	13,6 ± 1,6 ^a	30,1 ± 0,2 ^b	26,3 ± 1,1 ^c
Total	63810,4 ± 2336,5	14716,6 ± 462,1	12369,2 ± 522,7
% Aldehídos	9,06%	1,86%	1,74%
<u>Tioles</u>			
3- (metiltio)-1-Propanol	18,1 ± 1,6 ^a	121,7 ± 1,9 ^b	104,3 ± 3,3 ^c
Total	18,1 ± 1,6	121,7 ± 1,9	104,3 ± 3,3
% Tioles	0,003%	0,02%	0,01%
<u>Acetales</u>			
1-(1-etoxietoxi)-pentano	1,9 ± 0,1 ^a	2,0 ± 0,1 ^a	2,1 ± 0,2 ^a
Total	1,9 ± 0,1	2,0 ± 0,1	2,1 ± 0,2
% Acetales	0,0003%	0,0003%	0,0003%
<u>Norisoprenoides</u>			
3-Oxo- α -ionol	5,9 ± 0,1 ^a	12,2 ± 1,1 ^b	15,1 ± 1,0 ^c
Total	5,9 ± 0,1	12,2 ± 1,1	15,1 ± 1,0
% Norisoprenoides	0,0008%	0,002%	0,002%
<u>Lactonas</u>			
Dihydro-5-pentyl-2(3H)-Furanona	56,1 ± 2,4 ^a	108,4 ± 0,4 ^b	99,7 ± 1,6 ^c
2,3-dihydro-benzofuran	45,5 ± 1,8 ^a	45,8 ± 1,0 ^a	55,1 ± 0,2 ^b
Total	101,6 ± 4,2	154,2 ± 1,4	154,8 ± 1,8
% Lactonas	0,0144%	0,0219%	0,0220%

Diferentes letras en superíndice indican que existen diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$), obtenido mediante ANOVA bidireccional, aplicando la prueba de análisis múltiple de Bonferroni (BSD).

Tabla 37. Perfil de ácidos grasos (%) en polen multifloral comercial.

Ácido graso	Nº Carbonos	Polen multifloral
Ácido dodecanoico (Á. láurico)	C12:0	0,80 ± 0,07
Ácido tridecanoico	C13:0	0,092 ± 0,01
Ácido tetradecanoico (Á. mirístico)	C14:0	5,22 ± 0,10
Ácido miristoleico	C14:1	0,0022 ± 0,0001
Ácido pentadecanoico	C15:0	1,26 ± 0,01
Ácido hexadecanoico (Á. palmítico)	C16:0	19,53 ± 1,65
Ácido palmitoleico	C16:1	0,226 ± 0,004
Ácido heptadecanoico (P.I.)	C17:0	0,0043 ± 0,0001
Ácido oleico	C18:1	20,70 ± 0,12
Ácido linoleico	C18:2	13,77 ± 1,31
Ácido α -Linolénico	C18:3	22,18 ± 2,14
11-Eicosanoico	C20:1 (cis-11)	3,61 ± 0,30
11,14-Eicosadienoico	C20:2	4,36 ± 0,01
Ácido eicosatrienoico	C20:3 (w-9)	4,58 ± 0,29
Ácido docosanoico (Á. behénico)	C22:0	1,71 ± 0,01
Ácido nervónico	C24:1 (w-9)	1,94 ± 0,14

Tabla 38. Ficha de cata para el análisis sensorial descriptivo de vinos blancos.

Fecha:

Nombre del catador:

	ABC	DEF	GHI
<u>Caracterización global</u>			
<u>Fase olfativa</u>			
Carácter frutal			
Carácter floral			
Carácter especiado			
<u>Fase gustativa</u>			
Dulzor			
Acidez			
Amargor			
Astringencia			
Salinidad			
Cuerpo/Estructura			
Persistencia			
Otros (Indicar)			
<u>Caracterización específica</u>			
<u>Fase olfativa</u>			
Frutas	Blancas (manzana, pera, membrillo)		
	Tropicales (plátano, melón, piña, mango, maracuyá)		
	Cítricos (naranja, mandarina, limón, pomelo, lima)		
	Hueso (albaricoque, melocotón)		
	Seco (almendra, avellana, nuez, castaña)		
Flores Blancas (azahar, jazmín,tilo, miel)			
Vegetal (heno, pimienta verde, te, tabaco, moho)			
Balsámicos (eucalipto, menta, pino, ginebra, trementina)			
Minerales (yodo, tinta china, granito, sílex)			
Animales (cuero, caza, venado, cera de abejas)			
Microbiológicos (levadura, masa de pan, leche, mantequilla)			
Químico (azufre, sulfídrico, caucho)			
Calidez (alcohol)			
Otros (Indicar)			

Comentarios:

Tabla 39. Ficha de cata para el análisis sensorial descriptivo de vinos tintos

Fecha:

Nombre del catador:

		ABC	DEF	GHI
<u>Caracterización global</u>				
<u>Fase olfativa</u>				
Carácter frutal				
Carácter floral				
Carácter especiado				
Aromas ácteos				
<u>Fase gustativa</u>				
Dulzor				
Acidez				
Amargor				
Astringencia				
Salinidad				
Cuerpo/Estructura				
Persistencia				
Otros (Indicar)				
<u>Caracterización específica</u>				
<u>Fase olfativa</u>				
Frutas	Rojas (mora, grosella, frambuesa, fresa)			
	Negras (cereza, ciruela, granada)			
	Blancas (manzana, pera, membrillo)			
	Tropicales (plátano, melón, piña, mango, maracuyá)			
	Cítricos (naranja, mandarina, limón, pomelo, lima)			
	Hueso (añbaroque, melocotón)			
	Pasas (higo, dátil, orejón, confitura, mermelada)			
	Seco (almendra, avellana, nuez, castaña)			
Flores	Blancas (azahar, jazmín,tilo, miel)			
	Rojas (rosa, geranio, clavel)			
	Azules (lavanda, violeta, lila)			
Vegetal (heno, pimienta verde, te, tabaco, moho)				
Especias (vainilla, canela, clavo, pimienta, regaliz, anís)				
Madera (roble francés, americano, nuevo, cedro)				
Torrefactos (pan tostado, café, cacao, caramelo, ahumado)				
Balsámicos (eucalipto, menta, pino, ginebra, trementina)				
Minerales (yodo, tinta china, granito, sílex)				
Animales (cuero, caza, venado, cera de abejas)				
Microbiológicos (levadura, masa de pan, leche, mantequilla)				
Químico (azufre, sulfídrico, caucho)				
Otros (Indicar)				

Comentarios:

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Proyección de cambios geográficos en la idoneidad de la viticultura a nivel global entre los periodos de tiempo actuales y 2050 (2041-2060). (Fuente: Hannah et al., 2013)</i>	<i>34</i>
<i>Figura 2. Granos de polen floral al microscopio (Fuente: Darts Forum)</i>	<i>41</i>
<i>Figura 3. Abeja Apis mellifera con conglomerados de polen en las patas traseras (Fuente: Fundación amigos de las abejas).</i>	<i>41</i>
<i>Figura 4. Abejas entrando en la colmena con polen (a). Abejas pasando a través de la rejilla (b). Cajón con la recolección de polen diaria (c). Polen de abeja recolectado por el apicultor (d). (Fuente: Miel Sabinars del Arlanza)</i>	<i>42</i>
<i>Figura 5. Izquierda: Desecación natural de polen de abeja. Derecha: Desecación en cámara con control de temperatura. (Fuente: Corona Apicultores).....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 6. Gránulos de polen apícola comercial para consumo humano.....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 7. Captura fotografía al microscopio (SEM) de granos de polen (Willow, egg shape, a la izq. y Mouse ear, a la der.) (Fuente: Radboud University Nijmegen, Netherlands).....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 8. Evolución densidad relativa durante la FA de mostos de Palomino fino (a) y Riesling (b) con distintas dosis de polen.</i>	<i>92</i>
<i>Figura 9. Velocidad de fermentación durante en la fase exponencial de crecimiento (V_{exp}) de mostos fermentados con distintas dosis de polen</i>	<i>93</i>
<i>Figura 10. Evolución de la biomasa viable de levaduras de Saccharomyces cerevisiae durante el proceso de fermentación alcohólica de mosto de uva Palomino fino (a) y Riesling (b) con diferentes dosis de polen.....</i>	<i>95</i>
<i>Figura 11. Aumento de las poblaciones de levadura durante la fermentación alcohólica en mostos de Palomino fino y Riesling, con diferentes dosis de polen.</i>	<i>96</i>
<i>Figura 12. Evolución del nitrógeno fácilmente asimilable por las levaduras (NFA), Saccharomyces cerevisiae, en los mostos de uva Palomino fino (a) y Riesling (b) fermentados con diferentes dosis de polen.....</i>	<i>98</i>
<i>Figura 13. Consumo máximo de NFA frente al consumo máximo de NFA/UFC durante la fase de crecimiento exponencial de mostos de uva Palomino fino y de Riesling fermentados con diferentes dosis de polen.....</i>	<i>99</i>
<i>Figura 14. Concentración total de compuestos volátiles de vinos de Palomino fino y Riesling fermentados con diferentes dosis de polen. Diferentes letras en superíndice indican que existen diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$), obtenido mediante ANOVA bidireccional, aplicando la prueba de análisis múltiple de Bonferroni (BSD).</i>	<i>104</i>
<i>Figura 15. Tasa de producción de compuestos volátiles por gramo de polen en vinos de Palomino fino y Riesling fermentados con diferentes dosis de polen.....</i>	<i>105</i>
<i>Figura 16. Análisis de componentes principales en vinos de Palomino fino (Pf) y Riesling (R) fermentados con diferentes dosis de polen.</i>	<i>118</i>
<i>Figura 17. Evaluación sensorial descriptiva de los vinos de Palomino fino fermentados con polen (a). Evaluación de los atributos más significativos en los vinos de Palomino fino (b). (*$p < 0,05$, **$p < 0,01$, ***$p < 0,001$, ****$p < 0,0001$)</i>	<i>125</i>
<i>Figura 18. Evaluación sensorial descriptiva de los vinos de Riesling fermentados con polen (a). Evaluación de los atributos más significativos en los vinos de Riesling (b). (*$p < 0,05$, **$p < 0,01$, ***$p < 0,001$, ****$p < 0,0001$).....</i>	<i>126</i>
<i>Figura 19. Comparativa del incremento de NFA por dosis de polen, frente al incremento de NFA producido por gramo de polen de abeja, en mostos de uva tinta Tintilla de Rota. Diferentes letras en superíndice indican que existen diferencias significativas entre las muestras (ANOVA, $p < 0,05$).</i>	<i>131</i>
<i>Figura 20. Evolución densidad relativa durante la FA de mostos de Tintilla de Rota con distintas dosis de polen.....</i>	<i>132</i>
<i>Figura 21. Evolución de la biomasa viable de levaduras de Saccharomyces cerevisiae durante el proceso de fermentación alcohólica de mosto de Tintilla de Rota con dosis de polen.</i>	<i>133</i>

<i>Figura 22. Aumento de las poblaciones de levadura durante la fermentación alcohólica en mostos de Tintilla de Rota con diferentes dosis de polen. Diferentes letras en superíndice indican que existen diferencias significativas entre las muestras (ANOVA, $p < 0,05$).</i>	135
<i>Figura 23. Evolución del nitrógeno fácilmente asimilable por las levaduras (NFA), Saccharomyces cerevisiae, en los mostos de Tintilla de Rota, fermentados con diferentes dosis de polen.</i>	137
<i>Figura 24. Consumo de NFA/UFC durante la fase de crecimiento exponencial de mostos de uva Tintilla de Rota fermentados con diferentes dosis de polen. Diferentes letras en superíndice indican que existen diferencias significativas entre las muestras (ANOVA, $p < 0,05$).</i>	138
<i>Figura 25. Concentración de ácido málico durante la fase exponencial de crecimiento bacteriano, frente al incremento de la velocidad de consumo (%).</i>	139
<i>Figura 26. Intensidad colorante (IC) y tonalidad (N) de los vinos tintos de Tintilla de Rota, elaborados con diferentes dosis de polen.</i>	142
<i>Figura 27. Tasa de producción de compuestos volátiles por gramo de polen en los vinos de Tintilla de Rota fermentados con diferentes dosis de polen. Diferentes letras en superíndice, significa que existen diferencias significativas entre las muestras (ANOVA, $p < 0,05$).</i>	144
<i>Figura 28. Análisis de componentes principales en vinos de Tintilla de Rota fermentados con diferentes dosis de polen.</i>	157
<i>Figura 29. Porcentaje de participación de las series odorantes (afrutada, floral, especiada, grasa y herbácea) en vinos tintos, agrupadas en positivas y negativas.</i>	159
<i>Figura 30. Análisis sensorial de los vinos de Tintilla de Rota, elaborados con diferentes dosis de polen (atributos generales). (*$p < 0,05$, **$p < 0,01$, ***$p < 0,001$ and ****$p < 0,0001$)</i>	160
<i>Figura 31. Análisis sensorial de los vinos de Tintilla de Rota, elaborados con diferentes dosis de polen (atributos olfativos específicos).</i>	162
<i>Figura 32. Incrementos en el contenido de NFA de los mostos de uva blanca, Palomino fino y Riesling, con el uso del polen y activador comercial.</i>	166
<i>Figura 33. Incrementos en el contenido de NFA de los mostos de uva tinta, Tintilla de Rota, Cabernet sauvignon y Merlot, con el uso del polen y activador comercial.</i>	167
<i>Figura 34. Evolución densidad relativa durante la FA de mostos de Palomino fino (a) y Riesling (b), con el uso de polen frente a un activador comercial.</i>	169
<i>Figura 35. Evolución densidad relativa durante la FA de mostos de Tintilla de Rota (c), Cabernet sauvignon (d) y Merlot (e), con el uso de polen frente a un activador comercial.</i>	170
<i>Figura 36. Evolución de la biomasa viable de Saccharomyces cerevisiae durante el proceso de fermentación alcohólica de los mostos de Palomino fino (a), Riesling (b) y Tintilla de Rota (c), con el uso de polen frente a un activador comercial.</i>	173
<i>Figura 37. Evolución del NFA durante la fermentación alcohólica de mostos de Palomino fino (a), Riesling (b) y Tintilla de Rota (c), con el uso de polen frente a activador comercial.</i>	176
<i>Figura 38. Evolución del contenido en ácido málico durante la FML de los vinos tintos de Tintilla de Rota (a), Cabernet sauvignon (b) y Merlot (b), con el uso de polen frente a un activador comercial.</i>	178
<i>Figura 39. Análisis de componentes principales en vinos de Palomino fino, Riesling y Tintilla de Rota, fermentados con polen (p) frente a un activador comercial (cm) y control (c).</i>	189
<i>Figura 40. Porcentaje de participación de las series odorantes (afrutada, floral, grasa, herbácea y fruto seco) en los vinos blancos de Palomino fino.</i>	192
<i>Figura 41. Porcentaje de participación de las series odorantes (afrutada, floral, grasa, herbácea y fruto seco) en los vinos blancos de Riesling.</i>	192
<i>Figura 42. Porcentaje de participación de las series odorantes (afrutada, floral, grasa, herbácea y fruto seco) en los vinos tintos de Tintilla de Rota.</i>	193
<i>Figura 43. Análisis sensorial de los vinos de Palomino fino fermentados con polen y activador comercial (atributos generales). (**$p < 0,01$, ***$p < 0,001$, ****$p < 0,0001$)</i>	196
<i>Figura 44. Análisis sensorial de los vinos de Riesling fermentados con polen y activador comercial (atributos generales). (*$p < 0,05$, ****$p < 0,0001$)</i>	196
<i>Figura 45. Análisis sensorial de los vinos de Palomino fino fermentados con polen y activador comercial (atributos olfativos específicos).</i>	198

<i>Figura 46. Análisis sensorial de los vinos de Riesling fermentados con polen y activador comercial (atributos olfativos específicos).</i>	198
<i>Figura 47. Análisis sensorial de los vinos de Tintilla de Rota fermentados con polen y activador comercial (atributos generales). (*p < 0,05, **p < 0,01)</i>	199
<i>Figura 48. Análisis sensorial de los vinos de Cabernet sauvignon fermentados con polen y activador comercial (atributos generales). (*p < 0,05, **p < 0,01)</i>	200
<i>Figura 49. Análisis sensorial de los vinos de Merlot fermentados con polen y activador comercial (atributos generales). (**p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001)</i>	200
<i>Figura 50. Análisis sensorial de los vinos de Tintilla de Rota fermentados con polen y activador comercial (atributos olfativos específicos).</i>	201
<i>Figura 51. Puntuación (%) obtenida con cada tipo de elaboración (testigo, polen y activador comercial) con respecto a la puntuación total.</i>	204
<i>Figura 52. Porcentaje de catadores que identificaron correctamente el vino (testigo, polen y activador comercial) durante la prueba del test triangular.</i>	206
<i>Figura 53. Evolución del precio del polen entre las campañas 2006/07 y 2016/17. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (2017).</i>	212
<i>Figura 54. Costes nutrientes comerciales y polen (€/Kg) frente al coste por dosis (€/dosis).</i>	214

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Comparativa entre la composición proximal de polen recogido a mano y polen de abeja.</i>	<i>45</i>
<i>Tabla 2. Composición físico-química del mosto de Palomino fino con adición de polen (control, 0,1, 0,25, 1, 5, 10 y 20 g/L).....</i>	<i>89</i>
<i>Tabla 3. Composición físico-química del mosto de Riesling con adición de polen (control, 0,1, 0,25, 1, 5, 10 y 20 g/L).....</i>	<i>89</i>
<i>Tabla 4. Composición físico-química de los vinos de Palomino fino fermentados con diferentes dosis de polen.....</i>	<i>101</i>
<i>Tabla 5. Composición físico-química de los vinos Riesling fermentados con diferentes dosis de polen ...</i>	<i>102</i>
<i>Tabla 6. Concentración de compuestos volátiles ($\mu\text{g/L}$) de los vinos de Palomino fino fermentados con diferentes dosis de polen.</i>	<i>111</i>
<i>Tabla 7. Concentración de compuestos volátiles ($\mu\text{g/L}$) de los vinos de Riesling fermentados con diferentes dosis de polen.</i>	<i>114</i>
<i>Tabla 8. Cargas de las componentes principales de los compuestos volátiles en vinos de Palomino fino y Riesling fermentados con diferentes dosis de polen.....</i>	<i>118</i>
<i>Tabla 9. Sumatorio de los Valores de Actividad Odorante (ΣVAO) agrupados por serie odorantes de vinos de Palomino y Riesling fermentados con diferentes dosis de polen</i>	<i>121</i>
<i>Tabla 10. Composición físico-química del mosto de Tintilla de Rota con adición de polen (control, 0,1, 0,25, 1, 5, 10 y 20 g/L).....</i>	<i>130</i>
<i>Tabla 11. Composición físico-química de los vinos de Tintilla de Rota con diferentes dosis de polen (control, 0,1, 0,25, 1, 5, 10 y 20 g/L).....</i>	<i>143</i>
<i>Tabla 12. Concentración de los compuestos volátiles ($\mu\text{g/L}$) en vinos tintos de Tintilla de Rota con diferentes dosis de polen.</i>	<i>151</i>
<i>Tabla 13. Cargas de las componentes principales de los compuestos volátiles en los vinos de Tintilla de Rota dosificados con polen y testigo.</i>	<i>155</i>
<i>Tabla 14. Sumatorio de los valores de actividad odorante (ΣOAV) agrupados por series odorantes.....</i>	<i>158</i>
<i>Tabla 15. Parámetros físico-químicos de los mostos de Palomino fino y Riesling.....</i>	<i>166</i>
<i>Tabla 16. Contenido en NFA (mg/L) de los mostos de Tintilla de Rota, Cabernet sauvignon y Merlot. ...</i>	<i>167</i>
<i>Tabla 17. Velocidad media de consumo ($\text{g/mL} \times \text{día}$) durante el desarrollo de la fermentación alcohólica en mostos de uva blanca (Palomino fino y Riesling) y tinta (Tintilla de Rota, Cabernet sauvignon y Merlot).....</i>	<i>171</i>
<i>Tabla 18. Composición físico-química de los vinos de Palomino fino con polen frente a activador comercial.</i>	<i>180</i>
<i>Tabla 19. Composición físico-química de los vinos de Riesling con polen frente a activador comercial. .</i>	<i>181</i>
<i>Tabla 20. Composición físico-química de los vinos de Tintilla de Rota con polen frente a activador comercial.</i>	<i>181</i>
<i>Tabla 21. Composición físico-química de los vinos de Cabernet sauvignon con polen frente a activador comercial.</i>	<i>182</i>
<i>Tabla 22. Composición físico-química de los vinos de Merlot con polen frente a activador comercial....</i>	<i>182</i>
<i>Tabla 23. Familia de compuestos volátiles vinos de Palomino fino, elaborados con polen y activador comercial.</i>	<i>186</i>
<i>Tabla 24. Familia de compuestos volátiles vinos de Riesling, elaborados con polen y activador comercial.</i>	<i>186</i>
<i>Tabla 25. Familia de compuestos volátiles vinos de Tintilla de Rota, elaborados con polen y activador comercial.</i>	<i>187</i>
<i>Tabla 26. Cargas de las componentes principales de los compuestos volátiles en los vinos de Tintilla de Rota dosificados con polen y testigo.</i>	<i>189</i>
<i>Tabla 27. Sumatorio de los valores de actividad odorante (ΣOAV) de los vinos de Palomino fino agrupados por series odorantes.</i>	<i>191</i>
<i>Tabla 28. Sumatorio de los valores de actividad odorante (ΣOAV) de los vinos de Riesling agrupados por series odorantes.</i>	<i>191</i>

<i>Tabla 29. Sumatorio de los valores de actividad odorante (ΣOAV) de los vinos de Tintilla de Rota agrupados por series odorantes.</i>	<i>193</i>
<i>Tabla 30. Resultados del test de ordenación obtenido en los vinos blancos y tintos obtenidos en el estudio comparativo con polen y activador comercial.</i>	<i>203</i>
<i>Tabla 31. Resultados de la prueba triangular obtenidos en los vinos blancos y tintos obtenidos en el estudio comparativo con polen y activador comercial.</i>	<i>205</i>
<i>Tabla 32. Nutrientes comerciales, su formulación e interés enológico para FA y FML.</i>	<i>213</i>
<i>Tabla 33. Umbral de percepción del olor (OPT), descriptores de olor y serie odorante de los compuestos volátiles encontrados en los vinos</i>	<i>233</i>
<i>Tabla 34. Concentración de los compuestos volátiles (μg/L) en vinos blancos de Palomino fino (control, polen y activador comercial.</i>	<i>235</i>
<i>Tabla 35. Concentración de los compuestos volátiles (μg/L) en vinos blancos de Riesling (control, polen y activador comercial.</i>	<i>237</i>
<i>Tabla 36. Concentración de los compuestos volátiles (μg/L) en vinos blancos de Tintilla de Rota (control, polen y activador comercial.</i>	<i>239</i>
<i>Tabla 37. Perfil de ácidos grasos (%) en polen multifloral commercial.</i>	<i>242</i>
<i>Tabla 38. Ficha de cata para el análisis sensorial descriptivo de vinos blancos.</i>	<i>243</i>
<i>Tabla 39. Ficha de cata para el análisis sensorial descriptivo de vinos tintos</i>	<i>244</i>

CONTRIBUCIÓN CIENTÍFICA
ASOCIADA A LA TESIS
DOCTORAL

Artículos en revistas indexadas en el Journal Citations Reports (JCR)

- Amores-Arrocha, A., Roldán, A., Jiménez-Cantizano, A., Caro, I., and Palacios, V. (2018). Evaluation of the use of multiflora bee pollen on the volatile compounds and sensorial profile of Palomino fino and Riesling white young wines. *Food Research International*, 105(November 2017), 197–209. (Índice de impacto: 3,086, Q1, T1, 2018)
- Amores-Arrocha, A., Roldán, A., Jiménez-Cantizano, A., Caro, I., and Palacios, V. (2018). Effect on White Grape Must of Multiflora Bee Pollen Addition during the Alcoholic Fermentation Process. *Molecules*, 23, 1231, 1-16. (Índice de impacto: 2,861, Q2, T1, 2018)

